

ISBN : 978-602-96450-0-2

*PROCEEDING*  
**Seminar Nasional Farmasi**  
**TAHUN 2010**



TEMA

**IMUNOMODULATOR  
DAN PERKEMBANGANNYA**

(Manfaat dan Bahayanya)

Semarang, 15 Mei 2010



**DIES NATALIS KE-10  
STIFAR "YAYASAN PHARMASI"  
SEMARANG**



## **ALLIUM SATIVUM L. SEBAGAI IMUNOMODULATOR MELAWAN INFEKSI BAKTERI LISTERIA MONOCYTOGENES PADA TIKUS BALB/C**

**Endang Sawitri**

*Fakultas Kedokteran Universitas Mulawarman, Samarinda*

### **ABSTRACT**

**Background:** Allium sativum L. already commonly used in many countries to treat various ailments. While having a bioactive component that serves as an immunomodulator to destroy bacteria, but efficacy was to kill intracellular bacteria has not been widely studied.

**Objective:** To evaluate the effects of A.sativum extract on the ability of macrophage phagocytosis and survival of induced L.monocytogenes Balb/C mice.

**Methods:** The study used 72 Balb / C 8-10 weeks-old healthy females who adapted a week, then divided into two major groups. Group I was divided four groups each containing six mice. K: control, P1: given 1mg A.sativum extract, P2: 2mg, P3: 4mg / day orally for 14 days. Day 9 all of mice were induced L.monocytogenes  $5 \times 10^6$  CFU intravenously, day 14 was terminated for measure work of macrophages. Group II was divided four groups of equal size and are treated the same as group I for observe the survival until day 21 post treatment.

**Results:** A.sativum extract in varying doses increased phagocytic index of macrophage significantly ( $p = 0.002$ ), the highest capacity at P3 ( $7.5 \pm 0.7$ ). Survival rate was also increased at P1 (66.7%), P2 and P3 (75%). Significant differences between the P2 and P3 when compared to K ( $p = 0.0125$  and  $p = 0.0208$  respectively).

**Conclusion:** A.sativum extract function as immunostimulant because it can increase the ability of macrophage phagocytosis and survival in Balb / C mice infected L.monocytogenes.

**Keywords:** A.sativum, macrophage phagocytosis, survival, Balb / C, L.monocytogenes

### **PENDAHULUAN**

Banyak negara maju telah membuktikan melalui penelitian ilmiah bahwa beberapa tanaman obat tradisional mempunyai aktivitas stimulasi non-spesifik terhadap sistem imun, bersifat sebagai imunomodulator dan telah digunakan sebagai bahan fitoterapi (Ma'at, 1996). Imunomodulator tidak menyebabkan terjadinya respons imun seluler maupun humoral atau bukan merupakan suatu antigen, melainkan menyebabkan modulasi pada sistem imun berupa stimulasi atau supresi baik terhadap respons imun yang spesifik maupun yang non-spesifik. Dengan demikian imunomodulator mempunyai aspek terapi khusus yang berkaitan dengan mekanisme sistem imun sehingga dapat digunakan untuk terapi terhadap penyakit-penyakit yang berkaitan dengan sistem imun seperti penyakit infeksi, keganasan dan gangguan fungsi

sistem imun. Kelemahan obat-obatan imunomodulator adalah sebagian besar tidak bekerja secara spesifik (Elgert, 1996; Abbas, *et al.*, 2001; Janeway, *et al.*, 2001).

*Allium sativum L.* (bawang putih) merupakan salah satu tanaman tradisional yang sudah diketahui manfaatnya dalam mengobati berbagai penyakit yang ringan. Berbagai hasil penelitian membuktikan bahwa ekstrak *A. sativum* mempunyai aktivitas sebagai anti bakteri, anti virus, anti parasitik, anti jamur dan anti tumor (Fulder, *et al.*, 1995; Nagourney, 1998; Kemper, 2000). Di Indonesia meskipun tanaman ini sudah bukan barang asing lagi, namun aplikasinya untuk suatu penyakit tertentu terutama sebagai imunomodulator (imunostimulan) dalam mengatasi infeksi khususnya yang disebabkan oleh bakteri intraseluler, misalnya *Listeria monocytogenes* yang didukung data ilmiah masih jarang dilaporkan.

