Original Paper

Expression of the *hly* and *inlA* genes of *Listeria monocytogenesgenes* 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 *inl*A genes of *Listeria monocytogenesgenes* 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]

Article ID: Vol22-27

تحقیقی

بیان ژن‌های *hly* و *inlA* باکتری *Listeria monocytogenes* در وضعیت زنده اما غیر قابل کشت (VBNC) در دمای ٤ 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

*** دکتر علیجان تبرائی**، استاد ویروس شناسی، مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران. ORCID ID: 0000-0002-8167-5469

دکتر مهدی ذوالفقاری، استادیار فرآوری محصولات شیلاتی، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.
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 ٤ درجه سانتی‌گراد انجام شد.*

روش بررسی: *در این مطالعه توصیفی آزمایشگاهی 10^6 باکتری در اواسط رشد لگاریتمی به محیط کشت BHI Agar غنی تلقیح و تا زمان از دست رفتن کشت در دمای یخچال (٤ 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 همولایزین 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 به‌نظر 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 ۳۲۴۲۴۱۵۵

* نویسنده مسؤول دوم : دکتر علیجان تبرائی ، 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

لیستریا مونوسیتوژنز (*Listeria monocytogenes*) یک پاتوژن غذازاد گرم مثبت است که سرما دوست بوده و توانایی تحمل درصد بالای نمک (بیش از ۱۰درصد) را دارد. در شرایط اپتیمم در محدوده دمای ۴۵-۱ درجه سانتی‌گراد و غلظت نمک بین ۱۵-۰ درصد رشد می‌کند (۱و۲). همچنین این باکتری در بسیاری از محصولات غذایی که مدت زمان نگهداری طولانی دارند؛ رشد می‌کند (۵-۳). محصولات آماده مصرفی که رشد این پاتوژن را حمایت می‌کنند و فرایند حرارتی اضافه‌ای را توسط مصرف کننده 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

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 گروه‌ها مرگ و میر ناشی از لیستریوزیس می‌تواند 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 میکروارگانیسم 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* به‌طور طبیعی کمتر اتفاق می‌افتد و محصولات شیلاتی عمدتاً ماندگاری کوتاهی دارند؛ ماهی آلوده به *لیستریا* در دمای ۴ درجه سانتی گراد یا کمتر نگهداری می‌شود 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 می‌شود (۱۳و۱۴). پیش‌بینی شده است که در محصولات نگهداری شده در شرایط دمایی معمول خرده فروشی و مصرف کننده، شمار *لیستریا* می‌تواند به سطحی برسد که باعث عفونت در افراد با سیستم ایمنی ضعیف گردد (۱۵). بدون مداخله مناسب شمار موارد لیستریوزیس انسانی می‌تواند چند دهه آینده به دلیل افزایش در نسبت جمعیتی که بسیار مستعد این بیماری هستند؛ افزایش یابد (۱۶و۱۷).

