

Original Paper

Expression of the *hly* and *inlA* genes of *Listeria monocytogenes* bacteria in viable but non-culturable (VBNC) condition in temperatures of 4 degrees Celsius

Sona Kalteh (Ph.D), Ph.D in Processing of Fishery Products, Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. ORCID ID: 0000-0001-6996-2177

***Seyed Mahdi Ojagh (Ph.D)**, **First Corresponding Author**, Associate Professor, Department of Fisheries, Faculty of Fisheries and the Environment, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. E-mail: mahdi_ojagh@yahoo.com
E-mail: ojagh@gau.ac.ir ORCID ID: 0000-0001-7325-1263

***Alijan Tabarraie (Ph.D)**, **Second Corresponding Author**, Professor of Virology, Infectious Diseases Research Center, Golestan University of Medical Science, Gorgan, Iran. E-mail: alijant@yahoo.com ORCID ID: 0000-0002-8167-5469

Mehdi Zolfaghari (Ph.D), Assistant Professor, Department of Fisheries, Faculty of Fisheries and the Environment, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. ORCID ID: 0000-0001-7443-7975

Abstract

Background and Objective: *Listeria monocytogenes* is a gram-positive and foodborne pathogen that is psychrophilic and has the ability to tolerate a high percentage of salt by more than 10%. This bacterium grows in many food products that have a long shelf life. This study was performed to evaluate the expression of genes *hly* and *inlA* of *Listeria monocytogenes* bacteria in the viable but non-culturable (VBNC) condition in temperatures of 4 degrees Celsius.

Methods: In this descriptive laboratory study, bacteria in 10^6 counts in mid log phase were inoculated into BHI Agar rich medium and It was investigated and stored at refrigerated temperature (4 degrees Celsius) until the cultivate was lost. At the end of the *16S rRNA* gene, the *hly* and *inlA* genes were studied as pathogenic genes of this bacterium. The expression of these genes before and after entering to VBNC state was performed to compare their expression.

Results: *Listeria* bacteria lost its cultivation ability after 5 months of storage at a refrigerated temperature. The results of the gene expression analysis showed that at the end of the period, the bacterium entered "Viable But non-Culturable" form; also the *hly* and *inlA* pathogenic genes were not expressed in riched medium. By adding blood to the rich culture medium of this bacterium, the hemolysin O pathogen gene was re-illuminated.

Conclusion: The results of this study show that the possibility of bacterial entry into VBNC mode occurs at the refrigerator condition, and the expression of its pathogenic genes is affected. Blood and its agents can act as an agent for the induction and clarification of the *hly* gene. Therefore, it is necessary to review the microbial quality control of fishery products.

Keywords: *Listeria monocytogenes*, VBNC, *hly* gene, *inlA* gene, Temperature

Received 16 Jan 2019

Revised 10 Dec 2019

Accepted 10 Feb 2020

Cite this article as: Kalteh S, Ojagh SM, Tabarraie A, Zolfaghari M. [Expression of the *hly* and *inlA* genes of *Listeria monocytogenes* bacteria in viable but non-culturable (VBNC) condition in temperatures of 4 degrees Celsius]. J Gorgan Univ Med Sci. 2020 Summer; 22(2): 89-98. [Article in Persian]

بیان ژن‌های *hly* و *inlA* باکتری *Listeria monocytogenes* در وضعیت زنده اما غیر قابل کشت (VBNC) در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد

دکتر صونا کلته، دکتری فرآوری محصولات شیلاتی، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران. ORCID ID: 0000-0001-6996-2177

* دکتر سیدمهدی اجاق، دانشیار، گروه فرآوری محصولات شیلاتی، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران. ORCID ID: 0000-0001-7325-1263

ORCID ID: 0000-0001-7325-1263

ORCID ID: 0000-0002-8167-5469

* دکتر علیجان تیرانی، استاد و ویروس‌شناسی، مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران. ORCID ID: 0000-0001-7443-7975

ORCID ID: 0000-0001-7443-7975

چکیده

زمینه و هدف: لیستریا مونوسیتوژنز (*Listeria monocytogenes*) یک پاتوژن غذازاد گرم مثبت است که سرما دوست بوده و توانایی تحمل درصد بالای نمک بیش از ده درصد را دارد. این باکتری در بسیاری از محصولات غذایی که مدت زمان نگهداری طولانی دارند رشد می‌کند. این مطالعه به منظور ارزیابی بیان ژن‌های *hly* و *inlA* باکتری لیستریا مونوسیتوژنز در وضعیت زنده اما غیر قابل کشت (Viable But non-Culturable state: VBNC) در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انجام شد.

روش بررسی: در این مطالعه توصیفی آزمایشگاهی ۱۰^۷ باکتری در اواسط رشد لگاریتمی به محیط کشت BHI Agar غنی تلقیح و تا زمان از دست رفتن کشت در دمای یخچال (۴ درجه سانتی‌گراد) بررسی و نگهداری شد. در انتهای دوره ژن *16S rRNA* همچنین ژن‌های *hly* و *inlA* به‌عنوان ژن‌های بیماری‌زایی این باکتری مورد بررسی قرار گرفتند. بررسی بیان این ژن‌ها قبل و بعد از ورود به حالت VBNC، به منظور مقایسه بیان آنها انجام گردید.

یافته‌ها: باکتری لیستریا پس از ۵ ماه نگهداری در دمای یخچال توانایی کشت‌پذیری خود را از دست داد. نتایج بررسی بیان ژن نشان داد که در انتهای دوره باکتری وارد حالت «زنده اما غیر قابل کشت» شد. همچنین ژن‌های بیماری‌زایی *hly* و *inlA* آن در محیط غنی شده نیز بیان نشدند. با افزودن خون به محیط کشت غنی این باکتری ژن بیماری‌زایی همولازین O مجدداً روشن گردید.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان داد که امکان ورود باکتری به حالت VBNC در شرایط یخچال وجود دارد و بیان ژن‌های بیماری‌زایی آن تحت تاثیر قرار می‌گیرد. خون و فاکتورهای آن به عنوان عامل القا کننده برای ژن *hly* می‌تواند عمل کند. از اینرو بازبینی فرایندهای کنترل کیفیت میکروبی فرآورده‌های شیلاتی ضروری به نظر می‌رسد.