Induksi infeksi memakai *L. monocytogenes* banyak dijadikan model untuk mempelajari infeksi bakteri intraseluler. Patofisiologi Listeriosis pada manusia dan hewan masih sedikit sekali dipahami. Informasi hanya berasal dari interpretasi epidemiologik, klinik dan penemuan histopatologik serta pengamatan infeksi secara eksperimental pada hewan coba terutama mencit. Derajat dan angka progresi dari penyakit selain ditentukan oleh faktor risiko, jumlah bakteri yang termakan dan tingkat virulensi kuman, juga sangat dipengaruhi oleh tingkat imunitas dan *survival* individual pejamu (Cossart and Lecuit, 1998; Badovinac and Harty, 2000; Abbas, *et al.*, 2001; Vasquez-Boland, *et al.*, 2001). Untuk penyakit yang sering mematikan seperti ini, keluaran dapat ditunjukkan sebagai kasus kematian atau angka ketahanan hidup (*survival rate*). Sebagai bakteri intraseluler fakultatif, *L. monocytogenes* mampu bertahan hidup dan mengadakan replikasi di dalam makrofag sekaligus menghindari mekanisme bakterisidal makrofag. Oleh sebab itu untuk eliminasi dibutuhkan mekanisme imun yang sangat berbeda dari mekanisme pertahanan melawan bakteri ekstrasel. Respons imun protektif utama melawan patogen ini adalah imunitas seluler (Cossart and Lecuit, 1998; Badovinac and Harty, 2000).

Penggunaan obat-obatan berbasis dasar alami saat ini sejalan dengan gerakan *back to nature* yang saat ini marak di negara maju. Kelemahan obat-obatan berbasis alami terutama di Indonesia adalah kurangnya uji klinis yang mendukung efikasi obat tersebut. Khasiatnya sebagian besar hanya terbukti secara empiris. Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan apakah ekstrak *A.sativum* dapat berfungsi sebagai imunomodulator (imunostimulan) melawan infeksi bakteri intraseluler. Imunogen *L.monocytogenes* dipilih sebagai model yang diinfeksi kepada mencit Balb/C secara *in vivo* kemudian dievaluasi imunitasnya dengan mengukur kemampuan fagositosis makrofag dan ketahanan hidup (*survival*).

#### METODE PENELITIAN

Jenis penelitian ini adalah eksperimental laboratorik menggunakan mencit Balb/C betina sehat, berumur 8-10 minggu (20-30 gram) yang diperoleh dari Lembaga Pengembangan Hewan Percobaan (LPHP) UGM Yogyakarta. Ekstrak *A.sativum* dibuat dari biji bawang putih segar yang diekstraksi menggunakan metode HPLC terstandarisasi. Bakteri *L.monocytogenes* diperoleh dari Balabkesda Kota Semarang.

Sebanyak 72 ekor mencit diadaptasikan selama 1 minggu, kemudian dibagi secara acak menjadi 2 kelompok besar. Kelompok I terdiri dari 4 kelompok kecil yang masing-masing berisi 6 ekor mencit. Kelompok K= kontrol, P1: diberi ekstrak *A.sativum* 1mg/hari, P2 = diberi ekstrak *A.sativum* 2 mg/hari ; P3 = diberi ekstrak *A.sativum* 4 mg/hari, semuanya secara oral selama 14 hari. Pada hari ke-9 semua mencit diinduksi dengan *L.monocytogenes*  $5 \times 10^6$  CFU 1 kali secara intravena dan hari ke-15 diterminasi untuk mengukur kerja makrofag. Cara isolasi makrofag dari cairan peritoneum dan pengukuran kemampuan fagositosisnya yang dinyatakan sebagai indeks fagositik sesuai dengan Coligan, *et al.*, 1991 dan Johan, *et al.*, 2000. Kelompok II berisi 48 ekor, dibagi menjadi 4 kelompok sama besar dan mendapat perlakuan yang sama dengan kelompok I. Ketahanan hidup (*survival*) mencit dinilai

berdasarkan lamanya mencit bertahan hidup dalam masing-masing kelompok, sejak awal pengamatan (hari pertama pasca infeksi) sampai akhir periode penelitian (hari ke-21 pasca infeksi) dan dinyatakan dalam persentase *survival rate*.

