

***Listeria monocytogenes* en alimentos: ¿son todos los aislamientos igual de virulentos?**

V. LÓPEZ¹, M. SUÁREZ², I. CHICO-CALERO², J. NAVAS¹, J. V. MARTÍNEZ-SUÁREZ^{1*}

¹Departamento de Tecnología de Alimentos, Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), Carretera de La Coruña km 7^o5, 28040 Madrid, España. ²Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, Avda. Puerta de Hierro s/n, 28040 Madrid, España.
*Correspondencia. E-mail: joaquin@inia.es

RESUMEN

Listeria monocytogenes es un patógeno humano que se transmite a través de los alimentos y que causa infecciones graves, con una alta tasa de mortalidad. A pesar de la ubicuidad del microorganismo, la tasa real de la enfermedad es bastante baja y se asocia casi siempre a condiciones predisponentes. Tradicionalmente se consideraba que los aislamientos presentes en los alimentos y en el ambiente tenían la misma capacidad patogénica que los aislamientos de origen clínico. Pero el análisis de mutaciones en los genes de determinados factores de virulencia (internalina, hemolisina, fosfolipasas, proteína de superficie ActA y proteína reguladora PrfA), los estudios cuantitativos realizados con cultivos celulares y la genética de poblaciones, están replanteando la discusión sobre la variabilidad de la virulencia de *L. monocytogenes*. A pesar de todos estos avances, no existe un único marcador que permita comprobar la virulencia de los aislamientos naturales de esta especie. Probablemente en el futuro, la combinación de diferentes marcadores moleculares permitirá detectar los alimentos contaminados sólo por los clones virulentos de *L. monocytogenes*, con lo que se mejorará la prevención de la listeriosis humana transmitida por alimentos.

Palabras clave: *Listeria monocytogenes*, alimentos, aislamientos avirulentos, atenuación de la virulencia

ABSTRACT

Foodborne *Listeria monocytogenes*: are all the isolates equally virulent? *Listeria monocytogenes* is a foodborne human pathogen responsible for invasive infections presenting overall a high mortality. Despite the ubiquity of the microorganism, the actual disease rate is quite low and the disease is most often associated with an underlying predisposition. Foodborne and environmental isolates were traditionally considered of similar pathogenicity compared to clinical isolates. But the analysis of mutations in the genes encoding specific virulence factors (internalin, hemolysin, phospholipases, surface protein ActA and regulator protein PrfA), quantitative studies with cell cultures and population genetics have raised considerable concerns about virulence differences among *L. monocytogenes* strains. Despite this great step forward, there is not a single marker available to test the virulence of field isolates of this species. In the future, the combination of different molecular markers will probably allow the screening of food contamination by only the virulent clones of *L. monocytogenes*, thus improving the prevention of foodborne human listeriosis.

Key words: *Listeria monocytogenes*, foods, avirulent isolates, virulence attenuation

INTRODUCCIÓN

La listeriosis es una enfermedad infecciosa bacteriana grave del hombre y de los animales. La listeriosis humana es causada por *Listeria monocytogenes* y el consumo de alimentos contaminados es su origen fundamental. *L. monocytogenes* es un microorganismo saprofito y ubicuo en el ambiente, y está presente en bajo número en muchos alimentos, incluidos algunos que no necesitan ser cocinados antes de su consumo (43, 61, 63, 94, 95). Este microorganismo supone un problema grave para las empresas alimentarias debido a la dificultad que presenta su control en las plantas de procesado. Por todo ello, desde el punto de vista de la higiene y la salud alimentaria y pública, *L. monocytogenes* es un organismo prioritario en los planes de análisis de peligros y puntos de control

críticos (APPCC) llevados a cabo en las industrias alimentarias, así como en los planes de prevención de enfermedades de las instituciones sanitarias (43, 68). En algunos países como Estados Unidos, las medidas adoptadas por la industria alimentaria en los últimos años han hecho disminuir la incidencia de la listeriosis humana (12).

Las graves manifestaciones clínicas características de la listeriosis (meningitis y/o encefalitis, abortos o infecciones neonatales, y septicemias) hacen que, aunque sea una enfermedad infecciosa de baja morbilidad, presente una alta mortalidad, con tasas que van del 13 al 34% (27), las más altas de todas las infecciones alimentarias (80).

La listeriosis humana puede presentarse como epidemias o en forma de casos esporádicos, y es fundamentalmente una infección de carácter oportunista que afec-

ta sobre todo a mujeres embarazadas, recién nacidos, ancianos y adultos inmunodeprimidos, incluyendo a los afectados de SIDA (91).

Se sabe que la dosis infecciosa de *L. monocytogenes* es de, al menos, 10^2 células viables en el caso de los grupos de riesgo, y que esta cifra aumenta hasta 10^4 en el caso de la población sana. Sin embargo, aún existen muchas lagunas en la comprensión de la relación dosis-respuesta de la listeriosis humana y del papel que juega la virulencia de la cepa implicada, así como su interacción con el hospedador (43, 63). Por este motivo, en la actualidad se sigue considerando a todos los aislamientos de *L. monocytogenes* igual de patogénicos, aunque existen cada vez más estudios que indican que la virulencia varía de unas cepas a otras.

FACTORES DE VIRULENCIA DE *Listeria Monocytogenes*

Listeria monocytogenes es un parásito intracelular facultativo que entra en el hospedador de forma primaria a través del intestino. En los últimos años se han identificado un gran número de factores de virulencia involucrados en los pasos clave de este ciclo de vida intracelular (26). El ciclo incluye la fagocitosis inducida por el propio patógeno, la lisis de la vacuola fagocítica, el movimiento en el citoplasma y la diseminación a las células vecinas (106) (Figura 1).

El ciclo comienza con la adhesión a la superficie de la célula eucariota y la subsecuente penetración de la bacteria dentro de la célula hospedadora mediante fagocitosis. El único mecanismo conocido que permite la unión covalente de las proteínas de superficie de la pared celular de bacterias gram-positivas a la célula eucariota requiere proteínas con una secuencia conservada LPXTG (Leu-Pro-X-Thr-Gly, donde X es cualquier aminoácido). En el genoma de *L. monocytogenes* se han detectado 41 genes que codifican para proteínas LPXTG. Las primeras proteínas de este tipo identificadas fueron la internalina (o InIA) y la proteína InIB, codificadas ambas por el operón *inlAB* (8, 55); la primera interviene en la adhesión e invasión de células epiteliales polarizadas, como las intestinales, mientras que InIB lo hace en el caso de células epiteliales no polarizadas, como los hepatocitos (81). Posteriormente se han descrito numerosos genes que codifican para proteínas del tipo de la internalina (*inlC*, *inlC2*, *inlD*, etc.). Existen muchas otras moléculas necesarias para la invasión y/o entrada de *L. monocytogenes* en la célula eucariota, entre las que se encuentran varias autolisinas (Ami, p60, Auto), una proteína fijadora de fibronectina (FbpA) y proteínas que también intervienen en fases posteriores del ciclo intracelular, como ActA (99) y la hemolisina o listeriolisina O (LLO) (26).

Una vez fagocitada, la bacteria es capaz de escapar del ambiente hostil del fagosoma gracias a la secreción de LLO, una hemolisina activa a bajo pH codificada por

el gen *hly* y activada por tiol. LLO reconoce el colesterol de la membrana, forma poros y favorece la lisis de la membrana del fagolisosoma, lo que provoca la emigración de *L. monocytogenes* al citosol de la célula hospedadora (51, 67). La hemolisina de *L. ivanovii* tiene características que la diferencian de LLO (35, 36).

Además de esta toxina, *L. monocytogenes* secreta al medio extracelular dos fosfolipasas C asociadas con la virulencia, que pueden contribuir a dañar las membranas y a la correspondiente citolisis. Una de ellas, PI-PLC, tiene como sustrato específico al fosfatidilinositol (PI), está codificada por *plcA* y es capaz de romper los anclajes glicosil-PI. La otra, PC-PLC, es una lecitinasa codificada por *plcB*, que tiene un rango más amplio de sustrato, dado que hidroliza fosfatidilcolina, fosfatidilserina y fosfatidiletanolamina (105). La lecitinasa es activada y atraviesa la pared bacteriana gracias a una metaloproteasa específica (Mpl) codificada por el gen *mpl* (109).