کلید واژه‌ها: لیستریا مونوسیتوژنز، VBNC، ژن *hly*، ژن *inlA*، دما

* نویسنده مسؤول اول: دکتر سیدمهدی اجاق، پست الکترونیکی mahdi_ojagh@yahoo.com و ojagh@gau.ac.ir

نشانی: گرگان، میدان بسیج، پردیس، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، دانشکده شیلات و محیط زیست، گروه شیلات، تلفن ۰۱۷-۳۲۴۲۷۰۴۰، نمابر ۳۲۴۴۱۵۵

* نویسنده مسؤول دوم: دکتر علیجان تیرانی، پست الکترونیکی alijant@yahoo.com

نشانی: گرگان، کیلومتر ۲ جاده گرگان به ساری، مجموعه آموزش عالی دانشگاه علوم پزشکی گلستان، دانشکده پزشکی، گروه ویروس شناسی، تلفن ۰۱۷-۳۲۴۵۱۶۵۱

وصول مقاله: ۱۳۹۷/۱۰/۲۶، اصلاح نهایی: ۱۳۹۸/۹/۱۹، پذیرش مقاله: ۱۳۹۸/۱۱/۲۱

مقدمه

دریافت نمی‌کنند؛ می‌توانند حاوی لیستریا هنگام مصرف باشند (۶). لیستریا مونوسیتوژنز از محصولات دریایی مثل ماهی دودی، محصولات دریایی پخته و منجمد، ترشی ماهی و سوریمی جداسازی شده است (۷). توانایی این باکتری در رشد در خشکی و سرما باعث افزایش بقاء و پراکندگی آن گشته است. لذا به راحتی می‌تواند در مواد غذایی موجود در یخچال رشد نماید و حتی در عملیات ناقص پاستوریزاسیون باقی مانده و از بین نرود (۸). میزان شیوع لیستریوزیس در سالمون دودی سرد و محصولات شیلاتی آماده مصرف ۳۶-۶ درصد گزارش شده است (۹). مصرف تعداد

لیستریا مونوسیتوژنز (*Listeria monocytogenes*) یک پاتوژن غذازاد گرم مثبت است که سرما دوست بوده و توانایی تحمل درصد بالای نمک (بیش از ۱۰ درصد) را دارد. در شرایط ایتیمم در محدوده دمای ۴-۱۵ درجه سانتی‌گراد و غلظت نمک بین ۰-۱۵ درصد رشد می‌کند (۱ و ۲). همچنین این باکتری در بسیاری از محصولات غذایی که مدت زمان نگهداری طولانی دارند؛ رشد می‌کند (۳-۵). محصولات آماده مصرفی که رشد این پاتوژن را حمایت می‌کنند و فرایند حرارتی اضافه‌ای را توسط مصرف کننده

وجود فعالیت متابولیکی بسیار پایین، به محض احیاء شدن می تواند قابلیت کشت خود را بازیابد (۱۹). در این راستا نتایج تحقیق Lindback و همکاران اشاره به توانایی ورود ۱۴ سویه *L. monocytogenes* جدا شده از سالمون، محیط فرآوری آن و بیماران و ۲ سویه استاندارد، تحت شرایط گرسنگی در دمای ۴ درجه سانتی گراد طی ۵ تا ۱۲ هفته به فاز VBNC داشت (۲۰). تمایز بین زنده ماندن و قابلیت کشت برای پاتوژن ها اهمیت بسیاری دارد. چرا که ممکن است از دست دادن قابلیت کشت، از دست رفتن بیماری زایی را تضمین نکند. بنابراین در مورد خطر ناشی از سلول های VBNC هیچگونه اطمینانی وجود ندارد. برخی از محققان اثرات بیماری زایی ناشی از سلول های VBNC را نشان داده اند. در حالی که دیگران ادعا کرده اند که قابلیت کشت و بیماری زایی به طور همزمان از دست می رود. *hly* کد کننده لیستریولیزین O است که برای لیز حفره مانند و ورود به سیتوزول سلول ضروری است (۲۱). همولیزین لیستریا مونوسیترنژنر به عنوان عامل بیماری زایی مهم تشخیص داده شده است (۲۲) و ترشح آن برای ترویج رشد درون سلولی و تشخیص سلول های T ارگانسیم ضروری است (۲۳ و ۲۴). همولیزین تعیین کننده لیستریولیزین O (۲۵) اولین بار از کشت لیستریا مونوسیترنژنر جدا شد (۲۵). ژن *inla* در تهاجم باکتری با انتروسیتوز نقش دارد (۲۶). لذا این مطالعه به منظور بیان ژن های *hly* و *inla* باکتری لیستریا مونوسیترنژنر در وضعیت زنده اما غیر قابل کشت (VBNC) در دمای یخچال (۴ درجه سانتی گراد) انجام شد.

روش بررسی

این مطالعه توصیفی آزمایشگاهی در دانشکده شیلات و محیط زیست دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان طی سال های ۹۷-۱۳۹۵ انجام شد.

سویه مورد مطالعه و کشت آن: باکتری لیستریا مونوسیترنژنر سویه استاندارد ATCC 19115 (سروتایپ 4b)، از سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران به صورت لیوفیلیزه تهیه شد. باکتری در محیط BHI برات به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد. سپس روی محیط BHI آگار کشت شد و ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوباسیون انجام گردید. در انتها یک کلنی خالص شده وارد محیط BHI برات شده و پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در انکوباتور شیکردار در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد با ۲۰۰ rpm در ویال های ۱/۵ میلی لیتری به همراه گلیسرول در دمای منفی ۷۰ درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

آزمون های شناسایی باکتریایی: به منظور تأیید سویه استاندارد تهیه شده آزمون های تأییدی بیوشیمیایی از قبیل رنگ آمیزی گرم، تست حرکت، کاتاز، اکسیداز، بتاهمولیز، تست CAMP، MR، VP، بایل اسکولین، OF و تخمیر فندهای گریلوز، مالتوز و لاکتوز و

زیادی از لیستریا یک تهدید بهداشتی قابل توجه برای گروه خطر از جمله افراد با نقص سیستم ایمنی، سالمندان، زنان باردار، جنین و نوزادان آنها محسوب می شود. در این گروه ها مرگ و میر ناشی از لیستریوزیس می تواند بالای ۳۰-۲۰ درصد باشد (۱۰). مواد غذایی دخیل در شیوع عمده لیستریوزیس محصولاتی بودند که در آنها لیستریا قادر به رشد به تعداد زیاد قبل از مصرف بود (۱۱). در ایالات متحده حد مجاز صفر در غذاهای آماده (کمتر از ۱ میکروارگانسیم در هر ۲۵ گرم نمونه) اعلام شده است (۱۲).

استفاده نادرست از دماهای متوسط تا شدید در محصولات ماهی آلوده ممکن است تا حد زیادی رشد لیستریا در ماهی را افزایش دهد (۱۳). با این وجود، به دلیل این که بروز سطح بالای لیستریا به طور طبیعی کمتر اتفاق می افتد و محصولات شیلاتی عمدتاً ماندگاری کوتاهی دارند؛ ماهی آلوده به لیستریا در دمای ۴ درجه سانتی گراد یا کمتر نگهداری می شود تا خطر کمتری برای سلامت عموم ارایه شود. اگرچه حداقل دوز عفونی برای لیستریا مقرر نشده، اما شواهدی وجود دارد که تعداد کم آن باعث لیستریوزیس می شود (۱۳ و ۱۴). پیش بینی شده است که در محصولات نگهداری شده در شرایط دمایی معمول خرده فروشی و مصرف کننده، شمار لیستریا می تواند به سطحی برسد که باعث عفونت در افراد با سیستم ایمنی ضعیف گردد (۱۵). بدون مداخله مناسب شمار موارد لیستریوزیس انسانی می تواند چند دهه آینده به دلیل افزایش در نسبت جمعیتی که بسیار مستعد این بیماری هستند؛ افزایش یابد (۱۶ و ۱۷).

