

Adhesion capacity and invasion index of *L. monocytogenes* strains isolated from food and clinical cases in Mexico.

Capacidad de adherencia e índice de invasión de cepas de *L. monocytogenes* aisladas de alimentos y casos clínicos en México.

Castañeda-Ruelas, G. M.¹, Salazar-Jiménez, E. P.^{2,3}, Hernández-Chiñas, U.^{2,3}, Eslava-Campos, C.^{2,3}, Chaidez-Quiroz, C.^{4*}

¹Universidad Autónoma de Sinaloa, Facultad de Ciencias Químico Biológicas, Culiacán, Sinaloa, México.

²Universidad Nacional Autónoma de México, Unidad de Investigación Básica y Clínica en Enfermedades Infecciosas, Departamento de Salud Pública/División de Investigación Facultad de Medicina. Ciudad de México, México.

³Unidad de Hemato-Oncología e Investigación Hospital Infantil de México Federico Gómez, Laboratorio de Patogenicidad Bacteriana, Ciudad de México, México.

⁴Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., Laboratorio Nacional para la Investigación en Inocuidad Alimentaria, Coordinación-Culiacán. Culiacán, Sinaloa, México.

Cite this paper/Como citar este artículo: Castañeda-Ruelas, G. M., Salazar-Jiménez, E. P., Hernández-Chiñas, U., Eslava-Campos, C., Chaidez-Quiroz, C. (2019). Adhesion capacity and invasion index of *L. monocytogenes* strains isolated from food and clinical cases in Mexico. *Revista Bio Ciencias* 6(nesp), e456. doi: <https://doi.org/10.15741/revbio.06.nesp.e456>



ABSTRACT

To evaluate the adherence and invasion capacity of different *Listeria monocytogenes* genotypes recovered from food samples and clinical cases in Mexico, and to know the pathogenic relationship between both groups of strains. Thirty strains of *L. monocytogenes* isolated from food (n=23) and clinical cases (n=7) previously typed by serology and pulsed-field gel electrophoresis were evaluated. The virulence phenotype was determined by the adhesion and invasion capacity in HEp-2, HT-29 and Caco-2 cells. The *L. monocytogenes* strains analyzed showed diffuse adherence pattern and cell damage, a marked invasion index associated to the strain (p=0.000), serotype (p=0.018) and genotype (p=0.001), but not regarding to origin (p=0.685) were observed. The 23 strains isolated from food were classified with high (4.3 %), moderate (87.0

Article Info/Información del artículo

Received/Recibido: February 13th 2018.

Accepted/Aceptado: May 30th 2018.

Available on line/Publicado: February 06th 2019.

RESUMEN

Evaluar la capacidad de adherencia e invasión de diferentes genotipos de *Listeria monocytogenes* recuperadas de alimentos y casos clínicos en México, para definir la relación patogénica entre ambos grupos. Se evaluaron 30 cepas de *L. monocytogenes* aisladas de alimentos (n=23) y casos clínicos (n=7) previamente tipificadas por serología y electroforesis en gel de campo pulsado. El fenotipo de virulencia se determinó mediante la capacidad de adherencia e invasión en células HEp-2, HT-29 y Caco-2. Las 30 cepas mostraron un patrón de adherencia difuso con daño celular, y presentaron un índice de invasión significativo asociado a la cepa (p=0.000), serotipo (p=0.018) y genotipo (p=0.001), pero no respecto al origen (p=0.658). Las 23 cepas aisladas de alimentos se clasificaron con fenotipo invasivo alto (4.3 %), moderado (87.0 %) y bajo (8.7 %) según el fenotipo presentado por las cepas clínicas y control. Las características observadas en los dos grupos de cepas estudiadas infieren que *L. monocytogenes* independiente de su procedencia es un microorganismo patógeno con diferente grado de virulencia, y de manera alterna sugiere la participación de

*Corresponding Author:

Cristóbal Chaidez-Quiroz. Laboratorio Nacional para la Investigación en Inocuidad Alimentaria CONACYT. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Coordinación-Culiacán. Carretera a Eldorado km 5.5. Campo el Diez, C.P. 80110 Culiacán, Sinaloa, México. Phone: +52(667)760 5536. Fax: +52(667) 760 5537. E-mail: chaqui@ciad.mx

%) and low (8.7 %) invasion phenotype according to the phenotype presented by clinical and control strains. The characteristics identified in both strain groups infer that *L. monocytogenes* independent of its origin is a pathogen with different virulence degree, and supports the foods participation in the bacteria transmission and listeriosis cases in Mexico.

KEY WORDS

Food, *Listeria monocytogenes*, Listeriosis, Virulence.

Introduction

Listeria monocytogenes is the pathogen responsible for the listeriosis disease that affects human, and it considered a public health problem due to the severity of the diseases and the high mortality rate (20-30 %) that generates in the vulnerable population (Zunabovic *et al.*, 2011). Meningitis, septicemia and abortion are invasive clinical forms of listeriosis, and gastroenteritis is a non-invasive form, both types differ in terms of symptomatology, population, infectious dose and incubation time (Posfay-Barbe & Wald, 2009; Camejo *et al.*, 2011). The main route of infection of the pathogen is by consumption of dairy products with or without pasteurization, sausages, and contaminated vegetables, which leads to listeriosis outbreaks (CDC, 2017; Raheem, 2016).

Given the clinical and epidemiological importance of *L. monocytogenes*, several methods have been implemented for its detection and typing with the intention of accurately defining the strains involved in outbreaks (CDC, 2017), and to identify contamination sources in the food chain. The Center for Disease Control and Prevention (CDC) of the United States of America, based on the detection and typing of *L. monocytogenes*, makes it possible to report annually cases of listeriosis (≈1500) associated with food consumption and mortality rate of 17 % (Scallan *et al.*, 2011). In general, developing countries do not consider mandatory report of the listeriosis, a fact that probably affects the low incidence of the disease (Tod & Notermans, 2011).

Several studies refer the presence of *L. monocytogenes* in foods, and point out the risk they represent in listeriosis foodborne (Adzitey & Huda, 2010). The survival, transmission and pathogenesis of *L. monocytogenes*

los alimentos en la transmisión de la bacteria en los casos de listeriosis en México.

PALABRAS CLAVE

Alimentos, *Listeria monocytogenes*, Listeriosis, Virulencia.