La glucosa actúa de represor de los genes de virulencia de *L. monocytogenes* (84). La glucosa-1-fosfato (G1P), que no produce este efecto, es el metabolito precursor y el producto primario de degradación del glucógeno, por lo que es abundante en las células de mamífero. Se ha demostrado que la G1P es fundamental para el crecimiento intracelular de *L. monocytogenes* (84). La multiplicación intracelular precisa un transportador de hexosa-fosfato (Hpt), que es homólogo del transportador de glucosa-6-fosfato (G6P) de la célula eucariota responsable de la entrada de G6P en el retículo endoplásmico desde el citosol (18, 34). Esta proteína también es responsable de la entrada de fosfomicina en el interior de la célula bacteriana, lo que explica su sensibilidad *in vivo* asociada con resistencia *in vitro* (97).

Una vez alcanzado el citoplasma, la bacteria utiliza el citoesqueleto de la célula hospedadora para desplazarse en su interior. El movimiento intracelular tiene lugar como consecuencia de un ensamblaje direccional de monómeros de actina de la célula hospedadora en uno de los polos de la bacteria, fenómeno aparentemente dirigido por la proteína de superficie ActA (99). Finalmente, algunas bacterias alcanzan la periferia de la célula infectada, entran en contacto con la membrana celular y forman protuberancias hacia la célula colindante en forma de evaginaciones citoplásmicas que contienen en su extremo una bacteria. Estas estructuras invasoras son fagocitadas y la bacteria queda encerrada en un fagosoma de doble membrana, en cuya rotura parece jugar un papel fundamental la lecitinasa (Figura 1). Al ser un mecanismo que permite la diseminación de la bacteria por los tejidos del hospedador sin entrar en contacto con los efectores humorales del sistema inmune, este fenómeno de paso directo de célula a célula es crucial en la patogénesis de la infección que causa *L. monocytogenes* (22). Este mecanismo también es el responsable de la formación de placas en los cultivos celulares, una característica que ha sido relacionada con la virulencia en ratones (104).

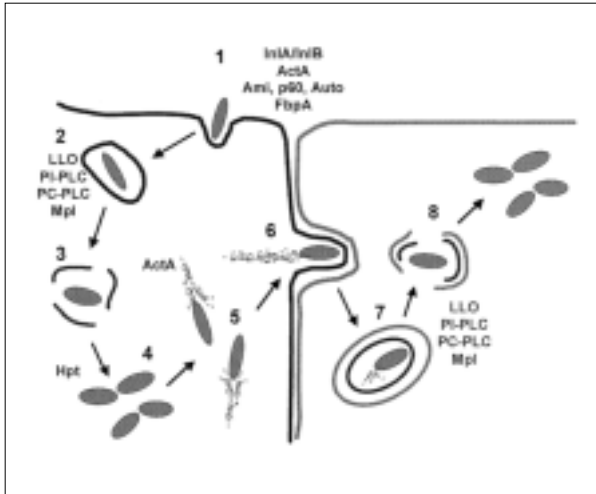


Figura 1. Representación esquemática del ciclo de vida intracelular de *Listeria monocytogenes*.

Tras la adhesión a la célula eucariota (en la que intervienen proteínas como InlA ó InlB, la proteína ActA, diferentes autolisinas como Ami, p60 y Auto, y la proteína fijadora de fibronectina FbpA), la bacteria penetra en su interior induciendo su propia fagocitosis [1], y queda englobada en un fagosoma primario [2], del que escapa por la acción de la hemolisina LLO y las fosfolipasas PI-PLC y PC-PLC [3]; en el citoplasma se multiplica utilizando el transportador de hexosa-fosfato Hpt [4] y se mueve gracias a la polimerización de actina dirigida por ActA [5], pasando así a células contiguas [6] dentro de un fagosoma secundario de doble membrana [7], del que escapa reiniciando el ciclo [8]. Adaptado de (106).

La secuenciación en el año 2001 del genoma completo de la primera cepa de *L. monocytogenes* y su comparación con el genoma de *L. innocua* permitió determinar que un 10% de los genes son diferentes en la especie patógena respecto de la no patógena (33). La comparación de los genomas de las diferentes especies del género *Listeria* muestra que las especies no patógenas han evolucionado a partir de progenitores patógenos por reducción de sus genomas (41).

Posteriormente se compararon los genomas de otras cepas de *L. monocytogenes* (de serotipo 1/2a y de serotipo 4b) (25, 75). Ello permitió identificar genes específicos de serotipo, y establecer que un 8% de las secuencias eran específicas del serotipo 4b, que es una diferencia similar a la que existe entre *L. monocytogenes* y *L. innocua* (25). De los 484 genes regulados durante el crecimiento intracelular de *Listeria* spp., 41 son específicos de *L. monocytogenes*, pero también existen 25 genes específicos del serotipo 1/2a que no están presentes en el genoma secuenciado de la cepa de serotipo 4b (41).

Todos estos resultados podrían explicar el potencial específico para la virulencia del serotipo 4b. Se puede decir, por tanto, que la diversidad genética que existe entre algunos serotipos de *L. monocytogenes* es tan grande como la que existe entre algunas especies de *Listeria* (26).

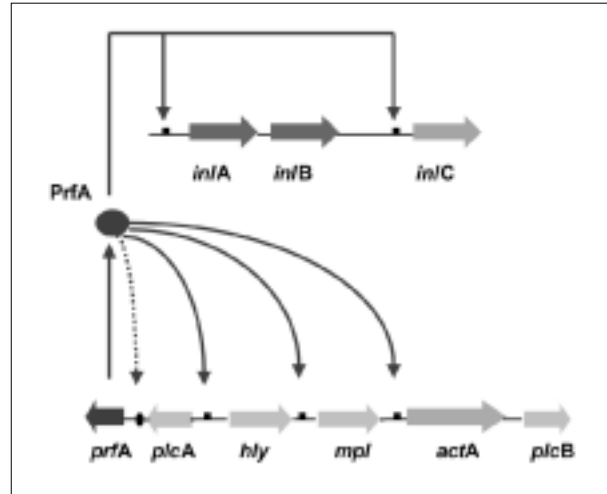


Figura 2. Esquema de la organización genética del locus central de virulencia de *Listeria monocytogenes* y de la regulación que ejerce PrfA. Adaptado de (106).

El análisis mediante *microarrays* construidos a partir de estos resultados y empleando un número mayor de cepas ha permitido comprobar que la mayoría de los genes de virulencia están presentes en todas las cepas de *L. monocytogenes*, pero que existen numerosas secuencias específicas de los grandes grupos genéticos en que se divide esta especie (divisiones o linajes) y de los diferentes serotipos (25). Incluso se ha detectado por primera vez que un gen implicado en la virulencia (*aut*) no está presente en el serotipo 4b, por lo que podrían existir más diferencias en la base genética de la virulencia de los distintos serotipos (26).

Los genes de virulencia de *L. monocytogenes* se organizan dentro de unidades genéticas conocidas como islas de patogenicidad, que son adquiridas por la bacteria por mecanismos de transferencia genética horizontal, algunas veces como parte de un elemento genético móvil, por lo cual son importantes en la evolución bacteriana (14). Seis de los genes de los factores de virulencia responsables del parasitismo intracelular de *L. monocytogenes* (*prfA*, *plcA*, *hly*, *mpl*, *actA* y *plcB*) están en una región del cromosoma de 9 kb conocida como "isla 1 de patogenicidad de *Listeria*" (*Listeria pathogenicity island 1*, *LPI-1*) o "agrupamiento de genes de virulencia" (*virulence gene cluster*, *vgc*) (Figura 2) (53, 106). La proteína reguladora PrfA es absolutamente indispensable para la expresión de la virulencia en las especies patógenas de *Listeria* (85). La expresión del regulón de virulencia a través de PrfA depende de diversas señales ambientales (38). Estas señales de activación incluyen temperatura alta (37 °C), condiciones de estrés y "sequestró" de componentes del medio de crecimiento celular por carbón activado (86); por otro lado, y como ya se ha mencionado, la expresión de los genes de virulencia a través de PrfA también está sujeta a represión por catabolito (84, 98).

A partir de la secuenciación del genoma de *L. monocytogenes* se han descubierto nuevos factores de virulencia, entre los que destacan nuevas proteínas de superficie del tipo de la internalina, las sortasas SrtA y SrtB (transpeptidasas que unen a la pared celular diferentes proteínas de superficie como la internalina), y una hidrolasa de sales biliares, BSH, que permite a la bacteria sobrevivir en el intestino y que no se encuentra en *L. innocua* (26).

Existe también una base de datos con los proteomas de *Listeria*, que facilita la asignación de funciones a los diferentes genes de los genomas secuenciados (24).

MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN DE CEPAS

Los métodos de identificación de cepas han permitido caracterizar los subtipos y los grupos clonales de *L. monocytogenes* y asociarlos con fenotipos particulares, sobre todo con su potencial patogénico (107). Estas técnicas no sólo son herramientas muy valiosas para identificar los brotes epidémicos, sino también para prevenirlos, controlando las contaminaciones durante la producción y distribución de alimentos.

El estudio de los serotipos constituye una herramienta importante como primer nivel de diferenciación de las cepas de *L. monocytogenes*. La serotipificación se utiliza en todos los estudios epidemiológicos, a pesar de que posee una capacidad de discriminación bastante pequeña y que existen cepas no serotipables (48). Por ejemplo, *L. monocytogenes* se puede clasificar en 13 serotipos diferentes, mientras que algunos métodos genéticos diferencian más de 100 subtipos de esta especie (94). Los 13 serotipos están basados en las variaciones de los antígenos somáticos (O) y flagelares (H) detectadas mediante anticuerpos.

Junto con la serotipificación, los métodos moleculares empleados para estudiar los subtipos de esta especie han mejorado notablemente la caracterización de *L.*

monocytogenes, permitiendo diferenciar cepas y clones (5). Los métodos moleculares más utilizados con *L. monocytogenes* son la amplificación al azar de polimorfismos del DNA (*random amplification of polymorphic DNA, RAPD*) (1, 60), la ribotipificación o estudio de polimorfismos en los genes de RNAs ribosómicos (*ribotyping*) (30, 95, 96), la electroforesis en gel en campo pulsante (*pulsed field gel electrophoresis, PFGE*) (54, 102) y, más recientemente, la secuenciación de DNA (10, 95, 96, 110). La electroforesis en gel en campo pulsante (Figura 3) es la técnica más utilizada en estudios epidemiológicos por su alta capacidad discriminadora, ya que puede diferenciar cepas que se hallen muy próximas genéticamente, y también porque posee una buena reproducibilidad (2, 58, 59, 77, 92). Aunque esta técnica tiene un poder de discriminación mayor que la ribotipificación, la combinación de ambos métodos puede diferenciar un mayor número de subtipos moleculares (40). La electroforesis en gel en campo pulsante es, sin embargo, una técnica manual, delicada y lenta, por lo que no se presta al análisis microbiológico de los alimentos a tiempo real sino de forma retrospectiva. Es el método empleado por el *Center for Disease Control and Prevention (CDC)* de Estados Unidos en la red de vigilancia molecular de las infecciones alimentarias *PulseNet USA*. Esta red dispone de una base de datos de "pulsotipos" de aislamientos de alimentos y muestras clínicas de *L. monocytogenes* y otros patógenos, que es compartida por laboratorios de salud pública de ese país (31, 100).

Los avances que se están produciendo en la genómica bacteriana permitirán en los próximos años llevar a cabo el estudio de los subtipos moleculares de *L. monocytogenes* de forma mucho más fiable, identificando diferentes genes que podrán ser utilizados en técnicas diversas, como la comparación de secuencias de múltiples genes (*multilocus sequence typing, MLST*) (110), o de un único gen (*single locus sequence typing, SLST*) (95, 96) y mediante *microarrays* (11, 25).

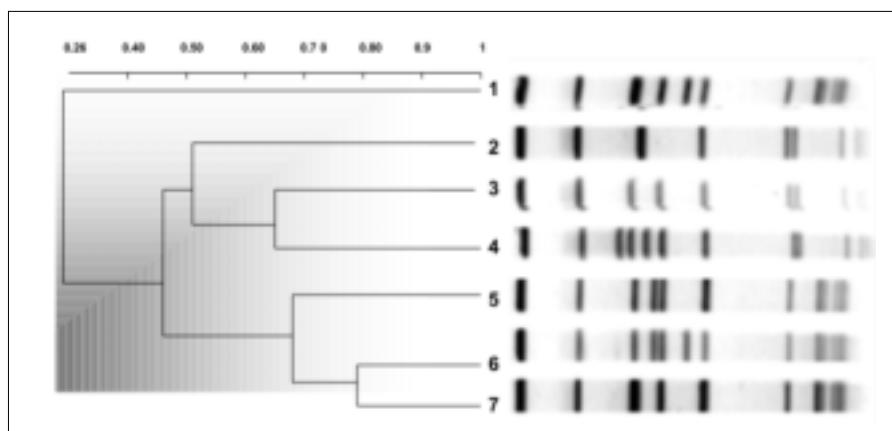


Figura 3. Dendrograma y los correspondientes pulsotipos o patrones obtenidos por electroforesis en gel en campo pulsante (PFGE) de ADN de siete cepas de *L. monocytogenes* aisladas de alimentos.

IDENTIFICACIÓN DE AISLAMIENTOS VIRULENTOS

Variabilidad de la virulencia en las poblaciones de *Listeria monocytogenes*

El dilema que se plantea en la evaluación y control de riesgos de la listeriosis alimentaria es que aunque la contaminación de determinados alimentos sea muy frecuente, y, por tanto, la exposición muy amplia, la enfermedad se asocia con una pequeña subpoblación de esta especie bacteriana y tiene lugar en una pequeña proporción de los individuos susceptibles. Tasas de prevalencia de *L. monocytogenes* del 1 al 10%, y aun mayores, son frecuentes en algunos alimentos; a pesar de ello, la listeriosis sintomática continúa siendo una enfermedad poco frecuente (43, 94).

El estudio de los serotipos y subtipos moleculares de las cepas de *L. monocytogenes* responsables de los grandes brotes epidémicos de listeriosis ha sido el punto de partida de la idea de la variabilidad de la virulencia, pues se ha demostrado con diferentes técnicas que existe un número muy pequeño de serotipos y de clones implicados (17, 48).

Analizando la distribución de los serotipos de *L. monocytogenes* en las muestras clínicas y en los alimentos, se observa que de los 13 serotipos en que se clasifica *L. monocytogenes*, tan sólo tres (4b, 1/2a y 1/2b) representan por sí solos la causa del 89 al 96% de los casos de listeriosis en todo el mundo, lo que sugiere que determinadas cepas de *L. monocytogenes* tienen más probabilidades de causar enfermedad que otras (43, 62, 94). Además, una parte de los casos esporádicos y gran número de los brotes asociados con alimentos son causados por cepas de serotipo 4b (27, 94). En los casos esporádicos predominan los mismos serotipos, aunque la frecuencia del serotipo 4b es menor que la de los serotipos 1/2a y 1/2b. Muchas cepas de serotipo 4b responsables de los grandes brotes epidémicos han sido caracterizadas molecularmente. El serotipo 4b es muy clonal y el número de cepas diferentes asociadas a los brotes en distintos países y durante más de 20 años es muy pequeño; por ejemplo, una cepa de serotipo 4b aislada en Austria después del año 2000 resultó idéntica a otra cepa también epidémica de Estados Unidos de 1985 (40). Estas cepas de serotipo 4b aisladas de la mayoría de los brotes epidémicos forman tres grupos genéticos homogéneos estrechamente relacionados, que se han denominado "clones epidémicos" (43, 69). En los alimentos no asociados con casos de listeriosis, por el contrario, predominan los serotipos 1/2, mientras que el serotipo 4b es muy escaso. Las cepas de serotipo 4b podrían tener una menor capacidad para formar biopelículas en las plantas de procesamiento de alimentos en comparación con las de los serotipos 1/2, lo que podría explicar su escasez en ellos (29). Por el contrario, la diferente distribución de los serotipos no está relacionada, aparentemente, con la existencia de alguna clase de ventaja del

serotipo 1/2a frente al 4b en los medios de cultivo selectivos empleados habitualmente (37).

El análisis filogenético de múltiples genes (65, 110) permite agrupar a las cepas de *L. monocytogenes* en tres grandes grupos genéticos denominados linajes I, II y III (65, 70, 95, 107). Los serotipos 1/2b, 3b, 4b, 4d y 4e se encuentran normalmente en el linaje I, y son aislamientos de epidemias de origen alimentario en humanos y de casos esporádicos de listeriosis en animales y humanos, mientras que el linaje genético II corresponde a los serotipos 1/2a, 3a, 1/2c y 3c, aislamientos mayoritariamente de casos esporádicos de listeriosis en humanos (70). Esta clasificación filogenética de linajes sitúa a los tres serotipos mayoritarios en dos linajes diferentes: los serotipos 1/2b y 4b pertenecen mayoritariamente al linaje I y el serotipo 1/2a al linaje II. Se ha postulado que estos dos linajes representarían dos subespecies de *L. monocytogenes*. El linaje III, que incluye los serotipos 4a y 4c así como determinadas cepas de serotipo 4b (57), representa una unidad taxonómica más alejada y se ha postulado que podría representar una nueva especie. Las cepas del linaje III suelen tener características atípicas y son muy escasas en los alimentos y en las muestras clínicas, aunque se aíslan con cierta frecuencia en animales (88).