باکتری لیستریا در محیط از نظر ساختاری و متابولیکی به وسیله مواد ضد عفونی کننده (آمین ها، ترکیبات چهار تایی آمونیوم و پراکسیدها)، محافظ ها، گرما، سرما یا فریز کردن، خشک کردن، تغییرات اسمزی و اسید تحت استرس هستند. مواجهه با استرس در صورت زنده ماندن باکتری منجر به افزایش سازگاری باکتری به استرس های محیطی می شود و مقاومت سویه ها به سطح طبیعی از استرس های همولوگ و هترولوگ (Cross-protection)، حفاظت متقاطع) افزایش پیدا کند. این مقاومت می تواند از طریق تولید پروتئین های استرس، جهش یا انتقال ژنتیکی مثل تبدیل (Transformation)، انتقال (Transduction) یا ترکیب (Conjugation) حاصل شود (۱۸). علاوه بر این سازگاری، لیستریا از توانایی ویژه ای برای مقابله با عوامل نامساعد محیطی برخوردار است که طی آن باکتری وارد حالتی به نام «زنده اما غیر قابل کشت» (Viable but non culturabile: VBNC) می گردد که به آن اجازه زنده ماندن در برخی شرایط سخت محیطی را می دهد. VBNC باکتری ها نشان دهنده حالتی است که باکتری موفق به رشد در محیط های باکتریولوژیک معمول و استاندارد نیست. این باکتری ها با

ژن‌های بیماری‌زایی این باکتری (۲۹) برای بررسی تغییر بیان این ژن‌ها در محیط BHI Agar یک بار قبل از شوک و بار دیگر بعد از شوک در انتهای دوره سرمایشی، به منظور مقایسه بیان آنها انجام شد. برای بررسی بیان ژن به ترتیب مراحل زیر انجام شد.

استخراج RNA باکتری: برای استخراج، تک کلنی از پلیت BHI آگار غنی مورد بررسی برداشت و به ۱۰ ml از محیط BHI برات اضافه شد و تا رسیدن به $OD \sim 0.4$ در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد و در نهایت با رقیق‌سازی تعداد آنها به 10^6 cfu/ml رسانده شد و در میکروتیوب‌های ۲ میلی‌لیتری برای استخراج توزیع شد. بدین منظور از کیت شرکت سیناکلون استفاده گردید که مراحل آن به‌طور خلاصه به شرح زیر است.

الف) تهیه پلیت باکتری (۲ min، ۱۰۰۰۰ rpm)؛ ب) افزودن ۴۰ μl آنزیم لیزوزیم ۰/۴ mg (۲۰ min، ۳۷ درجه سانتی‌گراد)؛ ج) افزودن ۴۰۰ μl محلول لیز لایزینز بافر انکوبه شده؛ د) افزودن ۳۰۰ μl از محلول precipitation؛ ه) انتقال به ستون استخراج RNA (۱ min، ۱۳۰۰۰ rpm)؛ و) افزودن ۴۰۰ μl محلول شستشوی اول (۱ min، ۱۳۰۰۰ rpm)؛ ز) افزودن ۴۰۰ μl محلول شستشوی دوم به تعداد ۲ بار (۱ min، ۱۳۰۰۰ rpm)؛ ح) رفع اتانول احتمالی باقیمانده (۲ min، ۱۳۰۰۰ rpm)؛ ط) انتقال ستون‌ها به میکروتیوب جدید ۱/۵ ml (۱/۵)؛ ی) افزودن ۳۰ μl از محلول RNase free water انکوبه شده در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد به ستون‌ها (۱ min، ۱۳۰۰۰ rpm) دو بار. RNA حاصل تا زمان استفاده در دمای منفی ۷۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید.

برای حذف DNA ناشی از آلودگی با استفاده از کیت DNase شرکت Genet Bio به شرح زیر استفاده گردید.

به ازای هر ۱ μg RNA مقدار ۱ μl بافر MgCl₂ و ۱ μl آنزیم DNase افزوده و مخلوط در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه گردید. در انتها مقدار ۱ μl EDTA به میکروتیوب افزوده شد و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد به منظور توقف فعالیت آنزیم DNase انکوبه گردید. RNA حاصل به منظور استفاده در RT-PCR و سنتز cDNA استفاده شد.

سنتز cDNA: به منظور سنتز cDNA از کیت ABI استفاده شد و مستر ساخت cDNA با حجم ۱۰ μl تهیه شد. cDNA سنتز شده به منظور انجام فرآیند PCR مورد استفاده قرار گرفت.

فرآیند PCR: به منظور انجام عملیات PCR از کیت Prim Taq Premix (2X) شرکت Genet Bio با دستور تهیه مستر میکس به صورت زیر استفاده شد.

Buffer (2.5 μl), Mgcl₂ (2 μl), dntp (0.5 μl), Taq (0.2 μl), Primer Forward [0.5 μl (10 pm)], Primer Reverse [0.5 μl (10 pm)], DW (12.8 μl)

میزان سمپل ۱ cDNA μl بود. مخلوط فوق در دستگاه PCR با

همچنین آزمون‌های تائیدی مولکولی برای بررسی بیان کامل ژن‌های مورد بررسی توسط آزمون PCR انجام شد. برای این منظور نتایج بررسی بیان ژن *hly* که ژن اختصاصی لیستریا بود؛ مورد بررسی قرار گرفت.

محیط مورد بررسی: امکان ورود باکتری لیستریا مونوسیتوزنتر به حالت VBNC در دمای یخچال (۴ درجه سانتی‌گراد) در محیط کشت BHI Agar غنی شده با ۲ درصد عصاره مخمر و ۰/۵ درصد سدیم پیروات مورد بررسی قرار گرفت. محیط BHI Agar طبق پروتکل شرکت مربوطه آماده‌سازی و اتوکلاو گردید.

آماده‌سازی و تلقیح باکتری‌ها به محیط‌های کشت: به منظور آماده‌سازی جهت تلقیح، پس از احیا باکتری یک کلونی خالص به ۱۰ میلی‌لیتر محیط BHI برات استریل منتقل و در انکوباتور شیکردار با دور ۲۰۰ rpm انکوبه گردید. رشد باکتری مورد نظر با استفاده از دستگاه اسپکتروفورمتر در OD_{600} nm کنترل شد (۲۷). باکتری‌ها در جذب حدود ۰/۴ معادل تقریباً 10^9 باکتری داشتند. در این میزان جذب باکتری‌ها تقریباً تا اوایل تا اواسط مرحله رشد لگاریتمی بودند. همزمان با بررسی میزان جذب، کشت باکتریایی نیز روی محیط BHI آگار صورت گرفت و پلیت‌ها پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون مورد شمارش قرار گرفتند. جذب ۰/۴ در حدود شش ساعت پس از تلقیح به دست آمد (شکل یک).

برای تلقیح، ابتدا باکتری‌ها در جذب ۰/۴ در ۷۰۰۰ دور به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند و برای کشت روی محیط BHI Agar با سه مرحله رقیق‌سازی ۱/۱۰، تعداد باکتری‌ها به 10^6 رسانده شد. ۱۰۰ μl از سوسپانسیون باکتریایی بر روی محیط کشت غنی با کشت خطی کشت داده شد. پس از تلقیح از تیمار مورد بررسی به‌طور تصادفی برای تعیین تعداد اولیه باکتری روی محیط BHI آگار کشت داده شد.