باکتری *لیستریا* در محیط از نظر ساختاری و متابولیکی به‌وسیله مواد ضدعفونی کننده (آمین‌ها، ترکیبات چهار تایی آمونیوم و پراکسیدها)، محافظ‌ها، گرما، سرما یا فریز کردن، خشک کردن، تغیرات اسمزی و اسید تحت استرس هستند. مواجهه با استرس در صورت زنده ماندن باکتری منجر به افزایش سازگاری باکتری به استرس‌های محیطی می‌شود و مقاومت سویه‌ها به سطح طبیعی از استرس‌های همولوگ و هترولوگ (Cross-protection، حفاظت متقاطع) افزایش پیدا کند. این مقاومت می‌تواند از طریق تولید پروتئین‌های استرس، جهش یا انتقال ژنتیکی مثل تبدیل (Transformation)، انتقال (Transduction) یا ترکیب (Conjugation) حاصل شود (۱۸). علاوه بر این سازگاری، *لیستریا* از توانایی ویژه‌ای برای مقابله با عوامل نامساعد محیطی برخوردار است که طی آن باکتری وارد حالتی به نام «زنده اما غیر قابل کشت» (Viable but non culturabale: VBNC) می گردد که به آن اجازه زنده ماندن در برخی شرایط سخت محیطی را می دهد. VBNC باکتری‌ها نشان‌دهنده حالتی است که باکتری موفق به رشد در محیط‌های باکتریولوژیک معمول و استاندارد نیست. این باکتری‌ها با وجود فعالیت متابولیکی بسیار پایین، به محض احیاء شدن می‌توانند قابلیت کشت خود را بازیابند (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 سانتی‌گراد طی ۵ تا ۱۲ هفته به فاز VBNC داشت (۲۰). تمایز بین زنده ماندن و قابلیت کشت برای پاتوژن‌ها اهمیت بسیاری دارد. چرا که ممکن است از دست دادن قابلیت کشت، از دست رفتن بیماری‌زایی را تضمین نکند. بنابراین در مورد خطر ناشی از سلول‌های VBNC هیچگونه اطمینانی وجود ندارد. برخی از محققان اثرات بیماری‌زایی ناشی از سلول‌های VBNC را نشان داده‌اند. در حالی که دیگران ادعا کرده‌اند که قابلیت کشت و بیماری‌زایی به طور همزمان از دست می‌رود. *hly* کد کننده لیستریولیزین O است که برای لیز حفره مانند و ورود به سیتوزول سلول ضروری است (۲۱). همولیزین *لیستریا مونوسیتوژنز* به عنوان عامل بیماری‌زایی مهم تشخیص داده شده است (۲۲) و ترشح آن برای ترویج رشد درون سلولی و تشخیص سلول‌های T ارگانیسم ضروری است (۲۳و۲۴). همولیزین تعیین کننده لیستریولیزین O (۲۵) اولین بار از کشت *لیستریا مونوسیتوژنز* جدا شد (۲۵). ژن *inlA* در تهاجم باکتری با انتروسیتوز نقش دارد (۲۶). لذا این مطالعه به منظور بیان ژن‌های *hly* و *inlA* باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* در وضعیت زنده اما غیرقابل کشت (VBNC) در دمای یخچال (۴ درجه سانتی‌گراد) انجام شد.

روش بررسی

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

سویه مورد مطالعه و کشت آن: باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* سویه استاندارد ATCC 19115 (سروتایپ 4b)، از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران به صورت لیوفیلیزه تهیه شد. باکتری در محیط BHI براث 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 براث شده و پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در انکوباتور شیکردار در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد با ۲۰۰ rpm در ویال‌های ۱/۵ میلی‌لیتری به همراه گلیسرول در دمای منفی ۷۰ درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

آزمون‌های شناسایی باکتریایی: به منظور تائید سویه استاندارد تهیه شده آزمون‌های تائیدی بیوشیمیایی از قبیل رنگ‌آمیزی گرم، تست حرکت، کاتاز، اکسیداز، بتاهمولیز، تست CAMP، MR، VP، بایل اسکولین، OF و تخمیر قندهای گزیلوز، مالتوز و لاکتوز و

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 مونوسیتوژنز* به حالت VBNC در دمای یخچال (۴ درجه سانتی‌گراد) در محیط کشت BHI Agar غنی شده با ۲ درصد عصاره مخمر و ۰/۵درصد 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 براث استریل منتقل و در انکوباتور شیکردار با دور ۲۰۰ rpm انکوبه گردید. رشد باکتری مورد نظر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتورمتر 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 در 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 باکتری ها در جذب ۰/۴ در ۷۰۰۰ دور به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند و برای کشت روی محیط BHI Agar با سه مرحله رقیق سازی 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 ساب کالچر تهیه گردید. برای این منظور باکتری‌ها ابتدا در محیط BHI براث 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 (Houskeeping gen) و ژن‌های *hly* و *inlA* به عنوان 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 براث اضافه شد و تا رسیدن به ۰/۴ ~ OD در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه و در نهایت با رقیق‌سازی تعداد آنها به 10^6cfu/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 (۲min ، ۱۰۰۰۰ rpm)؛ ب) افزودن ۴۰µl آنزیم لیزوزیم ۰/۴ mg (۲۰min ، ۳۷ درجه سانتی‌گراد)؛ ج) افزودن ۴۰۰ µl محلول لیز لایزیز 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؛ ی) افزودن ۳۰ µl از محلول RNase free water انکوبه شده در دمای ۵۵ درجه سانتی گراد 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 سانتی گراد به‌مدت ۳۰ دقیقه انکوبه گردید. در انتها مقدار ۱ µl EDTA به میکروتیوب افزوده شد و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد به‌منظور 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 به‌صورت 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 Riverse [0.5 µl (10 pm)], DW (12.8 µl)