Introducción

Listeria monocytogenes es el patógeno responsable de la listeriosis, enfermedad que afecta al hombre, y considerada un problema de salud pública debido a la severidad de los padecimientos y la alta tasa de mortalidad (20-30 %) que genera en la población vulnerable (Zunabovic *et al.*, 2011). Meningitis, septicemia y aborto son formas clínicas invasivas de la listeriosis, y la gastroenteritis no invasiva, ambos tipos difieren en términos de sintomatología, población, dosis infecciosa y tiempo de incubación (Posfay-Barbe & Wald, 2009; Camejo *et al.*, 2011). La principal vía de infección del patógeno es por consumo de productos lácteos con o sin pasteurización, embutidos, y hortalizas contaminados, lo que da lugar a brotes de listeriosis (CDC, 2017; Raheem, 2016).

Dada la importancia clínica y epidemiológica de *L. monocytogenes*, se han implementado diversos métodos para su detección y tipificación con la intención de definir con precisión las cepas involucradas en brotes (CDC, 2017), y localizar los puntos de contaminación en la cadena alimentaria. El Centro de Prevención y Control de Enfermedades (CDC) de los Estados Unidos de América, basado en la detección y tipificación de *L. monocytogenes*, permite reportar anualmente los casos de listeriosis (≈1500) asociados al consumo de alimentos con una tasa de mortalidad de 17 % (Scallan *et al.*, 2011). En general, los países en desarrollo no consideran obligatorio el reporte de listeriosis, hecho que probablemente repercute en la baja incidencia del padecimiento (Tod & Notermans, 2011).

Existen numerosos estudios que refieren la presencia de *L. monocytogenes* en los alimentos, y señalan el riesgo que estos representan en la listeriosis de origen alimentario (Adzitey & Huda, 2010). La supervivencia, transmisión y patogénesis de *L. monocytogenes* está condicionada por la capacidad de adaptación de la bacteria (Zunabovic *et al.*, 2011; Roberts & Wiedmann, 2003), la naturaleza del alimento (Midelet-Bourdin *et al.*, 2006), y la diversidad entre los serotipos de la especie (Jaradat & Bhunia, 2003). Se asume que los 13 serotipos de *L. monocytogenes* son potencialmente virulentos debido a que

is conditioned by the adaption ability of the bacteria (Zunabovic et al., 2011; Roberts & Wiedmann, 2003), the food composition (Midelet-Bourdin et al., 2006), and the diversity among the serotypes of the species (Jaradat & Bhunia, 2003). It is assumed that the 13 serotypes of *L. monocytogenes* are potentially pathogenic because they possess a chromosomal locus of virulence (*prfA*, *plcA*, *plcB*, *hlyA*, *mpl*, *actA*) called pathogenicity island-1, and invasion genes (Internalinas) required to establish the infective cycle based on adherence, invasion, survival and multiplication within phagocytic and non-phagocytic host cells (Camejo et al., 2011; Vázquez-Boland et al., 2001). However, serotypes 1/2a, 1/2b, and 4b have been identified in most cases of listeriosis (Orsi et al., 2011), so it is important to evaluate whether the strains of food origin independently of the serotype they have certain virulence properties.

Although, in Mexico the presence of *L. monocytogenes* has been reported in various foods (Castañeda-Ruelas et al., 2013; Silva et al., 2007; Vázquez-Salinas et al., 2001; Saltijeral et al., 1999), there are few clinical cases described, probably due to the fact that listeriosis is not a notifiable disease (Castañeda-Ruelas et al., 2014). In 2016, the General Directorate of Epidemiology of Mexico reported 4,476,041 cases of intestinal infections, 25,896 cases of bacterial food poisoning and 628 cases of meningitis, but the etiology of both clinical cases were not defined (DGE, 2018). However, between 1967-2006, some listeriosis cases were reported, which despite the treatment with antibiotics had a mortality rate of 50 % (Espinoza-Gómez et al., 2006; Castrejon-Alba et al., 1997; Kraus et al., 1994), in none of them was the search for the source and strain of *L. monocytogenes* responsible for the infection.

A possible explanation of why in Mexico the relationship between listeriosis and its causal agent is not known, possibly due to failures to establish the clinical diagnosis and therefore the etiological diagnosis. On the other hand, although it has worked on the presence of *L. monocytogenes* in different foods, the information on the isolated strains has been limited to their biochemical identification, so it is not known if they present characteristics that allow establishing the infective cycle in the host. The purpose of the present study was to analyze some virulence properties of strains of *L. monocytogenes* isolated from food and clinical cases, to define the importance of food in the transmission of virulent strains to humans.

poseen un locus cromosomal de virulencia (*prfA*, *plcA*, *plcB*, *hlyA*, *mpl*, *actA*) denominado isla de patogenicidad-1, y genes de invasión (Internalinas) necesarios para establecer el ciclo infectivo basado en adherencia, invasión, sobrevivencia y multiplicación dentro de células fagocíticas y no-fagocíticas del hospedero (Camejo et al., 2011; Vázquez-Boland et al., 2001). Sin embargo, los serotipos 1/2a, 1/2b, y 4b se han identificado en la mayoría de los casos de listeriosis (Orsi et al., 2011), por lo que es importante evaluar si las cepas de origen alimentario independientemente del serotipo presentan ciertas propiedades de virulencia.

Aunque, en México se ha reportado la presencia de *L. monocytogenes* en diversos alimentos (Castañeda-Ruelas et al., 2013; Silva et al., 2007; Vázquez-Salinas et al., 2001; Saltijeral et al., 1999), son pocos los casos clínicos descritos, lo anterior probablemente por el hecho de que la listeriosis no es una enfermedad de declaración obligatoria (Castañeda-Ruelas et al., 2014). En 2016, la Dirección General de Epidemiología de México reportó 4,476,041 casos de infecciones intestinales, 25,896 casos de intoxicación alimentaria bacteriana y 628 casos de meningitis, pero, la etiología de ambos cuadros clínicos no fue definida (DGE, 2018). No obstante, que entre 1967-2006, se reportaron algunos casos de listeriosis, los cuales a pesar del tratamiento con antibióticos tuvieron una tasa de mortalidad del 50 % (Espinoza-Gómez et al., 2006; Castrejon-Alba et al., 1997; Kraus et al., 1994), en ninguno de ellos se realizó la búsqueda de la fuente y la cepa de *L. monocytogenes* responsable de la infección.

Una posible explicación del porqué en México no se conoce la relación entre la listeriosis y su agente causal, posiblemente se debe a fallas para establecer el diagnóstico clínico y por ende el etiológico. Por otro lado, aunque, se ha trabajado sobre la presencia de *L. monocytogenes* en diferentes alimentos, la información sobre las cepas aisladas se ha limitado a su identificación bioquímica por lo que no se sabe si presentan características que permitan establecer el ciclo infectivo en el hospedero. El propósito del presente estudio consistió en analizar algunas propiedades de virulencia de cepas de *L. monocytogenes* aisladas de alimentos y casos clínicos, para definir la importancia de los alimentos en la transmisión de cepas virulentas a los humanos.