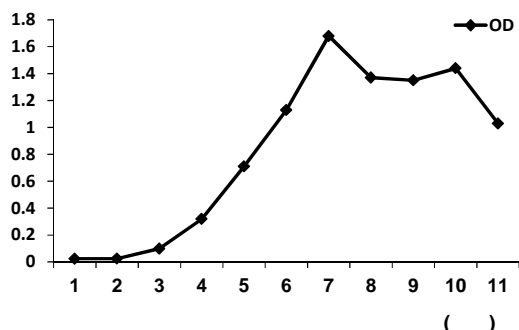
شوک نگهداری در یخچال: برای این منظور پلیت باکتریایی که حاوی 10^6 cfu/g بود؛ تا زمان از دست رفتن کشت در دمای یخچال نگهداری شد. در این فاصله زمانی کشت پذیری باکتری توسط شمارش باکتری (کلنی کانت) در ابتدای هرماه از مرداد تا آذر ماه بررسی شد. پس از انجام کلنی کانت بررسی تعداد باکتری‌ها در همان زمان از پلیت اولیه برای جلوگیری از خشکی محیط سواب کالچر تهیه گردید. برای این منظور باکتری‌ها ابتدا در محیط BHI برات احیا شدند. تیمار فوق با دو تکرار انجام پذیرفت.

بررسی ورود باکتری به حالت VBNC و بیان ژن‌های بیماری‌زایی: به منظور بررسی ورود باکتری به حالت VBNC پس از این که نتیجه کشت باکتری منفی شد؛ از روش بررسی بیان ژن *16S rRNA* برای حضور باکتری‌های زنده استفاده شد (۲۸). ژن *16S rRNA* به عنوان ژن خانه‌دار (Housekeeping gen) و ژن‌های *hly* و *inlA* به عنوان

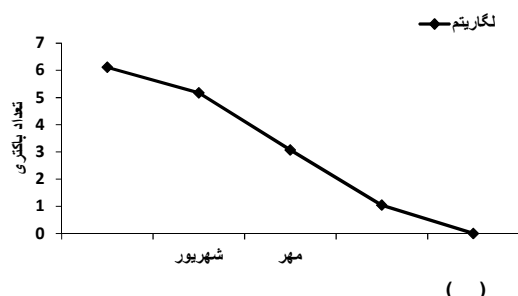
جدول ۱: توالی پرایمرهای مورد استفاده

| نام ژن | توالی الیگونوکلوئوتید | اندازه امپلیکون (bp) | دمای اتصال (درجه سانتی‌گراد) |
|----------|--|-------------------------|---------------------------------|
| 16S rRNA | F: TTA GCT AGT TGG TAG GGT R: AAT CCG GAC AAC GCT TGC | ۱۰۹ | ۶۰ |
| Hly | F: CGCAACAAACTGAAGCAAAGG R: TTGGCGGCACATTTGTACAC | ۱۳۹ | ۶۰ |
| inlA | F: CGGATGCAGGAGAAAATCC R: CTTTCACTATCCTCTCC | ۹۵ | ۶۰ |

سديم پيروت از پليت باكتري BHI آگار غني شده نشان داد كه نمونه مورد نظر پس از ۵ ماه نگهداری در دمای یخچال (۴ درجه سانتی‌گراد) کشت پذیری خود را از دست داد. لگاریتم تعداد باکتری‌ها در نمودار ۲ ذکر شده است.



نمودار ۱: نتایج بررسی روند رشد باکتری با روش سنجش میزان جذب نور در طول موج ۶۰۰ nm



نمودار ۲: لگاریتم تعداد باکتری‌ها پس از ۵ ماه نگهداری در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد

نتایج بررسی بیان ژن: نتایج بررسی بیان ژن‌های *hly*، *16s rRNA* و *inlA* قبل از شوک سرمایشی ۴ درجه سانتی‌گراد نشان‌دهنده بیان هر سه ژن این باکتری بود (شکل یک).

نتایج الکتروفورز محصول PCR باکتری‌ها پس از شوک سرمایشی در انتهای دوره، پس از بررسی کشت پذیری باکتری نشان دهنده بیان ژن *16s rRNA* بود. طبق این نتایج باکتری لیستریا مونوسیتوژنز در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه قادر به زنده ماندن بود و ژن خانه گردان خود را نیز بیان نمود؛ اما هیچگونه

تنظیمات دمایی زیر قرار داده شد.

مرحله اول: واسرشت اولیه ۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد.

مرحله دوم: تکثیر DNA به تعداد ۳۷ چرخه: الف) واسرشت ۳۰ ثانیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد؛ ب) اتصال پرایمر: ۴۰ ثانیه در ۶۰ درجه سانتی‌گراد؛ ج) گسترش: ۴۰ ثانیه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد.

مرحله سوم: باز سرشت نهایی: ۵ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد. الکتروفورز محصول PCR با استفاده از ژل ۲- ۱/۵ درصد آگارز صورت پذیرفت و سپس ژل با استفاده از دستگاه ژل داک عکس برداری گردید.

کشت در محیط بلاد آگار: به منظور احیا احتمالی باکتری‌ها، در انتهای دوره سرمایشی از محیط BHI Agar بر روی محیط بلاد آگار کشت داده شد و به مدت ۴۸-۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه و همولیز بتا آن مورد بررسی قرار گرفت. سپس بیان هر سه ژن *16s rRNA*، *hly* و *inlA* بررسی شد.

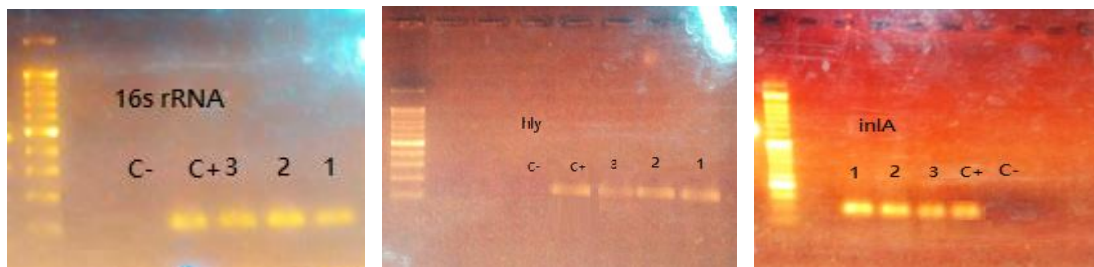
توالی پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه در جدول یک آمده است (۳۰ و ۳۱).

تجزیه تحلیل آماری: این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام پذیرفت. نتایج داده‌های پارامتریک با روش‌های ANOVA مورد ارزیابی و مقایسه میانگین‌ها با آزمون LSD صورت پذیرفت. برای آنالیز آماری داده‌های نرمال از آزمون دانکن و برای داده‌های غیر نرمال از آزمون من‌ویتنی استفاده شد. در مواقع لزوم آزمون ناپارامتریک کای اسکور برای آنالیز داده‌های ناپارامتریک استفاده گردید. تمام آنالیزها در سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ و با نرم افزار SPSS-16 صورت پذیرفت. نتایج به دست آمده با ترسیم نمودارها با استفاده از نرم افزار اکسل انجام شد.