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

جدول ۱ : توالی پرایمرهای مورد استفاده

نام ژن	توالی الیگونوکلئوتید	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: TTGGCGGCACATTTGTCAC*	۱۳۹	۶۰
inlA	*F: CGGATGCAGGAGAAAATCC* *R: CTTTCACACTATCCTCTCC*	۹۵	۶۰

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 عکس‌برداری 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 سانتی گراد انکوبه و همولیز بتا آن مورد بررسی قرار گرفت. سپس بیان هر سه ژن *16s rRNA*، *hly* و *inlA* بررسی شد.

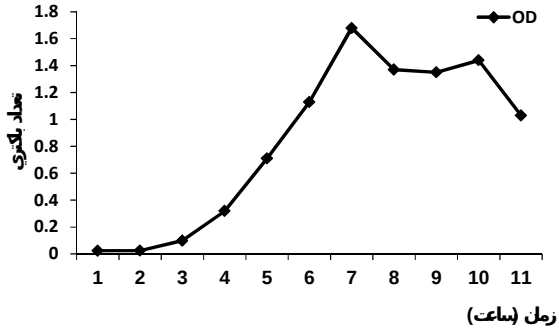
توالی پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه در جدول یک آمده است (۳۰و۳۱).

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 اسکوئر برای آنالیز داده‌های ناپارامتریک استفاده گردید. تمام آنالیزها در سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ و با نرم افزار SPSS-16 صورت پذیرفت. نتایج به‌دست 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 (10^9) به اواسط مرحله لگاریتمی رسیدند.

بررسی کشت پذیری باکتری ها در محیط BHI آگار غنی شده: نتایج بررسی کشت پذیری در محیط غنی شده با عصاره مخمر و سدیم پیروات از پلیت باکتری BHI آگار غنی شده نشان داد که نمونه مورد نظر پس از ۵ ماه نگهداری در دمای یخچال (۴درجه سانتی گراد) کشت پذیری خود را از دست داد. لگاریتم تعداد باکتری‌ها در نمودار ۲ ذکر شده است.

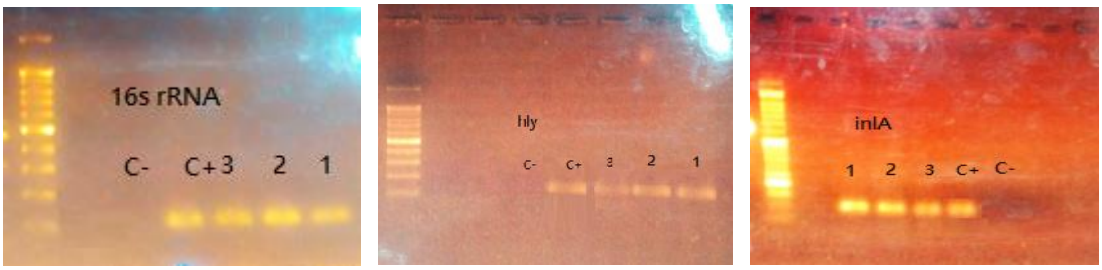


نمودار ۱ : نتایج بررسی روند رشد باکتری با روش سنجش میزان جذب نور در طول موج ۶۰۰ nm