Materiales y Métodos

Cepas

Se evaluaron 30 cepas de *L. monocytogenes*, siete

Materials and Methods

Strains

Thirty strains of *L. monocytogenes*, including 7 strains of clinical cases of listeriosis and 23 strains isolated from food (Table 1), previously typed by serotype and pulsed-field gel electrophoresis [PFGE] (Castañeda-Ruelas *et al.*, 2013) were evaluated. Virulence assays included control strains of *L. monocytogenes* ATCC 7644, and *E. coli* pathotypes (EAEC-49766, EPEC-2348/69 and EAEC-O42). A bacterial suspension in sterile phosphate buffer (PBS) of 1.0 ($\approx 3 \times 10^8$ cfu/mL) was standardized on the Macfarland scale.

Cell culture

The cell lines used were CaCo-2 (human colorectal adenocarcinoma cells), HT-29 (human colon adenocarcinoma cells), and HEp-2 (human laryngeal carcinoma cells). CaCo-2 and HT-29 cells were cultured

cepas de casos clínicos de listeriosis y 23 cepas aisladas de alimentos (Tabla 1), previamente tipificadas por serotipo y electroforesis en gel de campo pulsado [PFGE] (Castañeda-Ruelas *et al.*, 2013). Para los ensayos de virulencia se incluyeron las cepas control de *L. monocytogenes* ATCC 7644, y los patotipos de *E. coli* (EAEC-49766, EPEC-2348/69 y EAEC-O42). Se estandarizó una suspensión bacteriana en búfer de fosfato estéril (PBS) de 1.0 ($\approx 3 \times 10^8$ ufc/mL) en la escala Macfarland.

Cultivo de células

Las líneas celulares utilizadas fueron CaCo-2 (células de adenocarcinoma colorrectal humano), HT-29 (células de adenocarcinoma de colon humano), y HEp-2 (células de carcinoma laríngeo humanos). Las células CaCo-2 y HT-29 se cultivaron como monocapas en frascos de 75 cm² con medio Dulbecco Eagle modificado (DMEM) suplementado con suero bovino fetal al 10 % (v/v), aminoácidos no esenciales al 1 % (v/v) y solución de

Table 1.
Description of strains of *L. monocytogenes* isolated from food and clinical cases in Mexico.
Tabla 1.
Descripción de cepas de *L. monocytogenes* aisladas de alimentos y casos clínicos en México.

Genotype	Serotype	Source	Site isolation	Total strains (n=40)
A	4 b	Raw chicken	Sinaloa	1
A	N.D.	Clinical	Mexico	1
C	1/2 c	Raw meat	Sinaloa	2
D	1/2 a	Frankfurters	Sinaloa	7
F	4 b	Raw chicken	Sinaloa	1
G	4 b	Raw chicken	Sinaloa	1
H	4 b	Raw chicken	Sinaloa	2
I	4 b	Raw chicken	Sinaloa	4
J	1/2 b	Raw meat	Sinaloa	1
K	1/2 b	Raw meat	Sinaloa	1
L	1/2 b	Raw meat	Sinaloa	1
M	1/2 b	Raw chicken	Sinaloa	1
N	3 b	Raw meat	Sinaloa	1
X1	N.D.	Clinical	Mexico	1
X3	N.D.	Clinical	Mexico	1
X4	N.D.	Clinical	Mexico	2
X5	N.D.	Clinical	Mexico	1

^aThe genotype was determined by the pulse field gel electrophoresis method.

^aEl genotipo se determinó mediante el método de electroforesis en gel de campo de pulso.

as monolayers in 75 cm² flasks with modified Dulbecco Eagle medium (DMEM) supplemented with 10 % (v/v) fetal bovine serum, 1 % non-essential amino acids (v/v) and 1 % (v/v) antibiotic solution (100 µg/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin). HEp-2 cells were cultured in minimal essential medium (MEM) supplemented with 10 % (v/v) fetal bovine serum, 2 mM L-glutamine, and 1 % (v/v) antibiotics. For the adhesion and invasion assays, the cells were cultured in DMEM and MEM without antibiotics for 24 h. The cells were kept at 37 °C under 5 % CO₂.

Adhesion assay

The adhesion profile was determined using the HEp-2, HT-29 and Caco-2 cell lines, as described by Cravioto *et al.* (1991). In cell culture plates with glass lentils, cell monolayers with 95 % confluence (10⁵ cells/well) were cultured and inoculated with strains of *L. monocytogenes* in multiplicity of infection (MOI) ratio of 10:1. The inoculated plates were incubated at 37 °C for 3 h. The lentils with the infected monolayers were washed with PBS, fixed with methanol, and stained with Giemsa stain. The lentils were examined under the 100x lens with immersion oil in a light microscope. To consider positive the adhesion test, ≥10 bacteria should be counted in the cells contours or surface of the 25 % of the cell monolayers, and the negative control should not show bacteria adhered to the cells. To classify the adherence pattern, control strains EPEC-2348/69, EAEC-49766 and EAEC-O42 were used, which present the localized, aggregative and diffuse pattern, respectively.

Invasion assay

The invasion index was analyzed by the invasion test based on gentamicin in HEp-2 and HT-29 cells as described by Jaradat & Bhunia (2003), with minor modifications. Only those cell lines were selected to evaluate the invasion index of the *L. monocytogenes* strains because it was not considered necessary to use two cell lines of intestinal origin. Briefly, cell monolayer cultures were grown to a confluence of 95 % (10⁵ cells/well), and inoculated with a MOI of 10:1 with the bacterial strains. The inoculated monolayers were incubated at 37 °C for 90 min; after this time, they were washed with PBS, and were further incubated 90 min at 37 °C in DMEM medium supplemented with gentamicin (100 µg/mL) to eliminate the extracellular bacteria. Subsequently, the monolayers were washed with PBS, and the cells were lysed. The quantification of the inoculum and intracellular cells of *L. monocytogenes* was performed in serial dilutions on Oxford agar, and the value was expressed in Log₁₀cfu/mL. The invasion index

antibióticos al 1 % (v/v) (100 µg/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomocina). Las células HEp-2 se cultivaron en medio mínimo esencial (MEM) suplementado con suero bovino fetal al 10 % (v/v), L-glutamina 2 mM, y antibióticos al 1 % (v/v). Para los ensayos de adherencia e invasión, las células se cultivaron en DMEM y MEM sin antibióticos por 24 h. Las células se mantuvieron a 37 °C bajo 5 % de CO₂.