Los linajes predominantes, I y II, representan dos grupos evolutivos separados. Estudios realizados con cepas de *L. monocytogenes* procedentes de casos clínicos de listeriosis animal han mostrado que el linaje I es de naturaleza clonal, más citopatogénico, y se asocia predominantemente con casos de encefalitis, mientras que el linaje II es más diverso desde el punto de vista genético y se asocia por igual con los distintos cuadros clínicos del ganado (82).

Todos estos resultados de caracterización de amplias colecciones de cepas de *L. monocytogenes* indican que existen distintos grupos de cepas genéticamente homogéneas que podrían tener diferente potencial patogénico (82).

Al combinar el estudio de los subtipos moleculares con el estudio de la citopatogenicidad de dos grandes grupos de cepas de origen humano y alimentario (39) se ha observado que los subtipos previamente relacionados con brotes de listeriosis y los incluidos en el linaje I son más frecuentes en las cepas de origen humano y poseen más capacidad citopatogénica. Estos subtipos podrían formar un grupo clonal con mayor virulencia, lo que también favorecería la hipótesis de que las cepas humanas y alimentarias forman poblaciones diferentes (20). Por otro lado, el linaje II podría ser un subgrupo de *L. monocytogenes* especialmente adaptado a las condiciones ambientales (95). Existen subtipos moleculares en los alimentos que no aparecen en las muestras clínicas, y algunas cepas clínicas no se encuentran en los alimentos (32). No obstante, y dado que la listeriosis humana es una enfermedad de transmisión alimentaria, es

lógico que estas poblaciones se solapen y que en la cadena de producción de alimentos se encuentren algunos subtipos de *L. monocytogenes* asociados a casos esporádicos o epidémicos de listeriosis humana (7, 96).

Desde otro punto de vista, se ha demostrado que el riesgo de contraer listeriosis no sólo depende de la relación dosis-respuesta, sino también del subtipo molecular (linaje y ribotipo) de la cepa implicada (15).

Variabilidad de la virulencia de aislamientos naturales

Numerosas observaciones indican que la virulencia de *L. monocytogenes* varía de unos aislamientos a otros.

Por ejemplo, en un brote de listeriosis en el que estaba implicada una cepa presente en el alimento con un bajo número de células se encontró que una segunda cepa no asociada con el brote y también presente en el mismo alimento se hallaba en números más altos, por lo que los autores sugieren que la virulencia de estas dos cepas de *L. monocytogenes* probablemente fuese diferente (64).

Distintos grupos han observado que entre un 8 y un 21% de los aislamientos naturales de *L. monocytogenes*, tanto de alimentos como ambientales, tienen atenuada su virulencia o son totalmente avirulentos (9, 13, 21, 79, 89, 104).

La virulencia de los aislamientos naturales de *L. monocytogenes* se ha estudiado con ensayos *in vitro*, con cultivos celulares y con modelos animales. Los ensayos *in vitro* pueden detectar marcadores de la virulencia fenotípicos (por ejemplo, el grado de hemólisis) o genotípicos (por ejemplo, mutaciones en el gen de la hemolisina) (87). Los ensayos con cultivos celulares más empleados para evaluar la virulencia de *L. monocytogenes* son la medida de la formación de placas de lisis en diferentes tipos de células, como las Caco-2, similares a los enterocitos humanos, y diferentes medidas de la citotoxicidad, como la evaluación de la entrada y multiplicación de las bacterias en células de epitelio intestinal (79, 104). Por último, el modelo *in vivo* más utilizado en ensayos de virulencia de *L. monocytogenes* es la determinación de la dosis letal 50% en ratones, así como la evaluación de la recuperación del patógeno del bazo e hígado de ratones inmunocompetentes o inmunodeprimidos tras la inoculación oral o intravenosa (4, 83).

En la mayoría de los estudios realizados con cultivos celulares y en modelos murinos se ha llegado a la conclusión de que existe una gradación de la virulencia en los aislamientos de *L. monocytogenes* de origen alimentario, aunque las cepas de origen clínico no suelen ser más virulentas que las del grupo anterior.

Dificultades para detectar los diferentes grados de virulencia

A pesar de las diferencias en la distribución de serotipos, linajes y subtipos moleculares, los mecanismos

responsables de la variabilidad de la virulencia de *L. monocytogenes* aún no son bien conocidos. No existe un único marcador que permita diferenciar los aislamientos virulentos de los avirulentos. Por ejemplo, la resistencia al pH ácido y a las sales biliares no diferencia a las cepas de *L. monocytogenes* causantes de infecciones de aquellas procedentes de portadores sanos o de alimentos (78).

Por otro lado, cuando se han comparado diferentes subtipos moleculares o serotipos, no se ha encontrado una asociación clara de determinado grupo con los distintos grados de virulencia (21, 54, 60, 83, 87).

La secuenciación del genoma completo de *L. monocytogenes* y *L. innocua* (33) representó un gran avance, pero el papel que juegan los diferentes factores de virulencia sigue planteando interrogantes. En numerosos casos se ha comprobado que la delección de los correspondientes genes origina la reducción de la virulencia *in vitro* e *in vivo* (83). Hasta ahora, sin embargo, la detección de genes de virulencia no se ha podido relacionar directamente con la virulencia funcional, ya que estos genes están presentes en prácticamente todas las cepas aisladas de alimentos. En muchos casos la asociación de determinados marcadores con la virulencia de *L. monocytogenes* ha sido infructuosa. Por ejemplo, estudiando 10 cepas, Chiu *et al.* (19) no pudieron medir diferencias en su virulencia tras analizar (i) la presencia de genes de virulencia mediante PCR; (ii) la actividad de la listeriolisina y de fosfolipasas; (iii) la hidrofobicidad de las cepas; (iv) la invasión de células Caco-2.

El modelo animal con ratones, tanto inmunocompetentes como inmunodeprimidos, tiene grandes limitaciones, ya que, en ocasiones, las cepas con diferentes grados de virulencia no muestran diferencias en la dosis letal 50% (101).

Las dificultades de los modelos celulares y animales actuales han llevado a buscar modelos alternativos para el estudio de la virulencia de *L. monocytogenes*. Se ha propuesto la utilización de células Vero en los ensayos de invasión, en lugar de las células Caco-2, porque en las primeras la invasión es uniformemente alta con las cepas de origen clínico, pero variable con las cepas de alimentos, independientemente de su serotipo (108). Entre los modelos celulares alternativos se encuentran las células de *Drosophila* (3) y *Caenorhabditis elegans* (103).

El estudio *in vivo* de las internalinas InIA e InIB indica que ambas son específicas de especie y que se necesitan nuevos modelos animales para estudiar sus funciones en relación con el inicio de la infección en los humanos (52). Además, los sistemas utilizados en los estudios de los factores de virulencia (bacterias clonales, cultivos celulares y animales genéticamente homogéneos) no reflejan la diversidad que se encuentra en la naturaleza.

Causas de la atenuación de la virulencia

Para desarrollar métodos que permitan detectar los grados de virulencia de *L. monocytogenes* es necesario conocer primero los mecanismos que dan lugar a la atenuación o a la ausencia total de la virulencia en los aislamientos naturales de esta especie (87).

La ausencia o disminución de la actividad hemolítica fue el primer factor estudiado para explicar la ausencia o disminución de la virulencia de algunos aislamientos naturales (23, 28, 87).

Dentro de los genes analizados para determinar la virulencia de *L. monocytogenes* es interesante resaltar la comparación de los que codifican para proteínas de superficie. Hasta ahora se han caracterizado en este grupo la internalina, las proteínas InlB y ActA y la proteína de adhesión Ami, todas participantes en el proceso de invasión (45). La internalina es la proteína que permite la entrada de *L. monocytogenes* en células epiteliales intestinales humanas en cultivo y en los enterocitos de los ratones transgénicos que expresan su receptor, la E-caderina humana (66). La proteína InlA es específica de *L. monocytogenes* (25). Se ha tratado de asociar los patrones de restricción diferentes de las secuencias *inlA* con los diferentes grados de virulencia (93). La especificidad del gen *inlA* se ha aprovechado para detectar *L. monocytogenes* mediante PCR (73) y con un anticuerpo monoclonal (42). Algunas cepas de *L. monocytogenes* expresan una forma no funcional de internalina, por lo que se ha comparado la expresión de esta proteína en dos grupos de cepas procedentes de infecciones humanas o de alimentos (44). Las cepas de origen clínico expresan la internalina completa con mayor frecuencia (96%) que las cepas procedentes de alimentos (65%). De los cuatro serotipos que se aíslan más frecuentemente, el serotipo 4b (que es el asociado con el mayor número de brotes de listeriosis humana) y el serotipo 1/2b expresan siempre la internalina completa, mientras que el serotipo 1/2a lo hace de forma variable y el serotipo 1/2c (raramente responsable de casos de listeriosis humana) expresa siempre la forma truncada de la internalina. Los autores concluyen que el estudio de la expresión de la internalina puede ser un buen marcador de la virulencia de *L. monocytogenes* en humanos, lo que permitiría evaluar los riesgos de listeriosis en función no sólo de los niveles de contaminación sino también de la funcionalidad de la internalina (44, 59).