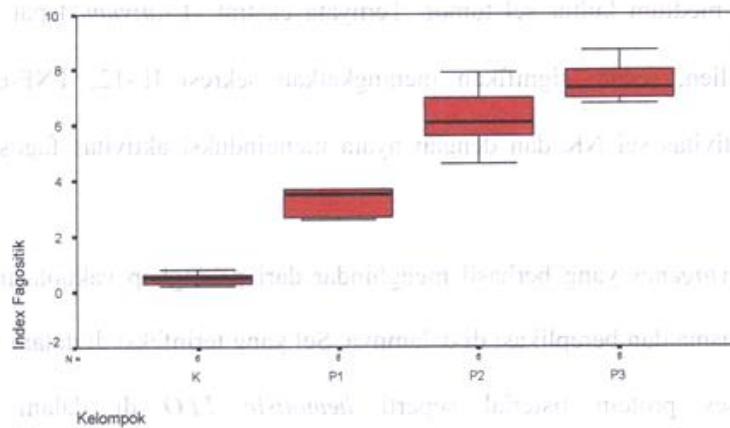
## HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

### Kemampuan Fagositosis Makrofag

Hasil penelitian menunjukkan bahwa nilai rerata indeks fagositik (Tabel 1) tertinggi terdapat pada kelompok P3 (mendapat ekstrak *A.sativum* 4 mg/hari), mencapai  $7,5 \pm 0,7$ . Sedangkan nilai rerata terendah didapatkan pada kelompok kontrol (K), yaitu  $0,5 \pm 0,2$ . Hasil uji *Mann-Whitney U* menunjukkan bahwa semua kelompok perlakuan apabila dibandingkan dengan K, maka indeks fagositiknya berbeda sangat signifikan ( $p=0,002$ ). Grafik *boxplot* (Gambar 1) memperlihatkan perbedaan median indeks fagositik makrofag antara K dengan perlakuan dan semakin tinggi dosis semakin tinggi kemampuan fagositosis makrofagnya, menunjukkan hubungan yang erat antara dosis ekstrak *A.sativum* dengan aktivitas fagositosis makrofag.

Tabel 1. Indeks Fagositik Makrofag

Kelompok Percobaan	N	Rerata	Standar Deviasi	Standar Error	Interval Kepercayaan 95 %	
					Batas Atas	Batas Bawah
K	6	0,5	0,2	8,7	0,7	0,3
P1	6	3,3	0,5	0,2	3,8	2,6
P2	6	6,2	1,2	0,5	7,5	5,0
P3	6	7,5	0,7	0,3	8,3	6,8



Gambar 1. Grafik Box plot Indeks Fagositik Makrofag

Pemberian ekstrak *A.sativum* ternyata mampu memodulasi sistem imun menci yang diinfeksi *L.monocytogenes* dengan cara mengaktifasi makrofag sehingga kemampuan fagositosisnya meningkat. Makrofag melaksanakan sebagian besar fungsi efektor setelah sel itu diaktivasi oleh mikroba, sitokin dan stimulus lain. Proses fagositosis dimulai dengan kemotaksis diikuti dengan adhesi, penelanan (*ingesti*), pencernaan sampai pembunuhan (*killing*). Makrofag yang terinfeksi *L.monocytogenes* akan berespons dengan memproduksi IL-12, yang kemudian menginduksi produksi IFN- $\gamma$  oleh sel NK dan sel T CD4<sup>+</sup>, IFN- $\gamma$  bekerja secara sinergis dengan produk bakteri untuk memaksimalkan fungsi efektor makrofag teraktivasi dan sekresi sitokin inflamasi mereka, sehingga memperkuat mekanisme bakterisidal makrofag untuk membatasi replikasi *L.monocytogenes* di dalam sel ini (Andersson, *et al.*, 1998; Roitt, 2001).