Ensayo de adherencia

El perfil de adherencia se determinó utilizando las líneas HEp-2, HT-29 y Caco-2, como describe Cravioto *et al.* (1991). En placas de cultivo celular con lentejas de vidrio se cultivaron monocapas de células con confluencia del 95 % (10⁵ células/pozo), y se inocularon con las cepas de *L. monocytogenes* en proporción de multiplicidad de infección (MOI) de 10:1. Las placas inoculadas se incubaron a 37 °C durante 3 h. Las lentejas con las monocapas infectadas se lavaron con PBS, se fijaron con metanol, y se tiñeron con tinción Giemsa. Las lentejas se examinaron bajo el lente de 100x con aceite de inmersión en un microscopio de luz. Para considerar positiva la prueba de adherencia se deben contar con ≥10 bacterias adheridas en los contornos o sobre su superficie de las células en el 25 % de la monocapa de células, y que los controles negativos no muestren bacterias adheridas a las células. Para clasificar el patrón de adherencia se utilizaron las cepas control EPEC-2348/69, EAEC-49766 y EAEC-O42 que presentan el patrón localizado, agregativo y difuso, respectivamente.

Ensayo de invasión

El índice de invasión se analizó mediante el ensayo de invasión basado en gentamicina en células HEp-2 y HT-29 según lo descrito por Jaradat & Bhunia (2003), con modificaciones menores. Se seleccionaron solo dichas líneas de células para evaluar el índice de invasión de las cepas de *L. monocytogenes* debido a que no se consideró necesario utilizar dos líneas de células de origen intestinal. Brevemente, se cultivaron en placas de cultivo celular monocapas de células hasta una confluencia del 95 % (10⁵ células/pozo), y se inocularon con un MOI de 10:1 con las cepas bacterianas. Las monocapas inoculadas se incubaron a 37 °C durante 90 min; transcurrido este tiempo se lavaron con PBS, y se incubaron adicionalmente 90 min a 37 °C en medio DMEM suplementado con gentamicina (100 µg/mL) para eliminar las bacterias extracelulares. Posteriormente, las monocapas se lavaron con PBS, y las células fueron lisadas. La cuantificación del inóculo y células intracelulares de *L. monocytogenes*

was calculated by dividing the concentration of internalized bacteria (with gentamicin) by the concentration of the inoculum. The strain of *L. monocytogenes* ATCC 4976 was included as a positive control.

Statistical analysis

The adhesion and invasion tests were performed twice in duplicate for each evaluated strain. For the invasion test, a two-way ANOVA analysis (strains of *L. monocytogenes* and cell type) was performed completely randomly with the Tukey and Dunnet test. Additionally, the Kruskal-Wallis test was performed to determine the association of the invasion index with the categorical variables such origin, serotype and PFGE. A value $p \leq 0.05$ was considered statistically significant (Minitab17).

Results and Discussion

The 30 strains of *L. monocytogenes* analyzed adhered to HT-29, HEP-2 and Caco-2 cells with a diffuse and/or aggregative adherence pattern (Figure 1), suggesting the ability to colonize and initiate their cycle of invasion in the host. A differential adherence pattern was not observed according to the PFGE profile, origin (clinical and alimentary) and/or serotype among the strains. However, the strains showed different levels of adhesion, damage or destruction of the cell monolayer, and the formation of cell-cell extensions (Figure 1).

The capacity of *L. monocytogenes* to invade the HT-29 and HEP-2 cells varied from 0.422-0.865 and from 0.307-0.858, respectively, observing statistical differences between strains ($p=0.000$), cell lines ($p=0.001$), serotype ($p=0.018$) and electrophoretic profile ($p=0.001$), but not with respect to the origin ($p=0.658$). This indicated that the invasion rate of strains of *L. monocytogenes* is observed as a non-stable property. The overall invasion profile expressed by the strains of food origin ($n=23$) was determined with respect to the control strain of *L. monocytogenes* ATCC 4976 previously reported with pathogenic potential (Jaradat & Bhunia, 2003); the majority (87 %) of the strains corresponds to an invasion index similar to the control strain and the strains of clinical origin. However, a strain corresponding to serotype 1/2a (strain 10) presented an invasion phenotype superior to the strain of *L. monocytogenes* ATCC 4976. Meanwhile, isolated from serotypes 4b (strain 116) and 1/2c (strain 101) showed a lower phenotype (Figure 2).

se realizó en diluciones seriales en agar Oxford, y el valor se expresó en Log₁₀cfu/mL. El índice de invasión se calculó dividiendo la concentración de bacterias internalizadas (con gentamicina) entre la concentración del inóculo. La cepa de *L. monocytogenes* ATCC4976 fue incluida como control positivo.

Análisis estadístico

Los ensayos de adherencia e invasión se realizaron dos veces por duplicado para cada cepa evaluada. Para el ensayo de invasión se realizó un análisis ANOVA de dos vías (cepas de *L. monocytogenes* y tipo de células) completamente al azar con la prueba de Tukey y Dunnet. Adicionalmente, se realizó la prueba de Kruskal-Wallis para determinar la asociación del índice de invasión con las variables categóricas origen, serotipo y PFGE. Un valor $p \leq 0.05$ fue considerado estadísticamente significativo (Minitab17).

Resultados y Discusión

Las 30 cepas de *L. monocytogenes* analizadas se adhirieron a las células HT-29, HEP-2 y Caco-2 con un patrón de adherencia difuso y/o agregativo (Figura 1), lo que sugiere la capacidad para colonizar e iniciar su ciclo de invasión en el hospedero. No se observó un patrón de adherencia diferencial de acuerdo con el perfil de PFGE, origen (clínicas y alimentarias) y/o serotipo entre las cepas. Sin embargo, mostraron diferentes niveles de adherencia, daño o destrucción celular de la monocapa y la formación de las prolongaciones célula-célula (Figura 1).

La capacidad de *L. monocytogenes* para invadir las células HT-29 y HEP-2 varió de 0.422-0.865 y de 0.307-0.858, respectivamente, observándose diferencias estadísticas entre cepas ($p=0.000$), líneas celulares ($p=0.001$), serotipo ($p=0.018$) y perfil electroforético ($p=0.001$), pero no respecto al origen ($p=0.658$). Es decir, el índice de invasión de las cepas de *L. monocytogenes* se observa como una propiedad no estable. El perfil de invasión global expresado por las cepas de origen alimentario ($n=23$) se determinó con respecto a la cepa control de *L. monocytogenes* ATCC 4976 previamente reportada con potencial patógeno (Jaradat & Bhunia, 2003); la mayoría (87 %) de las cepas corresponde a un índice de invasión similar a la cepa control y las cepas de origen clínico. No obstante, una cepa correspondiente al serotipo 1/2a (cepa 10) presentó un fenotipo de invasión superior a la cepa de *L. monocytogenes* ATCC 4976. Mientras que, aislados de los serotipos 4b (cepa 116) y 1/2c (cepa 101) mostraron un fenotipo menor (Figura 2).