Posteriormente se han identificado otras mutaciones que daban lugar a internalinas truncadas (76, 93). Los subtipos (ribotipos) de *L. monocytogenes* con codones de parada en las secuencias de sus genes *inlA*, que darían lugar a proteínas truncadas, son más frecuentes entre las cepas de origen alimentario que entre las de origen clínico (76).

Recientemente se han caracterizado un grupo de aislamientos de *L. monocytogenes* con su virulencia atenuada de forma natural (87). Tras la comparación de su

citotoxicidad y la expresión de determinados genes de virulencia, los autores diferencian cuatro grupos. En el grupo de aislamientos no citotóxicos, los hay que no expresan el gen de la hemolisina a un nivel normal y otros en los que el nivel de expresión es normal pero la hemolisina es inactiva. Entre los aislamientos citotóxicos se encuentra un caso de hiperexpresión del gen de la hemolisina, que podría explicar su atenuación de la virulencia, y otros casos en los que la expresión y actividad de la hemolisina es normal pero que tienen un crecimiento intracelular inferior al normal, posiblemente relacionado con algún defecto en la expresión o función de la proteína ActA (87). Otros autores también han asociado la virulencia reducida de *L. monocytogenes* con deleciones en el gen *actA* (49). Estos cuatro grupos no están relacionados con ningún linaje ni subtipo particular de *L. monocytogenes* y en conjunto pueden representar del 3 al 5% de los aislamientos de alimentos y de la industria alimentaria (87).

Roche *et al.* (90) han clasificado un conjunto de 26 aislamientos naturales de *L. monocytogenes* con baja virulencia (en cultivos celulares y en ratones) también en cuatro grupos, basados igualmente en la infección de células eucariotas y la actividad de sus fosfolipasas. El grupo I está formado por aislamientos que no entran en las células y no tienen actividad fosfolipasa debido a mutaciones o deleciones del gen *prfA* que dan lugar a las correspondientes proteínas reguladoras inactivas. Los grupos II y III contienen aislamientos que entran en las células pero no forman placas en los cultivos debido, en la mayoría de los casos, a mutaciones en los genes *plcA* (grupo III) o *plcB* (grupo II) que dan lugar a niveles bajos de las correspondientes fosfolipasas. El grupo IV está formado por aislamientos que poseen una virulencia reducida en ratones pero que resultan indistinguibles de las cepas totalmente virulentas empleando los criterios anteriores (90).

A pesar de todos estos resultados, tanto la regulación y la expresión de los numerosos factores de virulencia de *L. monocytogenes*, como la estructura genética de sus poblaciones bacterianas y la diversidad de la población humana susceptible, son elementos de gran complejidad que hacen que la distinción inequívoca de las cepas virulentas y no virulentas de *L. monocytogenes* continúe siendo un reto. La atenuación de la virulencia en *L. monocytogenes* se debe a múltiples mecanismos, por lo que es poco probable que un único método basado en técnicas moleculares, cultivos celulares o ensayos con animales permita diferenciar los aislamientos con los distintos grados de patogenicidad. La combinación de métodos moleculares de alto rendimiento como los *microarrays* (11, 25) con técnicas rápidas y cuantitativas de cultivos celulares (87) es actualmente la tecnología más prometedora para identificar las cepas virulentas de *L. monocytogenes*. A más largo plazo, sería posible identificar determinados aminoácidos fundamentales para la

correcta actividad de las proteínas de virulencia, lo que permitiría la detección de las mutaciones responsables mediante métodos más sencillos, como una PCR multiplex (90).

Dado que *L. monocytogenes* posee una patogenicidad variable, la capacidad de identificar rápidamente la especie (46) y las cepas específicas implicadas en los casos de listeriosis y de evaluar rápidamente su potencial patogénico es un factor crítico para controlar y prevenir la enfermedad (56).

SELECCIÓN DE CEPAS VIRULENTAS EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA

Al analizar la variabilidad de la virulencia de *L. monocytogenes* es importante tener en cuenta, también, el efecto que puede tener la adaptación del patógeno a los diferentes nichos ecológicos sobre la supervivencia y la virulencia de los subtipos asociados con la listeriosis humana cuando están presentes en los alimentos (6).

Los mecanismos de adaptación al estrés provocado por las condiciones ambientales o por el procesado y conservación de los alimentos en la industria (temperaturas extremas, falta de nutrientes, acidez) (71) pueden provocar cambios en la célula bacteriana que, por un lado, dificultan la detección de las células dañadas subletalmente de *L. monocytogenes* (47, 74) y, por otro lado, pueden afectar a la virulencia. *L. monocytogenes* va a encontrar condiciones similares (pH ácido, temperatura elevada, estrés oxidativo) durante su ciclo intestinal y también intracelular (en el fagosoma). Determinados factores causantes de estrés pueden inducir cambios en la virulencia, lo cual se ha comprobado en modelos animales (45). Es posible, por tanto, que algunas tecnologías habitualmente empleadas en la industria alimentaria como la refrigeración, deshidratación, congelación y descongelación, tratamiento con sal, pH ácido, exposición a desinfectantes y otras sustancias antimicrobianas, etc., influyan en el estado fisiológico y en la virulencia de este patógeno, seleccionando subpoblaciones bacterianas resistentes al estrés y más virulentas (50).

La influencia que puedan tener las tecnologías de procesado de alimentos en el aumento de la virulencia o en la selección de cepas virulentas precisa más estudios que aclaren este importante fenómeno (43). Pero tanto si las cepas virulentas de *L. monocytogenes* presentes en las plantas de alimentos proceden de poblaciones seleccionadas por las tecnologías de procesado, como si son poblaciones virulentas que simplemente se solapan con las cepas humanas, es necesario estudiar su trazabilidad para conocer el riesgo real que suponen. En el caso de la listeriosis humana, el papel del laboratorio de microbiología sigue reducido a la detección e identificación de *L. monocytogenes* (46), lo que resulta claramente insuficiente por tratarse de una bacteria ubicua ampliamente distribuida en el ambiente (61) y porque no

permite diferenciar las cepas virulentas de las no virulentas, que probablemente son mayoritarias (16).

El análisis de la virulencia de clones específicos de *L. monocytogenes* aislados de la industria alimentaria podría contribuir a resolver el dilema que plantea la elevada contaminación que causa *L. monocytogenes* a lo largo de la cadena de producción de determinados alimentos, que no va acompañada, afortunadamente, de un elevado número de casos de listeriosis.

De momento, sin embargo, todas las cepas de *L. monocytogenes* se consideran potencialmente patógenas. Los avances futuros en la asociación de determinados marcadores de virulencia con los diferentes grupos genéticos de *L. monocytogenes* permitirán mejorar la evaluación de riesgos de la enfermedad que causa este microorganismo, teniendo en cuenta no sólo la definición de la especie sino también la de los subtipos virulentos.

Agradecimientos: el trabajo en el laboratorio de los autores se financia con los proyectos CAL03-027-C2-1, PTR1995-0789-OP y RTA2005-00202-C02 del Ministerio de Educación y Ciencia (España) y GR/SAL 583-04 de la Comunidad Autónoma de Madrid (España).