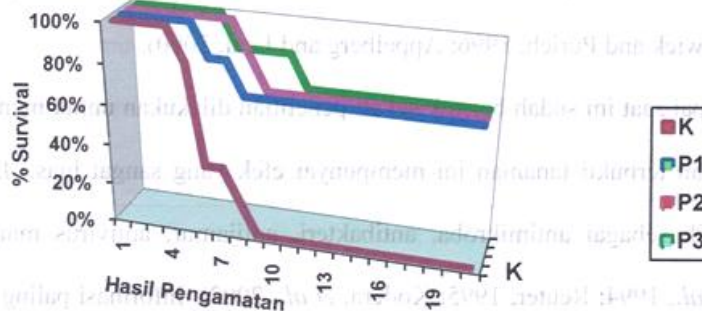
Penelitian ini telah membuktikan bahwa kemampuan fagositosis makrofag menci yang diberi ekstrak *A.sativum* lebih tinggi dibanding yang tidak diberi ekstrak. Diasumsikan bila kemampuan fagositosis makrofag meningkat maka produksi sitokin-sitokin yang mengaktivasi makrofag juga meningkat. Hasil ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Kyo, *et al.* (2001) yang menyelidiki efek imunomodulasi dan efek anti tumor ekstrak

*A.sativum* pada medium kultur sel tumor. Ternyata ekstrak *A.sativum* dapat meningkatkan proliferasi sel lien, secara signifikan meningkatkan sekresi IL-12, TNF- $\alpha$  dan IFN- $\gamma$ , memperkuat aktivitas sel NK dan dengan nyata menginduksi aktivitas fagositik makrofag peritoneal.

*L.monocytogenes* yang berhasil menghindari dari perangkap vakuola makrofag akan masuk ke sitoplasma dan bereplikasi di dalamnya. Sel yang terinfeksi di dalam sitoplasmanya akan memproses protein listerial seperti *hemolisin LLO* di dalam peptida dan mempresentasikannya kepada molekul MHC kelas I pada permukaan sel. Sel T CD8<sup>+</sup> kemudian mengenali sel yang terinfeksi dan melisiskannya (Badovinac and Harty, 2000; Doyle, 2001). Dengan demikian, baik sel T CD4<sup>+</sup> maupun sel T CD8<sup>+</sup> diaktivasi secara spesifik selama terjadinya infeksi.

#### **Ketahanan Hidup Mencit (survival)**

Berdasarkan grafik persentase *survival rate* (Gambar 2), tampak bahwa *survival* kelompok perlakuan menunjukkan persentase yang lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok kontrol. *Survival rate* yang paling tinggi terdapat pada kelompok P2 dan P3 (75 %) diikuti P1 (66,7 %), sedangkan K hanya 25 %. Uji beda *Logrank* membuktikan apabila P1 dibandingkan dengan K, maka tidak didapatkan perbedaan yang bermakna ( $p=0,0542$ ), tetapi jika P2 dan P3 dibandingkan dengan K maka terdapat perbedaan nyata dengan nilai signifikansi berturut-turut  $p=0,0125$  dan  $p=0,0208$ . Penelitian ini membuktikan bahwa mencit yang diberi ekstrak *A.sativum* mempunyai ketahanan hidup (*survival*) yang lebih tinggi dibandingkan yang tidak diberikan perlakuan.