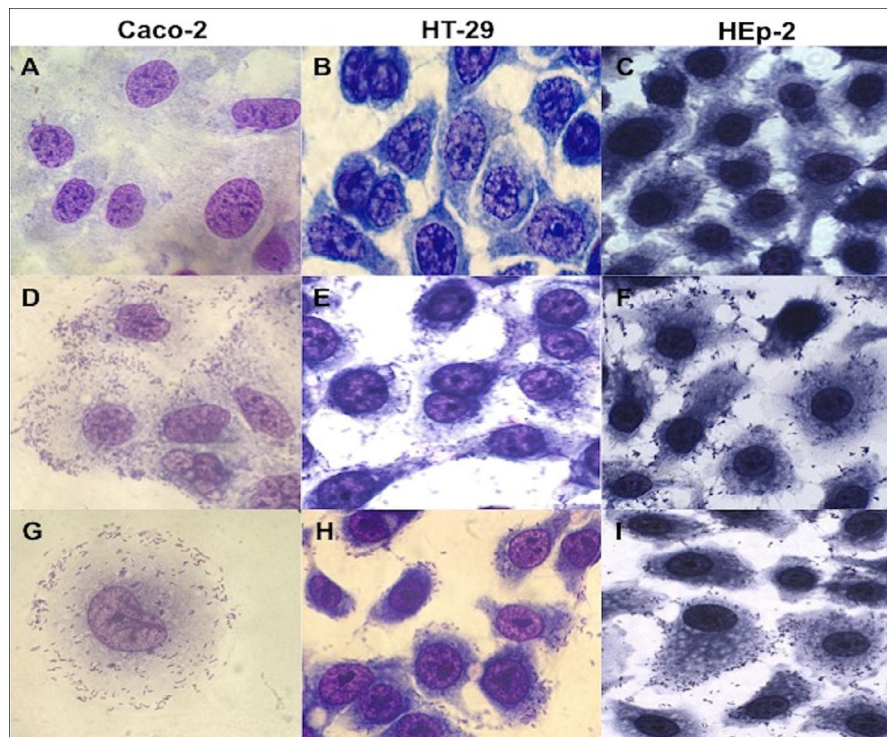


Figure 1. Micrograph of diffuse adherence pattern of *L. monocytogenes* strains in Hep-2, HT-29 and Caco-2 cells. (A) Caco-2 cell lines control, (B) HT-29 cell lines control, (C) HEp-2 cell lines control, (D) serotype 4b in Caco-2 cells, (E) serotype 1/2c in HT-29 cells, (F) serotype 1/2c in HEp-2 cells, (G) clinical strain in Caco-2 cells, (H), serotype 3b in HT-29 cells, (I) serotype 1/2a in HEp-2 cells. Magnification 100x.

Figura 1. Micrografía del patrón de adherencia difusa de cepas de *L. monocytogenes* en células HEp-2, HT-29 y Caco-2. (A) control de células Caco-2, (B) control de células de HT-29, (C) control de HEp-2, (D) serotipo 4b en células Caco-2, (E) serotipo 1/2c en células HT-29, (F) serotipo 1/2b en células HEp-2, (G) cepa clínica en células Caco-2, (H) serotipo 3b en células HT-29, (I) serotipo 1/2a en células HEp-2. Aumento 100x.

The comparative study of the adhesion and invasion phenotype of *L. monocytogenes* strains isolated from food and clinical cases, is the first description in this respect that is made in Mexico. In the literature, it is reported that most cases of listeriosis are linked to serotypes 1/2a, 1/2b and 4b, and their transmission is through food (Orsi *et al.*, 2011). Our study shows that most of the strains of food origin belong to these serotypes with potential pathogenic capacity *in vitro* in cell lines.

To initiate the event of invasion of host cells and ensure the progression of the intracellular cycle of *L. monocytogenes*, adherence is a primordial process (Camejo *et al.*, 2011; Vázquez-Boland *et al.*, 2001). Some studies have quantified the adhesion capacity of *L. monocytogenes*, finding differences in the degree of expression according to the serotype (Jaradat & Bhunia, 2003). However, information on the description of the topology of the host cell infected

El estudio comparativo del fenotipo de adherencia e invasión de cepas de *L. monocytogenes* aisladas de alimentos y casos clínicos, es la primera descripción al respecto que se hace en México. En la literatura se refiere que la mayoría de los casos de listeriosis son vinculados con los serotipos 1/2a, 1/2b y 4b, y que su transmisión es a través de los alimentos (Orsi *et al.*, 2011). Nuestro estudio muestra que la mayoría de las cepas de origen alimentario pertenecen a dichos serotipos con potencial y capacidad patogénica *in vitro* en líneas celulares.

Para iniciar el evento de invasión a las células del hospedero y garantizar la progresión del ciclo intracelular de *L. monocytogenes*, la adherencia es un proceso primordial (Camejo *et al.*, 2011; Vázquez-Boland *et al.*, 2001). Algunos estudios han cuantificado la capacidad de adherencia de *L. monocytogenes*, encontrando diferencias del grado de expresión de acuerdo al serotipo (Jaradat

Strain	Serotype	PFGE	Source	Invasion index		Global invasion index	Phenotype*
				Hep-2	HT-29		
4976	1/2 c	ND	Clinical	0.685	0.478	0.582	
43	ND	A	Clinical	0.812	0.560	0.686	
17	4 b	A	Chicken	0.662	0.525	0.594	
150	1/2 c	C	Beef	0.665	0.593	0.629	
101	1/2 c	C	Beef	0.438	0.437	0.437	
10	1/2 a	D	Frankfurters	0.663	0.787	0.725	
22	1/2 a	D	Frankfurters	0.630	0.684	0.657	
107	1/2 a	D	Frankfurters	0.579	0.707	0.643	
203	1/2 a	D	Frankfurters	0.616	0.612	0.614	
166	1/2 a	D	Frankfurters	0.608	0.590	0.599	
91	1/2 a	D	Frankfurters	0.608	0.561	0.585	
60	1/2 a	D	Frankfurters	0.480	0.585	0.533	
137	4 b	F	Chicken	0.471	0.532	0.502	
186	4 b	G	Chicken	0.547	0.650	0.599	
164	4 b	H	Chicken	0.423	0.581	0.502	
116	4 b	H	Chicken	0.455	0.448	0.451	
21	4 b	I	Chicken	0.673	0.651	0.662	
68	4 b	I	Chicken	0.660	0.517	0.589	
69	4 b	I	Chicken	0.606	0.520	0.563	
117	4 b	I	Chicken	0.566	0.481	0.523	
20	1/2 b	J	Beef	0.604	0.604	0.604	
87	1/2 b	K	Beef	0.634	0.535	0.584	
232	1/2 b	L	Beef	0.632	0.628	0.630	
196	3 b	M	Beef	0.658	0.485	0.572	
211	1/2 b	N	Beef	0.644	0.568	0.606	
47	ND	X1	Clinical	0.642	0.859	0.751	
42	ND	X1	Clinical	0.865	0.439	0.652	
44	ND	X3	Clinical	0.694	0.307	0.500	
48	ND	X4	Clinical	0.680	0.469	0.575	
45	ND	X4	Clinical	0.707	0.355	0.531	
46	ND	X5	Clinical	0.536	0.736	0.636	

Figure 2. Invasion phenotypes of *Listeria monocytogenes* strains isolated from clinical cases and food in Mexico. ^aGlobal invasion phenotype was determined respect to control strain (*L. monocytogenes* ATCC4976); higher (black), similar (gray), and low (white) phenotype. The mean of the invasion phenotypes between the strains are statistically different in the HEP-2 and HT-29 cells ($p < 0.05$). N.D.: Not determined.