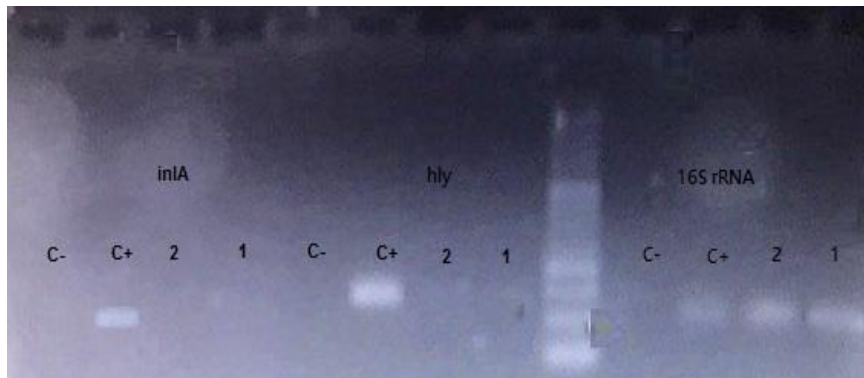
یافته‌ها

بررسی نمودار رشد باکتری لیستریا مونوسیتوژنز با استفاده از سنجش میزان جذب نور در طول موج ۶۰۰ nm در نمودار یک نشان داده شده است. باکتری‌ها در ۰/۴ ~ OD (۱۰^۹) به واسطه مرحله لگاریتمی رسیدند.

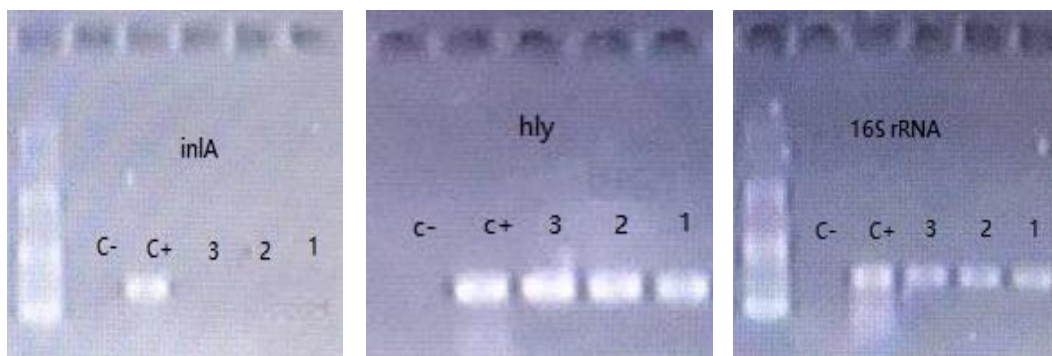
بررسی کشت پذیری باکتری‌ها در محیط BHI آگار غنی شده: نتایج بررسی کشت پذیری در محیط غنی شده با عصاره مخمر و



شکل ۱: نتایج الکتروفورز محصول PCR حاصل فرآیند بررسی بیان ژن *16S rRNA*, *hly* و *inlA* قبل از شوک سرمایشی - ترتیب و تکرار تیمارها به ترتیب ۱، ۲ و ۳ - کنترل مثبت (C+) شامل *DNA* لیستریا مونوسیژنز - کنترل منفی (C-) شامل نمونه بدون سمپل



شکل ۲: نتایج الکتروفورز محصول PCR حاصل فرآیند بررسی بیان ژن *16S rRNA*, *hly* و *inlA* در انتهای شوک سرمایشی. ترتیب و تکرار تیمارها برای هر دو محیط کشت به ترتیب ۱، ۲ و ۳ - کنترل مثبت (C+) شامل *DNA* لیستریا مونوسیژنز - کنترل منفی (C-) شامل نمونه بدون سمپل



شکل ۳: نتایج الکتروفورز محصول PCR حاصل فرآیند بررسی بیان ژن *16S rRNA*, *hly* و *inlA* در انتهای دوره سرمایشی پس از احیا در محیط کشت بلاد آگار - ترتیب و تکرار تیمارها به ترتیب ۱، ۲ و ۳ - کنترل مثبت (C+) شامل *DNA* لیستریا مونوسیژنز - کنترل منفی (C-) شامل نمونه بدون سمپل

داد و همچنین قدرت همولیز کنندگی نیز در این محیط از خود نشان داد.

نتایج بررسی بیان ژن در محیط بلاد آگار: نتایج بررسی بیان ژن های بیماری زا در باکتری های احیاء شده از حالت VBNC نشان داد که ژن بیماری زا *hly* مجدداً در این باکتری ها روشن شد و بیان گردید؛ اما در مورد ژن *inlA* هیچگونه بیانی مشاهده نشد (شکل ۳).

بحث

از آنجایی که باکتری لیستریا مونوسیژنز در همه انواع محیطها

بیانی در ژن های بیماری زا *hly* و *inlA* مشاهده نشد (شکل ۲).

از تطابق نتایج بررسی بیان ژن با نتایج بررسی کشت پذیری باکتری، می توان به این نتیجه رسید که باکتری در انتهای دوره وارد حالت VBNC شده و باکتری زنده است؛ اما ژن های بیماری زا بی آن بیان نشدند.

نتیجه احیاء باکتری در بلاد آگار در انتهای دوره سرمایشی: نتایج نشان داد خون اضافه شده به محیط کشت باکتری موجب القاء احیاء باکتری VBNC لیستریا گردید. طبق این نتایج باکتری لیستریا در محیط خون دار کشت پذیری خود را به دست آورد و تشکیل کلونی

بیماری‌زایی آنهاست (۲۰).

دما برای بیان ژن‌های اصلی بیماری‌زایی در لیستریا مهم است (۳۷). در این ارتباط بیان ژن‌های بیماری‌زایی *actA*، *dhly* و *inla* و *prfA* لیستریا مونوسی‌توزنر در سه دمای مختلف صفر، ۴ و ۲۰ درجه سانتی‌گراد مورد بررسی قرار گرفت و اعلام شد که بیان ژن‌های *hly* و *ilnA* در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد بیش از دمای ۴ درجه سانتی‌گراد است (۳۸). دلیل افت بیان ژن در دمای پایین می‌تواند نرخ متابولیسمی پایین باکتری در دماهای پایین باشد (۲۷)؛ اما در مقابل مشخص شده در دمای پایین قدرت بیماری‌زایی لیستریا مونوسی‌توزنر افزایش می‌یابد (۳۹). همچنین گزارش شده باکتری لیستریا مونوسی‌توزنر پس از رشد در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و تزریق به تخم مرغ جنین‌دار بیماری‌زایی اش نسبت به این حالت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد بیشتر بود. بنابراین عنوان شد که با نگهداری برخی سویه‌های لیستریا مونوسی‌توزنر در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد ممکن است بیماری‌زایی آنها افزایش یابد (۴۰).