BIBLIOGRAFÍA

1. Aguado V, Vitas AI, Garcia-Jalon I. Characterization of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* from a vegetable processing plant by RAPD and REA. *Int J Food Microbiol* 2004; 90: 341-7.
2. Autio T, Hielm S, Miettinen M, Sjoberg AM, Aarnisalo K, Bjorkroth J, et al. Sources of *Listeria monocytogenes* contamination in a cold-smoked rainbow trout processing plant detected by pulsed-field gel electrophoresis typing. *Appl Environ Microbiol* 1999; 65: 150-5.
3. Ayres JS, Schneider DS. Genomic dissection of microbial pathogenesis in cultured *Drosophila* cells. *Trends Microbiol* 2006; 14: 101-4.
4. Barbour A H, Rampling A, Hormaeche CE. Variation in the infectivity of *Listeria monocytogenes* isolates following intragastric inoculation of mice. *Infect Immun* 2001; 69: 4657-60.
5. Bille J, Rocourt J. WHO International Multicenter *Listeria monocytogenes* Subtyping Study - Rationale and set-up of the study. *Int J Food Microbiol* 1996; 32: 251-62.
6. Boerlin P, Piffaretti J C. Typing of human, animal, food, and environmental isolates of *Listeria monocytogenes* by multilocus enzyme electrophoresis. *Appl Environ Microbiol* 1991; 57: 1624-29.
7. Borucki MK, Reynolds J, Gay CC, McElwain KL, Kim SH, Knowles DP, et al. Dairy farm reservoir of *Listeria monocytogenes* sporadic and epidemic strains. *J Food Prot* 2004; 67: 2496-9.
8. Braun L, Dramsi P, Dehoux P, Bierne H, Lindahl G, Cossart P. InlB: an invasion protein of *Listeria monocytogenes* with a novel type of surface association. *Mol Microbiol* 1997; 25: 285-94.
9. Brosch R, Catimel B, Milon G, Buchrieser C, Vindel E, Rocourt J. Virulence heterogeneity of *Listeria monocytogenes* strains from various sources (food, human, animal) in immunocompetent mice and its association with typing characteristics. *J Food Prot* 1993; 56: 296-301.
10. Cai S, Kabuki DY, Kuaye AY, Cargioli TG, Chung MS,

- Nielsen R, *et al.* Rational design of DNA sequence-based strategies for subtyping *Listeria monocytogenes*. *J Clin Microbiol* 2002; 40:3319–25.
11. Call DR, Borucki MK, Besser TE. Mixed-genome microarrays reveal multiple serotype and lineage-specific differences among strains of *Listeria monocytogenes*. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 632-9.
 12. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Preliminary FoodNet data on the incidence of infection with pathogens transmitted commonly through food— 10 States, United States, 2005. *MMWR*. 2006; 55: 392-5.
 13. Chakraborty T, Ebel F, Wehland J, Dufrenne J, Notermans S. Naturally occurring virulence-attenuated isolates of *Listeria monocytogenes* capable of inducing long term protection against infection by virulent strains of homologous and heterologous serotypes. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1994; 10: 1-9.
 14. Chakraborty T, Hain T, Domann E. Genome organization and the evolution of the virulence gene locus in *Listeria* species. *Int J Med Microbiol* 2000; 290: 167-74.
 15. Chen Y, Ross WH, Gray MJ, Wiedmann M, Whiting RC, Scott VN. Attributing risk to *Listeria monocytogenes* subgroups: dose response in relation to genetic lineages. *J Food Prot* 2006; 69: 335-44.
 16. Chen Y, Ross WH, Scott VN, Gombas DE. *Listeria monocytogenes*: low levels equal low risk. *J Food Prot* 2003; 66: 570-7.
 17. Chen Y, Zhang W, Knabel SJ. Multi-virulence-locus sequence typing clarifies epidemiology of recent listeriosis outbreaks in the United States. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 5291-4.
 18. Chico-Calero I, Suarez M, Gonzalez-Zorn B, Scotti M, Slaghuis J, Goebel W, *et al.* Hpt, a bacterial homolog of the microsomal glucose-6-phosphate translocase, mediates rapid intracellular proliferation in *Listeria*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 431–6.
 19. Chiu S, Vanderlinde PB, Dykes GA. A comparison of selected methods for measuring the virulence properties of *Listeria* spp. *Can J Microbiol* 2006; 52: 301-7.
 20. Chou CH, Wang C. Genetic relatedness between *Listeria monocytogenes* isolates from seafood and humans using PFGE and REP-PCR. *Int J Food Microbiol* 2006 [Epub ahead of print]
 21. Conner DE, Scott VN, Summer S, Bernard DT. Pathogenicity of foodborne, environmental and clinical isolates of *Listeria monocytogenes* in mice. *J Food Sci* 1989; 54: 1553-6.
 22. Cossart P, Mengaud J. *Listeria monocytogenes*. A model system for the molecular study of intracellular parasitism. *Mol Biol Med* 1989; 6: 463-74.
 23. Cossart P, Vicente MF, Mengaud J, Baquero F, Perez-Diaz JC, Berche P. Listeriolysin O is essential for virulence of *Listeria monocytogenes*: direct evidence obtained by gene complementation. *Infect Immun* 1989; 57: 3629-36.
 24. Dieterich G, Karst U, Fischer E, Wehland J, Jansch L. LEGER: knowledge database and visualization tool for comparative genomics of pathogenic and non-pathogenic *Listeria* species. *Nucleic Acids Res* 2006; 34: D402-6.
 25. Doumith M, Cazalet C, Simoes N, Frangeul L, Jacquet C, Kunst F, *et al.* New aspects regarding evolution and virulence of *Listeria monocytogenes* revealed by comparative genomics and DNA arrays. *Infect Immun* 2004; 72: 1072-83.
 26. Dussurget O, Pizarro-Cerda J, Cossart P. Molecular determinants of *Listeria monocytogenes* virulence. *Annu Rev Microbiol* 2004; 58: 587-610.
 27. Farber JM, Peterkin PI. *Listeria monocytogenes*, a foodborne pathogen. *Microbiol Rev* 1991; 55: 476-511.
 28. Farber JM, Speirs JI, Pontefract R, Conner DE. Characteristics of nonpathogenic strains of *Listeria monocytogenes*. *Can J Microbiol* 1991; 37: 647-50.
 29. Folsom JP, Siragusa GR, Frank JF. Formation of biofilm at different nutrient levels by various genotypes of *Listeria monocytogenes*. *J Food Prot* 2006; 69: 826-34.
 30. Gendel SM, Ulaszek J. Ribotype analysis of strain distribution in *Listeria monocytogenes*. *J Food Prot* 2000; 63: 179-85.
 31. Gerner-Smidt P, Hise K, Kincaid J, Hunter S, Rolando S, Hyytia-Trees E, *et al.* PulseNet USA: a five-year update. *Foodborne Pathog Dis* 2006; 3: 9-19.
 32. Gilbreth SE, Call JE, Wallace FM, Scott VN, Chen Y, Luchansky JB. Relatedness of *Listeria monocytogenes* isolates recovered from selected ready-to-eat foods and listeriosis patients in the United States. *Appl Environ Microbiol* 2005; 71: 8115-22.
 33. Glaser P, Frangeul L, Buchrieser C, Rusniok C, Amend A, Baquero F, *et al.* Comparative genomics of *Listeria* species. *Science* 2001; 294: 849-52.
 34. Goetz M, Bubert A, Wang G, Chico-Calero I, Vazquez-Boland JA, Beck M, *et al.* Microinjection and growth of bacteria in the cytosol of mammalian host cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 12221-6.
 35. Gonzalez-Zorn B, Dominguez-Bernal G, Suarez M, Ripio MT, Vega Y, Novella S, *et al.* The *smcL* gene of *Listeria ivanovii* encodes a sphingomyelinase C that mediates bacterial escape from the phagocytic vacuole. *Mol Microbiol* 1999; 33: 510-23.
 36. Gonzalez-Zorn B, Dominguez-Bernal G, Suarez M, Ripio MT, Vega Y, Novella S, *et al.* SmcL, a novel membrane-damaging virulence factor in *Listeria*. *Int J Med Microbiol* 2000; 290: 369-74.
 37. Gorski L, Flaherty D, Mandrell RE. Competitive fitness of *Listeria monocytogenes* serotype 1/2a and 4b strains in mixed cultures with and without food in the U.S. *Food and Drug Administration enrichment protocol*. *Appl Environ Microbiol* 2006; 72: 776-83.
 38. Gray MJ, Freitag NE, Boor KJ. How the bacterial pathogen *Listeria monocytogenes* mediates the switch from environmental Dr. Jekyll to pathogenic Mr. Hyde. *Infect Immun* 2006; 74: 2505-12.
 39. Gray MJ, Zadoks RN, Fortes ED, Dogan B, Cai S, Chen Y, *et al.* *Listeria monocytogenes* isolates from foods and humans form distinct but overlapping populations. *Appl Environ Microbiol* 2004; 70: 5833-41.
 40. Grif K, Heller I, Wagner M, Dierich M, Wurzner R. A comparison of *Listeria monocytogenes* serovar 4b isolates of clinical and food origin in Austria by automated ribotyping and pulsed-field gel electrophoresis. *Foodborne Pathog Dis* 2006; 3: 138-41.
 41. Hain T, Steinweg C, Chakraborty T. Comparative and functional genomics of *Listeria* spp. *J Biotechnol* 2006; 126: 37-51.
 42. Hearty S, Leonard P, Quinn J, O'Kennedy R. Production, characterisation and potential application of a novel monoclonal antibody for rapid identification of virulent *Listeria monocytogenes*. *J Microbiol Methods* 2006; 66: 294-312.
 43. ILSI Research Foundation, Risk Science Institute. Achieving continuous improvement in reductions in foodborne listeriosis—a risk-based approach. *J Food Prot* 2005; 68: 1932-94.
 44. Jacquet C, Doumith M, Gordon JI, Martin PM, Cossart P, Lecuit M. A molecular marker for evaluating the pathogenic potential of foodborne *Listeria monocytogenes*. *J Infect Dis* 2004; 189: 2094-100.
 45. Jacquet C, Gouin E, Jeannel D, Cossart P, Rocourt J.