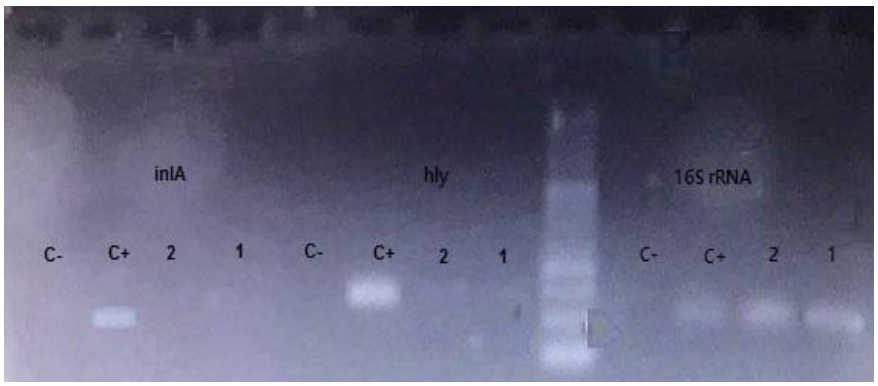
نمودار ۲: لگاریتم تعداد باکتری‌ها پس از ۵ ماه نگهداری در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد

نتایج بررسی بیان ژن: نتایج بررسی بیان ژن‌های *16s rRNA*، *hly* و *inlA* قبل از شوک سرمایشی ۴ درجه سانتی گراد 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 سانتی گراد به مدت ۲۰ دقیقه قادر به زنده ماندن بود و ژن خانه‌گردان خود را نیز بیان نمود؛ اما هیچگونه



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 مونوسیتوژنز –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 بترتیب ۱، ۲ و ۳ –کنترل مثبت (C+) شامل DNA لیستریا مونوسیتوژنز –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 بترتیب ۱، ۲ و ۳ –کنترل مثبت (C+) شامل DNA لیستریا مونوسیتوژنز –کنترل منفی (C-) شامل نمونه بدون سمپل

بیانی در ژن‌های بیماری‌زا *hly* و *inlA* مشاهده نشد (شکل ۲).

از تطابق نتایج بررسی بیان ژن با نتایج بررسی کشت‌پذیری باکتری، می‌توان به این نتیجه رسید که باکتری در انتهای دوره وارد حالت VBNC شده و باکتری زنده است؛ اما ژن‌های بیماری‌زایی 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 خون‌دار کشت‌پذیری خود را به‌دست آورد و تشکیل کلونی داد و همچنین قدرت همولیزکنندگی نیز در این محیط از خود نشان داد.

نتایج بررسی بیان ژن در محیط بلاد آگار: نتایج بررسی بیان ژن‌های بیماری‌زا در باکتری‌های احیاء شده از حالت VBNC نشان داد که ژن بیماری‌زایی *hly* مجدداً در این باکتری‌ها روشن شد و بیان گردید؛ اما در مورد ژن *inlA* هیچگونه بیانی مشاهده نشد (شکل ۳).

بحث

از آنجایی که باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* در همه انواع محیط‌ها

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 مونوسیتوژنز* در دمای ۴ درجه سانتی گراد و همچنین در شوری ۳۰درصد در دمای یخچال در شرایط قحطی مواد غذایی به‌ترتیب 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 سانتی گراد و سویه *ScottA* در دمای ۴ درجه سانتی گراد 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 سانتی گراد 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 متابولیکی پایین باکتری در دماهای پایین، در واقع سرمادوست 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 به‌عنوان یکی از عوامل محرک ورود باکتری به حالت VBNC عنوان کرد. آزمون‌های باکتریولوژیکی کشت پایه قادر به تشخیص ارگانیسم‌های غیر قابل کشت نیستند و خطر مصرف *لیستریا مونوسیتوژنز* 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 سانتی گراد 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 مونوسیتوژنز* است (۳۳). در گزارشی دیگر شاهد سنتز مداوم mRNA ژن *hly* در سلول‌های *لیستریا مونوسیتوژنز* در فاز VBNC بودند که نشان دهنده پتانسیل بیماری‌زایی آنهاست (۲۰).