در تحقیق حاضر به منظور احیا احتمالی باکتری‌های صدمه دیده و آنهایی که وارد حالت VBNC شده‌اند؛ خون به محیط کشت باکتری‌ها به صورت محیط بلاد آگار غنی شده، افزوده شد و شاهد احیاء باکتری لیستریا از حالت VBNC و بیان مجدد ژن *hly* و همولیز سلول‌ها بودیم. این موضوع نشان‌دهنده وجود عواملی در خون است که می‌تواند بیان ژن بیماری‌زایی *hly* را در این باکتری القاء کنند. ژن *inla* همچنان بدون بیان باقی ماند. عدم بیان ژن *inla* را می‌توان به عدم وجود عوامل القاء کننده لازم برای بیان آن نسبت داد. اولین گزارش در مورد احیا سلول‌های VBNC، پس از مکمل شدن سلول‌های سالمونلا تیفی با مواد مغذی (تزریق BHI) مشاهده شد (۴۱). همچنین احیا سلول‌های *Aeromonas hydrophila* VBNC توسط محیط کشت تکمیلی با مواد احیاء کننده H₂O₂، کاتالاز و سدیم پیرووات گزارش شده است (۴۲)؛ اما در پژوهشی دیگر عنوان شد سدیم پیرووات و تغذیه با مواد جایگزین منجر به احیا سلول‌های VBNC لیستریا نشده است (۲۰).

در ارتباط با بروز خاصیت بیماری‌زایی پس از احیا از حالت VBNC می‌توان به ادامه تحقیقات Cappelier اشاره کرد که در ابتدا بیان کرده بودند؛ همزمان با از دست رفتن قابلیت کشت در فاز VBNC خاصیت بیماری‌زایی نیز از دست می‌رود؛ اما در ادامه تحقیق عنوان کردند که از دست رفتن بیماری‌زایی موقت بود. چون بعد از انتقال این سلول‌ها به تخم مرغ نطفه‌دار، احیا شده و بیماری‌زایی شان در سطح یکسان با میزان اولیه‌اش بروز پیدا کرد (۴۳). همچنین اعلام شده است که با وجود سنتز مداوم mRNA ژن *hly* در سلول‌های لیستریا مونوسی‌توزنر در فاز VBNC که نشان‌دهنده پتانسیل بیماری‌زایی آنهاست؛ اما در تلقیح داخل صفاقی موش‌ها و

حضور دارد؛ حضور سلول‌های VBNC می‌تواند به عنوان مشکل عمده سلامت عمومی مطرح باشد. چرا که آنها با روش‌های معمول کشت استاندارد تشخیص داده نمی‌شوند (۳۲). در مطالعه حاضر باکتری لیستریا وارد حالت VBNC شد. در این راستا تحقیقات نشان داده است که سویه ATCC 19115 لیستریا مونوسی‌توزنر در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و همچنین در شوری ۳۰ درصد در دمای یخچال در شرایط قحطی مواد غذایی به ترتیب در طی ۱۳ و ۲۷ روز وارد حالت VBNC می‌شوند. در حالی که تحت همین شرایط در گوشت ماهی قزل‌آلا وارد حالت VBNC نمی‌شدند (۳۲). همچنین عنوان شده است که سویه‌های LO28، ATCC19115 و CNL895807 لیستریا وقتی که در شرایط قحطی مواد غذایی در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد و سویه *Scotta* در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند؛ وارد فاز VBNC شدند (۳۳). در مقابل در نتایج تحقیق دیگر مشخص شد که باکتری سالمونلا پس از ۱۲۰ روز در شرایط قحطی مواد غذایی در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد وارد فاز VBNC نشد (۳۴).

ورود باکتری به حالت VBNC به توانایی باکتری در مواجهه با استرس وارده و قدرت غلبه بر آن استرس بستگی دارد که تحت این شرایط وارد این فاز می‌گردد (۳۵)؛ اما زمان ورود آن به فاز VBNC در این تحقیق طولانی‌تر بود که دلیل آن را می‌توان به نرخ متابولیسمی پایین باکتری در دماهای پایین، در واقع سرما دوست بودن لیستریا و همچنین حضور در شرایط مغذی عنوان کرد. مشخص گردیده است که مواد مغذی محیط باکتری از لحاظ ویژگی‌های بیوشیمیایی و نوع و میزان مواد مغذی تاثیر زیادی بر ورود باکتری به حالت VBNC دارد (۳۶). در تحقیق حاضر با وجود مغذی بودن محیط رشد باکتری، اما به دلیل گذشت زمان، خشک شدن محیط جامد را می‌توان به عنوان یکی از عوامل محرک ورود باکتری به حالت VBNC عنوان کرد. آزمون‌های باکتریولوژیکی کشت پایه قادر به تشخیص ارگانسیم‌های غیر قابل کشت نیستند و خطر مصرف لیستریا مونوسی‌توزنر VBNC ناشناخته است (۲۰).

نتایج بررسی بیان ژن‌های بیماری‌زایی *hly* و *inla* در تحقیق ما پس از شوک سرما نشان داد که ژن‌های بیماری‌زایی باکتری در حالت VBNC بیان نشدند. در صورتی که بیان این ژن‌ها قبل از قرارگیری در معرض شوک دمایی ۴ درجه سانتی‌گراد در بیشترین مقدار خود بود. در ارتباط با خاصیت بیماری‌زایی در حالت VBNC نتایج متفاوتی گزارش شده است. از جمله آنها نتایج تحقیقی است که در گزارش اولیه خود اعلام کردند ورود به حالت VBNC همراه با از دست رفتن بیماری‌زایی لیستریا مونوسی‌توزنر است (۳۳). در گزارشی دیگر شاهد سنتز مداوم mRNA ژن *hly* در سلول‌های لیستریا مونوسی‌توزنر در فاز VBNC بودند که نشان‌دهنده پتانسیل

روش‌های میکروبیولوژیک کلاسیک که اجازه تشخیص چنین باکتری‌هایی با این پتانسیل بیماری‌زایی را نمی‌دهد؛ بیش از پیش افزایش می‌یابد. لذا راه حل مناسب آن می‌تواند ایجاد یک محیط کشت خاص باشد که به راحتی بتواند باعث احیا سلول‌های VBNC شود.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که دمای یخچال، کارایی کافی برای نگهداری محصولات غذایی را ندارد. چرا که لیستریا نه تنها در دمای یخچال مقاوم است و رشد دارد؛ بلکه وارد حالت VBNC نیز می‌گردد. همچنین ژن بیماری‌زایی آن در شرایط خاص احیا، دوباره بیان شد که ممکن است منجر به بیماری‌زایی نیز شود. از این رو استفاده از روش‌های معمول کشت برای تشخیص آلودگی باکتریایی ناکافی بوده و لزوم بازبینی فرایندهای کنترل کیفیت در کارخانجات محصولات دریایی را بیش از پیش افزایش می‌دهد.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی مصوب (شماره ۹۴۱۱۲۰ - مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی گلستان بود و با حمایت مالی آن معاونت محترم به انجام رسید. همچنین حاصل پایان‌نامه خانم صونا کتبه برای اخذ درجه دکتری در رشته فرآوری محصولات شیلاتی از دانشکده شيلات و محیط زیست دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان بود. بدین وسیله از مسؤولین محترم آزمایشگاه‌های گروه میکروبیولوژی دانشکده پزشکی و گروه بیوتکنولوژی دانشگاه علوم پزشکی گلستان به خصوص جناب آقای دکتر هادی رضوی نیکو سپاسگزاری می‌گردد.