- Expression of ActA, Ami, InlB, and listeriolysin O in *Listeria monocytogenes* of human and food origin. *Appl Environ Microbiol* 2002; 68: 616-22.
46. Jantzen MM, Navas J, Corujo A, Moreno R, López V, Martínez-Suárez JV. Specific detection of *Listeria monocytogenes* in foods using commercial methods: from chromogenic media to real-time PCR. *Span J Agric Res* 2006; 4: 235-47.
 47. Jantzen MM, Navas J, de Paz M, Rodríguez B, da Silva WP, Nuñez M, Martínez-Suárez JV. Evaluation of ALOA plating medium for its suitability to recover high pressure-injured *Listeria monocytogenes* from ground chicken meat. *Lett Appl Microbiol* 2006; 43: 313-7.
 48. Jeffers GT, Bruce JL, McDonough P, Scarlett J, Boor KJ, Wiedmann M. Comparative genetic characterization of *Listeria monocytogenes* isolates from human and animal listeriosis cases. *Microbiology* 2001; 147: 1095-104.
 49. Jiang LL, Xu JJ, Chen N, Shuai JB, Fang WH. Virulence phenotyping and molecular characterization of a low-pathogenicity isolate of *Listeria monocytogenes* from cow's milk. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2006; 38: 262-70.
 50. Kathariou S. *Listeria monocytogenes* virulence and pathogenicity, a food safety perspective. *J Food Prot* 2002; 65: 1811-29.
 51. Kayal S, Charbit A. Listeriolysin O: a key protein of *Listeria monocytogenes* with multiple functions. *FEMS Microbiol Rev* 2006; 30: 514-29.
 52. Khelef N, Lecuit M, Bierne H, Cossart P. Species specificity of the *Listeria monocytogenes* InlB protein. *Cell Microbiol* 2006; 8: 457-70.
 53. Kreft J, Vazquez-Boland JA. Regulation of virulence genes in *Listeria*. *J Med Microbiol* 2001; 291: 145-57.
 54. Larsen CN, Norrung B, Sommer HM, Jakobsen M. *In vitro* and *in vivo* invasiveness of different pulsed-field gel electrophoresis types of *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol* 2002; 68: 5698-703.
 55. Lecuit M, Vandormael-Pournin S, Lefort J, Huerre M, Gounon P, Dupuy C, *et al*. A transgenic model for listeriosis: role of internalin in crossing the intestinal barrier. *Science* 2001; 292: 1722-5.
 56. Liu D. Identification, subtyping and virulence determination of *Listeria monocytogenes*, an important foodborne pathogen. *J Med Microbiol* 2006; 55: 645-59.
 57. Liu D, Lawrence ML, Gorski L, Mandrell RE, Ainsworth AJ, Austin FW. *Listeria monocytogenes* serotype 4b strains belonging to lineages I and III possess distinct molecular features. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 214-7.
 58. López Alonso V, Ortiz Jareño S, Corujo Fernández A, López Abarquero P, Moreno Temprado R, Martínez-Suárez JV. Estudio de los subtipos de *Listeria monocytogenes* de un matadero de pollos mediante electroforesis en campo pulsante. XX Congreso Nacional de Microbiología, 2005, Resumen A-221, Cáceres, España.
 59. López V, Ortiz S, Corujo A, López P, Moreno R, Navas J, Martínez-Suárez JV. Molecular subtyping of *Listeria monocytogenes* from the poultry processing industry by PCR-serotyping, pulsed-field gel electrophoresis, and analysis of the expression of internalin. Second FEMS Congress of European Microbiologists, 2006, abstract P. FOD. 53, Madrid, Spain.
 60. Martinez I, Rorvik LM, Brox V, Lassen J, Seppola M, Gram L, *et al*. Genetic variability among isolates of *Listeria monocytogenes* from food products, clinical samples and processing environments, estimated by RAPD typing. *Int J Food Microbiol* 2003; 84: 285-97.
 61. Marzocca MA, Marucci PL, Sica MG, Alvarez EE. *Listeria monocytogenes* detection in different food products and environmental samples from a large chain of supermarkets in the city of Bahia Blanca (Argentina). *Rev Argent Microbiol* 2004; 36: 179-81.
 62. McLauchlin J. Distribution of serovars of *Listeria monocytogenes* isolated from different categories of patients with listeriosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1990; 9: 210-3.
 63. McLauchlin J, Mitchell RT, Smerdon WJ, Jewell K. *Listeria monocytogenes* and listeriosis: a review of hazard characterisation for use in microbiological risk assessment of foods. *Int J Food Microbiol* 2004; 92: 15-33.
 64. Mead PS, Dunne EF, Graves L, Wiedmann M, Patrick M, Hunter S, *et al*. Nationwide outbreak of listeriosis due to contaminated meat. *Epidemiol Infect* 2005; 1: 1-8.
 65. Meinersmann RJ, Phillips RW, Wiedmann M, Berrang ME. Multilocus sequence typing of *Listeria monocytogenes* by use of hypervariable genes reveals clonal and recombination histories of three lineages. *Appl Environ Microbiol* 2004; 70: 2193-2203.
 66. Mengaud J, Ohayon H, Gounon P, Mege RM, Cossart P. E-cadherin is the receptor for internalin, a surface protein required for entry of *L. monocytogenes* into epithelial cells. *Cell* 1996; 84: 923-32.
 67. Mengaud J, Vicente MF, Cossart P. Transcriptional mapping and nucleotide sequence of the *Listeria monocytogenes hlyA* region reveal structural features that may be involved in regulation. *Infect Immun* 1989; 57: 3695-701.
 68. Mengoni GB, Apraiz PM. Monitoring of a HACCP (Hazard Analysis Critical Control Point) plan for *Listeria monocytogenes* control. *Rev Argent Microbiol* 2003; 35: 224-7.
 69. Miettinen MK, Siitonen A, Heiskanen P, Haajanen H, Bjorkroth KJ, Korkeala HJ. Molecular epidemiology of an outbreak of febrile gastroenteritis caused by *Listeria monocytogenes* in cold-smoked rainbow trout. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 2358-60.
 70. Nadon CA, Woodward DL, Young C, Rodgers FG, Wiedmann M. Correlations between molecular subtyping and serotyping of *Listeria monocytogenes*. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 2704-7.
 71. Navas Fernández J, Monks Jantzen M, Martínez-Suárez JV. Supervivencia de *Listeria monocytogenes* en el procesamiento de alimentos: mecanismos moleculares de la respuesta al estrés. *Alimentaria* 2006; 371: 60-7.
 72. Navas J, Ortiz S, López P, López V, Martínez-Suárez J.V. Presencia frecuente de *Listeria monocytogenes* en hamburguesas comerciales de pollo asociada con bajos recuentos y alta diversidad genética. *Alimentaria* 2006; 373: 90-1.
 73. Navas J, Ortiz S, Lopez P, Lopez V, Martinez-Suarez JV. Influence of enrichment conditions on real-time PCR detection of *Listeria monocytogenes* from naturally contaminated chicken meat. Second FEMS Congress of European Microbiologists, 2006, abstract P. FOD. 67, Madrid, Spain.
 74. Navas J, Ortiz S, Martinez-Suarez JV. Simultaneous detection of *Listeria monocytogenes* in chicken meat enrichments by PCR and reverse-transcription PCR without DNA/RNA isolation. *J Food Prot* 2005; 68: 407-10.
 75. Nelson KE, Fouts DE, Mongodin EF, Ravel J, DeBoy RT, Kolonay JF, *et al*. Whole genome comparisons of serotype 4b and 1/2a strains of the food-borne pathogen *Listeria monocytogenes* reveal new insights into the core genome components of this species. *Nucleic Acids Res* 2004; 32: 2386-95.
 76. Nightingale KK, Windham K, Martin KE, Yeung M, Wiedmann M. Select *Listeria monocytogenes* subtypes commonly found in foods carry distinct nonsense mutations in *inlA*, leading to expression of truncated and secreted internalin A, and are associated with a reduced invasion phenotype for human intestinal epithelial cells. *Appl Environ Microbiol* 2005; 71: 8764-72.
 77. Norton DM, Scarlett M, Horton K, Sue D, Thimothe J, Boor