Figura 2. Fenotipo de invasión de cepas de *Listeria monocytogenes* aisladas de alimentos y casos clínicos en México. ^aEl fenotipo de invasión promedio se determinó respecto a la cepa control *L. monocytogenes* ATCC4976 en las células HEP-2 y HT-29; fenotipo alto (negro), fenotipo similar (gris), y fenotipo bajo (blanco). La media de los fenotipos de invasión entre las cepas es estadísticamente diferente en las células HEP-2 y HT-29 ($p < 0.05$). N.D.: No determinado.

with *L. monocytogenes* is scarce. In this study it was identified that the strains of *L. monocytogenes* present a diffuse adherence pattern similar to that described in *E. coli* (Nataro & Kaper, 1998), which showed no relation with the serotype and origin of the bacteria or with the cell epithelial assays.

In the model of polarized epithelial cells it has been observed that the invasion of the pathogen is carried out by a basolateral adhesion, which is the result of the interaction

& Bhunia, 2003). Sin embargo, la información sobre la descripción de la topología de la célula hospedera infectada por *L. monocytogenes* es escasa. En este estudio se identificó que las cepas de *L. monocytogenes* presentan un patrón de adherencia difusa similar al descrito en *E. coli* (Nataro & Kaper, 1998), el cual no mostró relación con el serotipo y el origen de las bacterias ni con las células epiteliales ensayadas.

En el modelo de células epiteliales polarizadas se ha observado que la invasión del patógeno se realiza mediante una

between the bacterial surface proteins (Internalinas) and the E-cadherin protein that surrounds the junctions of the host cell (Pentecost *et al.*, 2006). In this sense, the diffuse phenotype of the evaluated strains is related to this description, and to the influence of the bacteria on the type of host cell infected when showing cell damage and cell-cell extensions. *L. monocytogenes* can cause cellular damage due to the invasion effect or potential toxins production, both pathogenic properties characteristic of the bacteria (Camejo *et al.*, 2011; Pentecost *et al.*, 2006; Vázquez-Boland *et al.*, 2001). Scalestky *et al.* (2002) described the presence of different adhesion phenotypes and their relationship with the clinical manifestations induced by *E. coli*, which is a highly diversified microorganism, a fact that contrasts with that observed with *L. monocytogenes* that does not present differential adhesion phenotypes.

Previously in Mexico, Vázquez-Salinas *et al.* (2001) identified isolated strains of food with serotypes 4 and 1/2, which in a murine model were identified as non-virulent and virulent bacteria, respectively. In contrast, in the present study when evaluating the invasion degree of the food origin strains, it was observed differences between strains/serotypes/PFGE analysis, which allows to conclude that the virulence of *L. monocytogenes* is an individual property that varies between the different strains. In this sense, some studies have described the non-relationship of the invasion degree with the expression of adhesion or hemolysis of *L. monocytogenes* strains and/or serotypes (Jaradat & Buhnia, 2003). Rychli *et al.* (2014) point out that genomes of different strains of *L. monocytogenes* maintain a similar group of genes of functional virulence (pathogenicity-1 island) allowing the infective cycle, but, distinctive virulence genes of each strain reflect the virulence magnitude. Additionally, greater affinity of *L. monocytogenes* was observed by HT-29 cells, this could be attributed to the intestinal origin of the cells and the ability of the pathogen to cause gastrointestinal diseases (Posfay-Barbe & Wald, 2009).

According to other studies, our results confirmed that *L. monocytogenes* independent of its origin are pathogens with different virulence, and that this may be conditioned by the serotype or its genetic profile (Indrawattana *et al.*, 2011; Larsen *et al.*, 2002). Information in this regard indicates that some strains of *L. monocytogenes*

adherencia basolateral, lo cual es resultado de la interacción entre las proteínas de superficie bacteriana (Internalinas) y la proteína E-cadherina que rodea las uniones de la célula hospedera (Pentecost *et al.*, 2006). En este sentido, el fenotipo difuso de las cepas evaluadas se relaciona con esta descripción, y con la influencia de la bacteria sobre la tipología de la célula hospedera infectada al mostrar daño celular y las prolongaciones célula-célula. *L. monocytogenes* puede ocasionar daño celular por efecto de la invasión o por la potencial capacidad de producir toxinas, ambas propiedades patogénicas características de la bacteria (Camejo *et al.*, 2011; Pentecost *et al.*, 2006; Vázquez-Boland *et al.*, 2001). Scalestky *et al.* (2002) describieron la presencia de diferentes fenotipos de adherencia y su relación con las manifestaciones clínicas inducida por *E. coli* que es un microorganismo altamente diversificado, hecho que contrasta con lo observado con *L. monocytogenes* que no presenta fenotipos de adherencia diferenciales.

Previamente en México, Vázquez-Salinas *et al.* (2001) identificó cepas aisladas de alimentos con serotipo 4 y 1/2 que en un modelo murino se identificaron como bacterias no virulentas y virulentas, respectivamente. En contraste, en el presente estudio al evaluar el grado de invasión de las cepas de origen alimentario se observaron diferencias al hacer el análisis entre cepas/serotipos/PFGE, lo que permite concluir que la virulencia de *L. monocytogenes* es una propiedad individual que varía entre las diferentes cepas. En este sentido, algunos estudios han descrito la no relación del grado de invasión con la expresión de adherencia o hemólisis de cepas y/o serotipos de *L. monocytogenes* (Jaradat & Buhnia, 2003). Rychli *et al.* (2014) señalan que genomas de diferentes cepas de *L. monocytogenes* mantienen un grupo similar de genes de virulencia funcional (isla de patogenicidad-1) permitiendo el ciclo infectivo, pero, con genes de virulencia distintivos de cada cepa que reflejan la magnitud de su virulencia. Adicionalmente, se observó mayor afinidad de *L. monocytogenes* por las células HT-29, esto podría atribuirse al origen intestinal de las células y la capacidad del patógeno para causar enfermedades gastrointestinales (Posfay-Barbe & Wald, 2009).