References

- Bremer PJ, Osborne CM. Reducing total aerobic counts and *Listeria monocytogenes* on the surface of king salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *J Food Prot.* 1998 Jul; 61(7): 849-54. DOI: 10.4315/0362-028x-61.7.849
- Seeliger, HPR, Jones D. Genus *Listeria* Pirie. In: Sneath, PHA, Mair SN, Sharpe ME, Holt JG (eds.). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 9th ed. Baltimore: Williams and Wilkins. 1986; pp: 1235-45.
- Barakat RK, Harris LJ. Growth of *Listeria monocytogenes* and *Yersinia enterocolitica* on cooked modified atmosphere packaged poultry in the presence and absence of a naturally occurring microflora. *Appl Environ Microbiol.* 1999 Jan; 65(1): 342-45.
- Rørvik LM, Yndestad ML. *Listeria monocytogenes* in foods in Norway. *Intl J Food Microbiol.* 1991 Jun; 13(2): 97-104. DOI: 10.1016/0168-1605(91)90052-q
- Ryser ETE, Marth EH. *Listeria listeriosis and food safety*. 2nd ed. New York: Marcel Dekker. 1999; p: 738.
- Brett MS, Short P, McLauchlin J. A small outbreak of listeriosis associated with smoked mussels. *Intl J Food Microbiol.* 1988 Sep; 43(3): 223-29. DOI: 10.1016/s0168-1605(98)00116-0
- Dillon RM, Patel TR. *Listeria* in seafoods: A review. *J Food Prot.* 1992 Dec; 55(12): 1009-15. DOI: 10.4315/0362-028X-

سلول‌های HT-29 ایجاد بیماری نکردند. در نتیجه عنوان شد که خطر لیستریا غیر قابل کشت در غذاها، زمانی که حالت VBNC در نتیجه گرسنگی ایجاد شود؛ ناچیز است (۲۰).

در ارتباط با بیان ژن *hly* مشخص شده فعالیت لیستریولیزین O پس از چندین هفته ماندن باکتری لیستریا در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد از دست می‌رود و خاصیت بیماری‌زایی آن پس از ۲۴ ساعت انکوبه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد باز می‌گردد (۴۴) که دلیل آن را می‌توان به پروتئین PrfA که تنظیم کننده بیان ژن‌های بیماری‌زای PrfA (شامل *inlA*, *hly* و *actA*) نسبت داد که به دما بستگی دارد و در باکتری‌هایی که در دمای بالای ۳۰ درجه سانتی‌گراد رشد می‌کنند؛ بیان می‌شود (۴۴). در این دما میزان تولید لیستریولیزین بیشتر می‌شود که علاوه بر محیط مغذی خون‌دار دمای ایجاد شده ممکن است منجر به بیان ژن *hly* شده باشد (۵). از این رو کنترل دمایی طی پروسه فرآوری اهمیت به‌سزایی دارد. بیان این ژن‌ها توسط Sigma-B نیز کنترل می‌شود که بیان این ژن ممکن است استرس‌های فیزیولوژیکال در میکروارگانیسم را بهبود بخشد (۴۵ و ۴۶). همچنین فعالیت Sigma-B به مرحله رشد باکتری بستگی دارد که حداکثر فعالیت در فاز سکون باکتری است (۴۷ و ۴۸).

به نظر می‌رسد دانستن این که چنین اثرات بیماری‌زایی مربوط به سلول‌های VBNC است یا سلول‌هایی که به حالت قابل کشت برگشته‌اند؛ سخت است (۴۴). می‌توان این طور عنوان کرد که بیماری‌زایی لیستریا مونوسیتوژنز در حالت VBNC بستگی به شرایط احیا دارد (۳۳). با تمامی این تفاسیر لزوم توجه به حضور سلول‌های VBNC با پتانسیل بیماری‌زایی در نمونه‌های محیطی در هنگام ارزیابی خطر بهداشت عمومی به دلیل عدم کارایی مناسب

55.12.1009

- Varnam AH. *Foodborn pathogens*. 1st ed. London: Wolf publishing Ltd. 1991; pp: 327-53.
- Ben-Embarek PK. Presence, detection and growth of *L. monocytogenes* in seafoods: A review. *Intl J Food Microbiol.* 1994 Sep; 23(1): 17-34. DOI: 10.1016/0168-1605(94)90219-4
- McLauchlin J. The pathogenicity of *L. monocytogenes*: A public health perspective. *Rev Med Microbiol.* 1997; 8: 1-14.
- Harwig J, Mayers PR, Brown B, Farber JM. *Listeria monocytogenes* in foods: J. Harwig, P. R. Mayers, B. Brown and J. M. Farber describe the Canadian compliance policy and control programme. *Food Control.* 1991 Apr; 2(2): 66-69. [https://doi.org/10.1016/0956-7135\(91\)90137-L](https://doi.org/10.1016/0956-7135(91)90137-L)
- Shank FR, Elliot EL, Wachsmuth IK, Losikoff ME. US position on *L. monocytogenes* in foods. *Food Control.* 1996; 7(4/5): 229-34.
- Farber JM. *Listeria monocytogenes* in fish products. *J Food Prot.* 1991; 54(12): 922-24. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-54.12.922>
- Chen Y, Ross WH, Scott VN, Gombas DE. *Listeria monocytogenes* low levels equals low risk. *J Food Prot.* 2003 Apr; 66(4): 570-77. DOI: 10.4315/0362-028x-66.4.570