Gambar 2. Grafik Persentase Survival Rate

Sesuai dengan hasil penelitian yang diharapkan, di sini terlihat bahwa ekstrak *A.sativum* kemungkinan berfungsi sebagai imunostimulator sehingga dapat meningkatkan respons imun pejamu terutama imunitas seluler dalam melawan infeksi bakteri intraseluler. Diduga bahwa meningkatnya *survival* mencit disebabkan oleh meningkatnya kemampuan sel imunokompeten dalam menghambat pertumbuhan bakteri yang dilakukan oleh makrofag teraktivasi sebagai fagosit profesional melalui sitokin yang diproduksinya juga melalui aktivasi sel limfosit seperti telah dibuktikan oleh peneliti-peneliti terdahulu (Campbell and Shastri, 1998; Lopes, *et al.*, 2000).

Apabila respons imun pejamu tidak adekuat, *L.monocytogenes* akan bermultiplikasi secara bebas di dalam makrofag dan sel lain. Sel *Kupffer* dipercaya menginisiasi perkembangan imunitas antilisterial melalui induksi proliferasi limfosit T bergantung antigen dan sekresi sitokin (Cohlen and North, 1992; Appelberg and Leal, 2000). Patogen ini dibawa masuk ke dalam sel pejamu melalui proses fagositosis. *Internalin A*, diidentifikasi pertama kali sebagai protein permukaan listerial yang dibutuhkan untuk penetrasi kuman ke dalam sel non fagositik. Faktor virulensi ini mengikat protein permukaan, *E-cadherin*, pada permukaan sel epitelial pejamu. Interaksi ini yang menstimulasi fagositosis *L.monocytogenes*. Sedangkan



*Seminar Nasional Farmasi 2010*  
*Imunomodulator dan Perkembangannya (Manfaat dan Bahayanya)*

protein *Internalin B* berperan dalam invasi ke sel hepatosit di dalam hepar (Dramsi, *et al.*, 1995; Southwick and Purich, 1996; Appelberg and Leal, 2000).

Sampai saat ini sudah banyak sekali penelitian dilakukan untuk mengetahui efektifitas *A.sativum* dan terbukti tanaman ini mempunyai efek yang sangat luas. *A.sativum* memiliki aktivitas baik sebagai antimikroba, antibakteri, antijamur, antivirus maupun antiprotozoa (Minlon, *et al.*, 1994; Reuter, 1995; Kodera, *et al.*, 2002). Informasi paling aktual didasarkan pada data hewan coba dan studi *in vitro*. *A.sativum* dalam berbagai penelitian memperlihatkan aktivitasnya dalam memperkuat berbagai faktor imun (imunostimulan), seperti aktivitas fagositik makrofag, aktivitas limfosit T, aktivitas sel NK dan membangkitkan respons antibodi (Amagase, *et al.*, 2001; Kyo, *et al.*, 2001; Nuttakaan, *et al.*, 2006). Aktivitas farmakologik 4 bentuk preparat *A.sativum*, yakni *raw garlic juice* (RGJ), *heated garlic juice* (HGJ), *dehydrated garlic powder* (DGP) dan *aged garlic extract* (AGE), semuanya dapat meningkatkan aktivitas sel-sel imunokompeten terutama sel NK dan sel *killer* pada mencit, tetapi bentuk AGE yang paling efektif sebagai imunostimulan (Kemper, 2000; Nuttakaan, *et al.*, 2006).

Dalam penelitian ini terbukti bahwa *A.sativum* dapat meningkatkan *survival rate* mencit yang terinfeksi Listeriosis, tetapi semakin tinggi dosis *A.sativum survival ratenya* tidak semakin tinggi. Artinya *A.sativum* mempengaruhi *survival rate* mencit melalui aktivitas antibakterialnya tetapi tidak dipengaruhi kadarnya. Mekanisme antibakterial bekerja melalui ikatan antara *allicin* dan *ajoene* dengan kelompok *cysteine* dari enzim yang merupakan dasar bagi proliferasi bakteri (Reuter, 1995; Nuttakaan, *et al.*, 2006). *A.sativum* memiliki aktivitas melawan bakteri gram negatif dan positif yang sangat luas secara *in vitro*. Pada umumnya bakteri aerobik lebih rentan dibanding bakteri anaerobik. 1mg *allicin* hampir ekuivalen dengan 15 U penicillin atau 1% aktivitas penicillinnya (Minlon, *et al.*, 1994; Koch and Lawson, 1996).