De acuerdo con otros estudios, nuestros resultados confirmaron que *L. monocytogenes* independiente de su procedencia son patógenos con diferente grado de virulencia, y que esta puede estar condicionada por el serotipo o su perfil genético (Indrawattana *et al.*, 2011; Larsen *et al.*, 2002). La información al respecto refiere que algunas cepas de *L. monocytogenes* aisladas de alimentos pueden tener

isolated from food may have a limited human-pathogen potential (Roberts *et al.*, 2005), and that in certain cases it depends on the matrix and storage temperature of the food (Midelet-Bourdin *et al.*, 2006), or it is related to additional molecular factors that contribute to the pathogenic cycle (Roberts & Wiedmann, 2003). Although, with some differences due to the invasive capacity observed in the food source and clinical strains, the participation of food as a source of transmission of potentially pathogenic *L. monocytogenes* clones responsible for Listeriosis in Mexico may be proposed.

Conclusions

In Mexico, *L. monocytogenes* is not a pathogen of mandatory diagnosis in suspected clinical cases. However, there are reports of sporadic cases and studies that support the prevalence of the pathogen in food. Our results showed that most serotypes of *L. monocytogenes* isolated from food have the ability to adhere to and invade host cells similar to the behavior of clinical strains, and that food represents a major route of transmission. Given this, there is a need to implement measures to carry out stricter control of food, through the intentional search for *L. monocytogenes* as a foodborne pathogen in Mexico. On the other hand, it is important to ask the doctors that in the clinical cases of abortions or neurological problems in which the diagnosis is not established, it is convenient to consider the possible participation of the bacteria. The molecular studies of the bacteria are shown as a promising possibility, to develop systems for rapid identification and to learn more about the genomics of the microorganism.

Acknowledgment

We appreciate the technical support of the QFB. Celida Martínez-Rodríguez affiliated to the National Laboratory for Food Safety Research CONACyT-CIAD Culiacán, and the Bacterial Pathogenicity Laboratory, Hemato-Oncology Unit and Research Children's Hospital of Mexico Federico Gómez.

Referencias

Adzitey, F. & Huda, N. (2010). *Listeria monocytogenes* in foods: incidences and possible control measures. *African Journal of Microbiology Research*, 4(25): 2848-2855. <http://www.academicjournals.org/journal/AJMR/article-full-text-pdf/7A1422817340>

un potencial humano-patógeno limitado (Roberts *et al.*, 2005), y que en ciertos casos depende de la matriz y temperatura de almacenamiento del alimento (Midelet-Bourdin *et al.*, 2006), o se relaciona con factores moleculares adicionales que contribuyen al ciclo patogénico (Roberts & Wiedmann, 2003). Aunque, con algunas diferencias por la capacidad invasiva observada en las cepas origen alimentario y las clínicas se puede proponer la participación de los alimentos como fuente de transmisión de clones de *L. monocytogenes* potencialmente patogénicos y responsables de la Listeriosis en México.

Conclusiones

En México *L. monocytogenes* no es un patógeno de diagnóstico obligatorio en los casos clínicos sospechosos. Sin embargo, hay informes de casos esporádicos y estudios que sustentan la prevalencia del patógeno en los alimentos. Nuestros resultados mostraron que la mayoría de los serotipos de *L. monocytogenes* aislados de alimentos tienen la capacidad de adherirse e invadir las células hospederas similar al comportamiento de las cepas clínicas, y que los alimentos representan una vía principal de transmisión. Ante esto surge la necesidad de implementar medidas para realizar un control más estricto en los alimentos, mediante la búsqueda intencional de *L. monocytogenes* como patógeno de transmisión alimentaria en México. Por otro lado es importante plantear a los médicos que en los casos clínicos de abortos o problemas neurológicos en los que no se establezca el diagnóstico, es conveniente considerar la posible participación de la bacteria. Los estudios moleculares de la bacteria se muestran como una posibilidad promisoriosa, para desarrollar sistemas para su identificación rápida y para conocer más sobre la genómica del microorganismo.

Agradecimientos

Agradecemos el apoyo técnico de la QFB. Celida Martínez-Rodríguez adscrita al Laboratorio Nacional para la Investigación en Inocuidad Alimentaria CONACyT-CIAD Culiacán, y Laboratorio de Patogenicidad Bacteriana, Unidad de Hemato-Oncología e Investigación Hospital Infantil de México Federico Gómez.