- KJ, *et al.* Characterization and pathogenic potential of *Listeria monocytogenes* isolates from the smoked fish industry. *Appl Environ Microbiol* 2001; 67: 646-53.
78. Olier M, Rousseaux S, Piveteau P, Lemaitre JP, Rousset A, Guzzo J. Screening of glutamate decarboxylase activity and bile salt resistance of human asymptomatic carriage, clinical, food, and environmental isolates of *Listeria monocytogenes*. *Int J Food Microbiol* 2004; 93: 87-99.
 79. Pine L, Kathariou S, Quinn F, George V, Wenger J, Weaver RE. Cytopathogenic effects in enterocytelike Caco-2 cells differentiate virulent from avirulent *Listeria* strains. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 990-6.
 80. Pinner RW, Schuchat A, Swaminathan B, Hayes P, Deaver K, Weaver R, *et al.* Role of foods in sporadic Listeriosis. II. Microbiologic and epidemiologic investigation. *JAMA* 1992; 267: 2046-50.
 81. Pizarro-Cerda J, Cossart P. Subversion of cellular functions by *Listeria monocytogenes*. *J Pathol* 2006; 208: 215-23.
 82. Pohl MA, Wiedmann M, Nightingale KK. Associations among *Listeria monocytogenes* genotypes and distinct clinical manifestations of listeriosis in cattle. *Am J Vet Res* 2006; 67: 616-26.
 83. Raybourne RB. Virulence testing of *Listeria monocytogenes*. *J AOAC Int* 2002; 85: 516-23.
 84. Ripio MT, Brehm K, Lara M, Suarez M, Vazquez-Boland JA. Glucose-1-phosphate utilization by *Listeria monocytogenes* is PrfA dependent and coordinately expressed with virulence factors. *J Bacteriol* 1997; 179: 7174-80.
 85. Ripio MT, Domínguez-Bernal G, Lara M, Suárez M, Vázquez-Boland JA. A Gly145Ser substitution in the transcriptional activator PrfA causes constitutive overexpression of virulence factors in *Listeria monocytogenes*. *J Bacteriol* 1997; 179: 1533-40.
 86. Ripio MT, Dominguez-Bernal G, Suarez M, Brehm K, Berche P, Vazquez-Boland JA. Transcriptional activation of virulence genes in wild-type strains of *Listeria monocytogenes* in response to a change in the extracellular medium composition. *Res Microbiol* 1996; 147: 371-84.
 87. Roberts A, Chan Y, Wiedmann M. Definition of genetically distinct attenuation mechanisms in naturally virulence-attenuated *Listeria monocytogenes* by comparative cell culture and molecular characterization. *Appl Environ Microbiol* 2005; 71: 3900-10.
 88. Roberts A, Nightingale K, Jeffers G, Fortes E, Kongo JM, Wiedmann M. Genetic and phenotypic characterization of *Listeria monocytogenes* lineage III. *Microbiology*. 2006; 152: 685-93.
 89. Roche SM, Gracieux P, Albert I, Gouali M, Jacquet C, Martin PM, *et al.* 2003. Experimental validation of low virulence in field strains of *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun* 2003; 71: 3429-36.
 90. Roche SM, Gracieux P, Milohanac E, Albert I, Virlogeux-Payant I, Temoin S, *et al.* Investigation of specific substitutions in virulence genes characterizing phenotypic groups of low-virulence field strains of *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol* 2005; 71: 6039-48.
 91. Rocourt J. Risk factors for listeriosis. *Food Control* 1996; 7: 195-202.
 92. Rorvik LM, Caugan DA, Yndestad M. Contamination pattern of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* spp. in a salmon slaughterhouse and smoked salmon processing plant. *Int J Food Microbiol* 1995; 25: 19-27.
 93. Rousseaux S, Olier M, Lemaitre JP, Piveteau P, Guzzo J. Use of PCR-restriction fragment length polymorphism of *inlA* for rapid screening of *Listeria monocytogenes* strains deficient in the ability to invade Caco-2 cells. *Appl Environ Microbiol* 2004; 70: 2180-5.
 94. Ryser ET, Marth EH. *Listeria*, listeriosis, and food safety, New York, Marcel Dekker Inc., 1999.
 95. Sauders BD, Durak MZ, Fortes E, Windham K, Schukken Y, Lembo AJ Jr, *et al.* Molecular characterization of *Listeria monocytogenes* from natural and urban environments. *J Food Prot* 2006; 69: 93-105.
 96. Sauders BD, Mangione K, Vincent C, Schermerhorn J, Farchione CM, Dumas NB, *et al.* Distribution of *Listeria monocytogenes* molecular subtypes among human and food isolates from New York State shows persistence of human disease-associated *Listeria monocytogenes* strains in retail environments. *J Food Prot* 2004; 67: 1417-28.
 97. Scotti M, Lacharme-Lora L, Wagner M, Chico-Calero I, Losito P, Vazquez-Boland JA. Coexpression of virulence and fosfomicin susceptibility in *Listeria*: molecular basis of an antimicrobial *in vitro-in vivo* paradox. *Nat Med* 2006; 12: 515-7.
 98. Sokolovic Z, Riedel J, Wuenscher M, Goebel W. Surface-associated, PrfA-regulated proteins of *Listeria monocytogenes* synthesized under stress conditions. *Mol Microbiol* 1993; 8: 219-27.
 99. Suarez M, Gonzalez-Zorn B, Vega Y, Chico-Calero I, Vazquez-Boland JA. A role for ActA in epithelial cell invasion by *Listeria monocytogenes*. *Cell Microbiol* 2001; 3: 853-64.
 100. Swaminathan B, Barrett TJ, Hunter SB, Tauxe RV, CDC PulseNet Task Force. PulseNet: the molecular subtyping network for foodborne bacterial disease surveillance, United States. *Emerg Infect Dis* 2001; 7: 382-9.
 101. Takeuchi K, Mytle N, Lambert S, Coleman M, Doyle MP, Smith MA. Comparison of *Listeria monocytogenes* virulence in a mouse model. *J Food Prot* 2006; 69: 842-6.
 102. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, *et al.* Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 2233-9.
 103. Thomsen LE, Slutz SS, Tan MW, Ingmer H. *Caenorhabditis elegans* is a model host for *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol* 2006; 72: 1700-1.
 104. Van Langendonck N, Botteaux E, Bailly S, Tabouret M, Marly J, Pardon P, *et al.* Tissue culture assays using Caco-2 cell line differentiate virulent from non-virulent *Listeria monocytogenes* strains. *J Appl Microbiol* 1998; 85: 337-46.
 105. Vázquez-Boland JA, Kocks C, Dramsi S, Ohayon H, Geoffroy C, Mengaud J, *et al.* Nucleotide sequence of the lecithinase operon of *Listeria monocytogenes* and possible role of lecithinase in cell-to-cell spread. *Infect Immun* 1992; 60: 219-30.
 106. Vazquez-Boland JA, Kuhn M, Berche P, Chakraborty T, Dominguez-Bernal G, Goebel W, *et al.* *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14: 584-640.
 107. Wiedmann M. Molecular subtyping methods for *Listeria monocytogenes*. *J AOAC Int* 2002; 85: 524-31.
 108. Yamada F, Ueda F, Ochiai Y, Mochizuki M, Shoji H, Ogawa-Goto K, *et al.* Invasion assay of *Listeria monocytogenes* using Vero and Caco-2 cells. *J Microbiol Methods* 2006; 66: 96-103.
 109. Yeung PS, Zagorski N, Marquis H. The metalloprotease of *Listeria monocytogenes* controls cell wall translocation of the broad-range phospholipase C. *J Bacteriol* 2005; 187: 2601-8.
 110. Zhang W, Jayarao BM, Knabel S.J. Multi-virulence-locus sequence typing of *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol* 2004; 70: 913-20.