Hewan yang terinfeksi *L. monocytogenes* bisa mengalami ensefalitis, septikemia atau aborsi. Pada ensefalitis, jika dilakukan pemeriksaan histopatologi otak akan tampak banyak mikroabses. Lesi parenkim paling sering menyebar ke meningen. Sedangkan pada hewan yang mengalami septikemia atau aborsi fetus paling sering ditemukan nekrosis yang multipel pada hepar, lien, endokardium dan miokardium (Cossart and Lecuit, 1998; Unnerstad, 2001; Vasquez, 2001). Kematian mencit dalam penelitian ini kemungkinan dapat disebabkan oleh menyebarnya toksin *L.monocytogenes* (endotoksemia) sehingga menyebabkan keadaan sepsis dan adanya kegagalan fungsi organ terutama hepar dan otak. Untuk memastikan penyebab kematian ini perlu dilakukan pemeriksaan histopatologi (PA) pada kedua organ tersebut.

#### KESIMPULAN

Hasil penelitian ini membuktikan bahwa ekstrak *A.sativum* dapat meningkatkan kemampuan fagositosis makrofag dan *survival* pada mencit Balb/C yang terinfeksi *L.monocytogenes*. Dengan demikian, dapat disimpulkan bahwa *A.sativum* berfungsi sebagai imunostimulan yang memodulasi sistem imun mencit sehingga dapat melawan infeksi yang disebabkan oleh bakteri intraseluler.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Abbas AK, Lichtman AH and Pober JS. Immunity to microbes. In Cellular and Molecular Immunology 5<sup>th</sup> ed. Philadelphia: WB.Saunders Co. 2001: 342-60.
- Amagase H, Petesch BL, Matsuura H, Kasuga S and Itakura Y. Intake of Garlic and Its Bioactive Components. J. Nutr. 2001; 131: 955S-62S.
- Andersson A, Dai WJ, Disanto JP, Brombacher F. Early IFN- $\gamma$  Production and Innate Immunity Duryng *Listeria monocytogenes* Infection in the Absence of NK Cells. J. Immunology. 1998 ; 161 : 5600-6.
- Appelberg R and Leal IS. Mutants of *Listeria monocytogenes* Defective in In Vitro Invasion and Cell-to-Cell Spreading Still Invade and Proliferate in Hepatocytes of Neutropenic Mice. J Infection and Immunity 2000; 68(2): 912-4.
- Badovinac VP, Harty JT. Adaptive Immunity and Enhanced CD8<sup>+</sup> T Cell Response to *Listeria monocytogenes* in the Absence of Perforin and IFN- $\gamma$ . J.Immunology. 2000 ; 164 : 6444-52.
- Campbell DJ and Shastri N. Bacterial Surface Proteins Recognized by CD4 T Cells During Murine Infection with *Listeria monocytogenes*. Optimal immunity. J Immunology 1998, 161: 2339-47.