- Camejo, A., Carvalho, F., Reis, O., Leitão, E., Sousa, S. and Cabanes, D. (2011). The arsenal of virulence factors deployed by *Listeria monocytogenes* to promote its cell infection cycle. Review. *Journal Virulence* 2(5): 379-394. <http://doi.org/10.4161/viru.2.5.17703>
- Castañeda-Ruelas, G., Castro-del-Campo, N., León, J., Valdez, J., Guzmán-Uriarte, R., Luchansky, J., Porto-Fett, A. C. S., Shoyer, B. A. and Chaidez, C. (2013). Prevalence, levels, and relatedness of *Listeria monocytogenes* isolated from raw and ready-to-eat foods at retail markets in Culiacan, Sinaloa, Mexico. *Journal of Microbiology Research* 3(2): 92-98. <http://article.sapub.org/10.5923.j.microbiology.20130302.06.html>
- Castañeda-Ruelas, G., Eslava-Campos, C., Castro-del-Campo, N., León-Félix, J. and Chaidez-Quiroz, C. (2014). Listeriosis en México: importancia clínica y epidemiológica. *Salud Publica de México*, 56: 1-6. <http://saludpublica.mx/index.php/spm/article/view/7393/10271>
- Castrejón-Alba, M., Mateo-Balmelli, T. and Pérez-Miravete, A. (1997). Meningoencefalitis por *Listeria monocytogenes* en niños inmunocomprometidos. *Boletín Médico del Hospital Infantil de México*, 54(2): 76-80. http://www.imbiomed.com/1/1/articulos.php?method=showDetail&id_articulo=12607&id_seccion=134&id_ejemplar=1300&id_revista=20
- CDC. (Centro de Enfermedades Contagiosas). (2017) *Listeria* outbreaks. <https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/index.html> Last checked: January 10th 2018.
- Cravioto, A., Tello, A., Navarro, A., Ruiz, J., Villafan, H., Uribe, F. and Eslava, C. (1991) Association of *Escherichia coli* HEp-2 adherence patterns with type and duration of diarrhoea. *The Lancet*, 2: 262-264. [http://doi.org/10.1016/0140-6736\(91\)90868-P](http://doi.org/10.1016/0140-6736(91)90868-P)
- DGE (Dirección General de Epidemiología). (2018). Sistema Nacional de Epidemiología. Sistema Único de Información. *Boletín Epidemiológico* http://187.191.75.115/anuario/2016/morbilidad/nacional/distribucion_casos_nuevos/enfermedad_fuente_notificacion.pdf Last checked: January 30th 2018.
- Espinoza-Gómez, F., Newton, O., Melnikov, V. and Pinzón, L. (2006). Peritonitis bacteriana espontánea por *Listeria monocytogenes*, en un paciente con cirrosis hepática caso clínico. *Revista Médica de Chile*, 134: 1171-1174. <http://doi.org/10.4067/S0034-98872006000900013>
- Indrawattana, N., Nibaddhasobon, T., Sookrung, N., Chongsa-Nguan, M., Tungtrongchitr, A., Makino, S., Tungyong, W. and Chaimcumpa, W. (2011). Prevalence of *Listeria monocytogenes* in raw meats marketed in Bangkok and characterization of the isolates by phenotypic and molecular methods. *Journal of Health, Population and Nutrition*, 29(1): 26-38. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3075055/>
- Jaradat, Z. & Bhunia, A. (2003) Adhesion, invasion, and translocation characteristics of *Listeria monocytogenes* serotypes in Caco-2 cell and mouse models. *Applied Environmental Microbiology*, 69: 3640-3645. <http://doi.org/10.1128/AEM.69.6.3640-3645.2003>
- Kraus, A., Cabral, A., Sifuentes-Osornio, J. and Alarcón-Segovia, C. (1994). Listeriosis in patients with connective tissue diseases. *Journal of Rheumatology*, 21(4): 635-638. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8035385>
- Larsen, C., Nørrung, B., Sommer, H. and Jakobsen, M. (2002) *In vitro* and *in vivo* invasiveness of different pulsed-field gel electrophoresis types of *Listeria monocytogenes*. *Applied of Environmental Microbiology*, 68: 5698-5703. <http://doi.org/10.1128/AEM.68.11.5698-5703.2002>
- Midelet-Bourdin, G., Leleu, G., Copin, S., Roche, S. M., Velge, P. and Malle, P. (2006). Modification of a virulence-associated phenotype after growth of *Listeria monocytogenes* on food. *Journal of Applied Microbiology*, 10: 300-308. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.02925.x>
- Nataro, J. B. & Kaper J. P. (1998) Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Review*, 11(1): 142-201. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC121379/>
- Orsi, R., den-Bakker H. and Wiedmann, M. (2011). *Listeria monocytogenes* lineages: Genomics, evolution, ecology, and phenotypic characteristics. *International Journal of Medical Microbiology* 301: 79-96. <http://doi.org/10.1016/j.ijmm.2010.05.002>
- Pentecost, M., Otto, G., Theriot, J. and Amieva, M. (2006). *Listeria monocytogenes* invades the epithelia junctions at sites of cell extrusion. *PLoS Pathogens*, 2: 29-40. <http://doi.org/10.1371/journal.ppat.0020003>
- Posfay-Barbe, K. & Wald, E (2009). Listeriosis. *Seminars Fetal and Neonatal Medicine* 14:228-233. <http://doi.org/10.1016/j.siny.2009.01.006>

- Raheem, D. (2016). Outbreaks of listeriosis associated with deli meats and cheese: an overview. *AIMS Microbiol*, 2(3): 230-250. <http://doi.org/10.3934/microbiol.2016.3.230>
- Roberts, A., Chan, Y. and Wiedmann, M. (2005). Definition of genetically distinct attenuation mechanisms in naturally virulence-attenuated *Listeria monocytogenes* by comparative cell culture and molecular characterization. *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 3900-3910. <http://doi.org/10.1128/AEM.71.7.3900-3910.2005>
- Roberts, A. & Wiedmann, M. (2003). Pathogen, host, and environmental factors contributing to the pathogenesis of listeriosis. *Cellula and Molecular Life Science*, 60: 904-918. <https://doi.org/10.1007/s00018-003-2225-6>
- Rychli, K., Müller, A., Zaiser, A., Schoder, D., Allerberger, F., Wagner, M. and Schmit-Esser, S. (2014). Genome sequencing of *Listeria monocytogenes* "Quargel" listeriosis outbreak strains reveals two different strains with distinct in vitro virulence potential. *PLoS ONE*, 9: e89964. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0089964>
- Saltijeral, J., Alvarez, V. and García, B. (1999). Presence of *Listeria* in Mexican cheeses. *Journal of Food Safety*, 19: 241-247. <http://doi.org/10.1111/j.1745-4565.1999.tb00249.x>
- Scaletsky, C. A., Fabbriotti, S. H., Silva, S. O. C., Morais, M. B. and Fagundes-Neto, U. (2002). Hep-2 adherent *Escherichia coli* strains associated to with acute infantile diarrhea. *Emerging Infection Diseases*, 8: 855-858. <http://doi.org/10.3201/eid0808.010492>
- Scallan, E., Griffin, P., Angulo, F., Tauxe, R., Widdowson, M., Roy, S., Jones, J. L. and Griffin, P. M. (2011). Foodborne illness acquired in the United States. *Emerging Infectious Diseases*, 17(1): 7-15. <http://doi.org/10.3201/eid1701.P11101>
- Silva, L., Pérez, C., Barreras, A. and Figueroa, F. (2007) Identification of *Listeria spp.* In frankfurters products exhibited for sale. *Journal of Animal Veterinary Advance*, 6(3): 314-316. <http://docsdrive.com/pdfs/medwelljournals/javaa/2007/314-316.pdf>
- Todd, E.C.D. & Notermans, S. (2011). Surveillance of listeriosis and its causative pathogen, *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, 22(9), 1484–1490. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.07.021>
- Vázquez-Boland, J., Khun, M., Berche, P., Chakraborty, T., Domínguez-Bernal, G., Goebel, W., González-Zorn, B., Wehland, J. and Kreft, J. (2001). *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clinical Microbiology Review*, 14: 584-640. <http://doi.org/10.1128/CMR.14.3.584-640.2001>
- Vázquez-Salinas, C., Rodas-Suárez, O. and Quiñonez-Ramírez, E. (2001) Occurrence of *Listeria* species in raw milk in farms on the outskirts of Mexico city. *Food Microbiology*, 18: 177-181. <http://doi.org/10.1006/fmic.2000.0389>
- Zunabovic, M., Domig, K. J. and Kneifel, W. (2011) Practical relevance of methodologies for detecting and tracing of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods and manufacture environments – A review. *LWT - Food Science and Technology*, 44: 351-362. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.08.005>