15. Saguy I. Simulated growth of *Listeria monocytogenes* in refrigerated foods stored at variable temperatures. *J Food Technol.* 1992; 46(3): 69-71.
16. Food and Drug Administration. Relative Risk to Public Health From Foodborne *Listeria Monocytogenes* Among Selected Categories of Ready-to-Eat Foods; Draft Risk Assessment Document and Risk Management Action Plan; Availability; Extension of Comment Period. 2001; pp: 28181-82. Document Number: 01-13055.
17. Farber JM, Peterkin PI. *Listeria monocytogenes*. In: Lund BM., Baird-Parker TC, Gould GW (eds.). *The microbiological safety and quality of foods*. Gaithersburg: Aspen Publisher. 2000; pp: 1178-232.
18. Foong CCS. The ecology of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat (RTE) meat. Dissertation. Iowa State University. 2003.
19. Oliver JD. Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol Rev.* 2010 Jul; 34(4): 415-25. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2009.00200.x
20. Lindback T, Rottenberg ME, Roche SM, Rorvik Liv M. The ability to enter into an avirulent viable but non-culturable (VBNC) form is widespread among *Listeria monocytogenes* isolates from salmon, patients and environment. *Vet Res.* 2010 Jan-Feb; 41(1): 08. DOI: 10.1051/vetres/2009056
21. Moors MA, Levitt B, Youngman P, Portnoy DA. Expression of Listeriolysin O and ActA by Intracellular and Extracellular *Listeria Monocytogenes*. *Infect Immun.* 1999 Jan; 67(1): 131-39.
22. Cossart P, Mengaud J. *Listeria monocytogenes*-a model system for the molecular study of intracellular parasites. *Mol Biol Med.* 1989 Oct; 6(5): 463-74.
23. Beattie IA, Swaminathan B, Ziegler HK. Cloning and characterization of T-cell-reactive protein antigens from *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun.* 1990 Sep; 58(9): 2792-803.
24. Tilney LG, Portnoy DA. Actin filaments and the growth, movement, and spread of the intracellular parasite, *Listeria monocytogenes*. *J Cell Biol.* 1989 Oct; 109(4): 1597-608. DOI: 10.1083/jcb.109.4.1597
25. Geoffroy C, Gaillard JL, Alouf JE, Berche P. Purification, characterization and toxicity of the sulfhydryl-activated hemolysin listeriolysin O from *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun.* 1987 Jul; 55(7): 1641-46.
26. Bierne H, Sabet C, Personnic N, Cossart P. Internalins: A Complex Family of Leucine-Rich Repeat-Containing Proteins in *Listeria Monocytogenes*. *Microbes Infect.* 2007 Aug; 9(10): 1156-66. DOI: 10.1016/j.micinf.2007.05.003
27. Seu D, Boor KJ, Wiedmann M. Sigma(B)-dependent expression patterns of compatible solute transporter genes *opuCA* and *lmo1421* and the conjugated bile salt hydrolase gene *bsh* in *Listeria monocytogenes*. *Microbiology.* 2003 Nov; 149(pt 11): 3247-56. DOI: 10.1099/mic.0.26526-0
28. Zolfaghari M, Rezai M, Forozandeh Moghaddam M, Mohabbati Mobarez A, Hoseini H. [The Effect of Stressful Conditions on Culturability of *Listeria monocytogenes* in Food Matrix]. *Iran J Med Microbiol.* 2017; 11(5): 149-58. [Article in Persian]
29. Tan Q, Xu H, Chen T, Li P, Aguilar ZP, Xu D, Ming X, et al. Differential Expression of Virulence and Stress Fitness Genes during Interaction between *Listeria monocytogenes* and *Bifidobacterium longum*. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2012; 76(4): 699-704. DOI: 10.1271/bbb.110832
30. Tasara T, Stephan R. Evaluation of housekeeping genes in *Listeria monocytogenes* as potential internal control references for normalizing mRNA expression levels in stress adaptation models using real-time PCR. *FEMS Microbiol Lett.* 2007 Apr; 269(2): 265-72. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2007.00633.x
31. Park YS, Lee SR, Kim YG. Detection of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* in kimchi by multiplex polymerase chain reaction (mPCR). *J Microbiol.* 2006 Feb; 44(1): 92-7.
32. Besnard V, Federighi M, Declercq E, Jugiau F, Cappelier JM. Environmental and physico-chemical factors induce VBNC state in *Listeria monocytogenes*. *Vet Res.* 2002 Jul-Aug; 33(4): 359-70. DOI: 10.1051/vetres:2002022.
33. Cappelier JM, Besnard V, Roche S, Garrec N, Zundel E, Velge P, et al. Avirulence of Viable But Non-Culturable *Listeria monocytogenes* cells demonstrated by in vitro and in vivo models. *Vet Res.* 2005 Jul-Aug; 36(4): 589-99. DOI: 10.1051/vetres:2005018
34. Zeng B, Zhao G, Cao X, Yang Zh, Wang C, Hou L. Formation and Resuscitation of Viable but Nonculturable *Salmonella typhi*. *Biomed Res Int.* 2013; 2013: 907170. DOI: 10.1155/2013/907170
35. Su X, Chen X, Hu J, Shen C, Ding L. Exploring the potential environmental functions of viable but nonculturable bacteria. *World J Microbiol Biotechnol.* 2013 Dec; 29(12): 2213-218. DOI: 10.1007/s11274-013-1390-5
36. Ragon M, Wirth T, Hollandt F, Lavenir R, Lecuit M, Le Monnier A, et al. A new perspective on *Listeria monocytogenes* evolution. *PLoS Pathog.* 2008 Sep; 4(9): e1000146. DOI: 10.1371/journal.ppat.1000146
37. McGann P, Wiedmann M, Boor KJ. The alternative sigma factor sigma B and the virulence gene regulator PrfA both regulate transcription of *Listeria monocytogenes* internalins. *Appl Environ Microbiol.* 2007 May; 73(9): 2919-30. DOI: 10.1128/AEM.02664-06
38. Duodu S, Holst-Jensen A, Skjerdal T, Cappelier JM, Pilet MF, Loncarevic S. Influence of storage temperature on gene expression and virulence potential of *Listeria monocytogenes* strains grown in a salmon matrix. *Food Microbiol.* 2010 Sep; 27(6): 795-801. DOI: 10.1016/j.fm.2010.04.012
39. Neuhaus K, Satorhelyi P, Schauer K, Scherer S, Fuchs TM. Acid shock of *Listeria monocytogenes* at low environmental temperatures induces *prfA*, epithelial cell invasion, and lethality towards *Caenorhabditis elegans*. *BMC Genomics.* 2013 Apr; 14: 285. DOI: 10.1186/1471-2164-14-285
40. Ryser ET, Marth EH. *Listeria, listeriosis, and food safety*. 3rd ed. Florida: CRC Press. 2007.
41. Roszak DB, Grimes DJ, Colwell RR. Viable but nonrecoverable stage of *Salmonella enteritidis* in aquatic systems. *Can J Microbiol.* 1984 Mar; 30(3): 334-38. DOI: 10.1139/m84-049
42. Wai SN, Mizunoe Y, Takade A, Yoshida S. A comparison of solid and liquid media for resuscitation of starvation- and low-temperature-induced nonculturable cells of *Aeromonas hydrophila*. *Arch Microbiol.* 2000 Apr; 173(4): 307-10. DOI: 10.1007/s002030000142
43. Cappelier JM, Besnard V, Roche SM, Velge P, Federighi M. Avirulent viable but non culturable cells of *Listeria monocytogenes* need the presence of an embryo to be recovered in egg yolk and regain virulence after recovery. *Vet Res.* 2007 Jul-Aug; 38(4): 573-83. DOI: 10.1051/vetres:2007017
44. Bunic S, Avery SM, Rogers AR. Listeriolysin O production and pathogenicity of non-growing *Listeria monocytogenes* stored at refrigeration temperature. *Int J Food Microbiol.* 1996 Aug; 31(1-3): 133-47. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(96\)00973-7](https://doi.org/10.1016/0168-1605(96)00973-7)
45. Ferreira A, O'Byrne CP, Boor KJ. Role of B in Heat, Ethanol, Acid, and Oxidative Stress Resistance and during Carbon Starvation in *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol.* 2001 Oct; 67(10): 4454-57. DOI: 10.1128/AEM.67.10.4454-4457.2001
46. Sue D, Fink D, Wiedmann M, Boor KJ. sigmaB-dependent

gene induction and expression in *Listeria monocytogenes* during osmotic and acid stress conditions simulating the intestinal environment. *Microbiology*. 2004 Nov; 150(Pt 11): 3843-55. DOI: 10.1099/mic.0.27257-0

47. Ferreira A, Sue D, O'Byrne CP, Boor KJ. Role of *Listeria monocytogenes* sB in survival of lethal acidic conditions and in the acquired acid tolerance response. *Appl Environ Microbiol*. 2003

May; 69(5): 2692-98. DOI: 10.1128/aem.69.5.2692-2698.2003

48. Sue D, Boor KJ, Wiedmann M. Sigma(B)-dependent expression patterns of compatible solute transporter genes *opuCA* and *lmo1421* and the conjugated bile salt hydrolase gene *bsh* in *Listeria monocytogenes*. *Microbiology*. 2003 Nov; 149(Pt 11): 3247-56. DOI: 10.1099/mic.0.26526-0