- Cohlán JW and North RJ. Early pathogenesis of infection in the liver with the facultative intracellular bacteria *Listeria monocytogenes*, *Francisella tularensis* and *Salmonella typhimurium* involves lysis of infected hepatocytes by leucocytes. *J Infect & Immun.* 1992; 5164-71.
- Coligan JE, Kruisbeek AM, Margulies DH, Shevach EM, Stober W. *Current Protocols in Immunology*, Volume 2. New York : John Wiley & Sons, Inc : 1991 : 14.6.2-14.6.3.
- Cossart P and Lecuit M. Interactions of *Listeria monocytogenes* with mammalian cells during entry and actin-based movement: bacterial factors, cellular ligands and signalling. *EMBO Journal* 1998;17 (14): 3797-3806.
- Doyle ME. Virulence Characteristic of *Listeria monocytogenes*. University of Wisconsin-Madison : Food Research Institute, 2001.
- Dramsi S, Biswas I, Maguin E, Braun L, Mastroeni P and Cossart P. Entry of *Listeria monocytogenes* into hepatocytes requires expression of InlB, a surface protein of the internalin multigene family. *Molecular Microbiology* 1995; 16: 251-61.
- Elgert KD. Immunomodulation. In *Immunology understanding the immune system*. New York : Wiley-Liss a John Wiley & Sons, Inc., Publication, 1996 : 370-88.
- Fulder S, Blackwood J, Soetrisno E. *Garlic Nature's Original Remedy*. Penerjemah Slamet. Jakarta : Penerbit Inovasi, 1995 : 6-74.
- Janeway ChA, Travers P, Walport M, Sholomchick MJ. Manipulation of the immune response. In *immunobiology the immune system in health and disease*, fifth edition. Churchhill Livingstone : Garland Publishing, 2001 : 553-96.
- Johan A, Susilaningsih N, Gunadi. Penelitian in vitro Efek Polifenol dari Teh Hijau terhadap Mekanisme Pertahanan Tubuh pada Mencit yang Diinokulasi *Listeria monocytogenes*. Laporan Akhir Penelitian DCRG. Semarang : Domestic Collaborative Research Grant Proyek Penelitian untuk Pengembangan Pascasarjana/URGE Ditjen Dikti Depdiknas, 2000/2001 : 20.
- Kemper KJ. Garlic (*Allium sativum*) in The Longwood Herbal Task Force page 1. [www.mcp.edu/herbal/default.htm](http://www.mcp.edu/herbal/default.htm).2000.
- Koch HP, and Lawson LD (eds.) *Garlic: The Science and Therapeutic Application of Allium sativum L. and Related Species*, 2nd edition. Baltimore: Williams & Wilkins. 1996.pp. 162-76.
- Kodera Y, Suzuki A, Imada O, Kasuga S, Sumioka I, Kazenawa A, et al. Physical, chemical, and biological properties of S-allylcysteine, an amino acid derived from garlic. *J Agric Food Chem* 2002; 50: 622 – 32.
- Kyo E, Uda N, Kasuga Sh, Itakura Y. Immunomodulatory Effects of Aged Garlic Extract. *J.Nutr.*2001 ; 131 : 1075S-1079S.
- Lopes MF, Freire-de-Lima CG and DosReis GA. The macrophage haunted by cell ghosts: a pathogen grows. *Immunology Today* 2000; 21 (10): 489 – 94.
- Minlon, H, Lo CP and Chu LJY. Allicin, the antibacterial principle of *Allium sativum*. II.Determination of the chemical structure. *J Am Chem Soc.* 1994; 66: 1952-4.
- Nagourney, RA. Garlic: medicinal food or nutritious medicine? *J Med Food.* 1998;1:13-8.
- Nuttakaan L, Rattanapanone V, Chanarat N and Janusz MG. Basic nutritional investigation. Quantitative evaluation of the antioxidant properties of garlic and shallot preparations. *J Nutrition* 2006; 22: 266 – 74.
- Reuter HD. *Allium sativum* and *Allium ursinum*: Part 2. Pharmacology and medicinal application. *Phytomedicine* 1995; 2: 73-91.
- Roitt IM, Delves PJ. Adversial strategies during infection. In *Roitt's Essential Immunology*, tenth edition. London : Blackwell Science Ltd., 2001 : 249-280.

- Southwick FS and Purich DL. Intracellular pathogenesis of listeriosis. *N. Engl. J. Med.* 1996; 334: 770-6.
- Unnerstad, H.. *Listeria monocytogenes* – strain diversity demonstrated by genotyping. Doctoral thesis. Swedish University of Agricultural Sciences Uppsala. 2001.
- Vasquez-Boland JA, Kuhn M, Berche P, Chakraborty T, Dominguez-Bernal G, Goebel W, Gonsalez-Zorn B, Wehland J and Kreft J. *Listeria* Pathogenesis and Moleccular Virulence Determinants. *Clin Microb Rev.* 2001; 14(3): 584-640.