دما برای بیان ژن‌های اصلی بیماری‌زایی در *لیستریا* مهم است (۳۷). در این ارتباط بیان ژن‌های بیماری‌زایی *actA*، *hly*، *inlA* و *prfA* *لیستریا مونوسیتوژنز* در سه دمای مختلف صفر، ۴ و ۲۰ درجه سانتی گراد مورد بررسی قرار گرفت و اعلام شد که بیان ژن‌های *hly* و ilnA در دمای ۲۰ درجه سانتی گراد بیش از دمای ۴ درجه سانتی گراد است (۳۸). دلیل افت بیان ژن در دمای پایین می‌تواند نرخ متابولیکی پایین باکتری در دماهای پایین باشد (۲۷)؛ اما در مقابل مشخص شده در دمای پایین قدرت بیماری‌زایی *لیستریا* مونوسیتوژنز افزایش می‌یابد (۳۹). همچنین گزارش شده باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* پس از رشد در دمای ۴ درجه سانتی گراد و تزریق به تخم مرغ جنین‌دار بیماری‌زایی اش نسبت به این حالت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد بیشتر بود. بنابراین عنوان شد که با نگهداری برخی سویه‌های *لیستریا مونوسیتوژنز* در دمای ۴ درجه سانتی گراد 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 می‌توانند بیان ژن بیماری‌زای *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). همچنین‌احیا سلول‌های VBNC *Aeromonas hydrophila* توسط محیط کشت تکمیلی با مواد احیاء کننده H2O2، کاتالاز و سدیم پیروات گزارش شده است (۴۲)؛ اما در پژوهشی دیگر عنوان شد سدیم پیروات 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 VBNCخاصیت 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 بیماری‌زایی‌شان 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 مونوسیتوژنز* در فاز VBNC که نشان‌دهنده پتانسیل بیماری‌زایی آنهاست؛ اما در تلقیح داخل صفاقی موش‌ها و

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 *hly*، *inlA* 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 این‌رو کنترل دمایی طی پروسه فراوری 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 (۴۵و۴۶). همچنین فعالیت Sigma-B به مرحله رشد باکتری بستگی دارد که حداکثر فعالیت در فاز سکون باکتری است (۴۷و۴۸).

به‌نظر 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 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 به‌راحتی 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 می گردد. 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 – ۱۳۹۴/۱۱/۲۰) 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 کلته برای اخذ درجه دکتری در رشته فرآوری محصولات شیلاتی از دانشکده شیلات 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

1. 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

2. 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.

3. 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.

4. Rørvik LM, Yndestad ML. monocytogenes in foods in Norway. Intl J Food Microbiol. 1991 Jun; 13(2): 97-104. DOI: 10.1016/0168-1605(91)90052-q

5. Ryser ETE, Marth EH. Listeria listeriosis and food safety. 2nd ed. New York: Marcel Dekker. 1999; p: 738.

6. Brett MS, Short P, McLauchlin J. A small outbreak of listeriosis associated with smoked mussels. Int J Food Microbiol. 1988 Sep; 43(3): 223-29. DOI: 10.1016/s0168-1605(98)00116-0

7. Dillon RM, Patel TR. Listeria in seafoods: A review. J Food Prot. 1992 Dec; 55(12): 1009-15. DOI: 10.4315/0362-028X-55.12.1009

8. Varnam AH. Foodborn pathogens. 1st ed. London: Wolf publishing Ltd. 1991; pp: 327-53.

9. Ben-Embarek PK. Presence, detection and growth of L. monocytogenes in seafoods: A review. Int J Food Microbiol. 1994 Sep; 23(1): 17-34. DOI: 10.1016/0168-1605(94)90219-4

10. McLauchlin J. The pathogenicity of L. monocytogenes: A public health perspective. Rev Med Microbiol. 1997; 8: 1-14.

11. 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

12. Shank FR, Elliot EL, Wachsmuth IK, Losikoff ME. US position on L. monocytogenes in foods. Food Control. 1996; 7(4/5): 229-34.

13. 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

14. 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 findingsontheviablebut nonculturablestate inpathogenicbacteria. 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 monocytogenesisolates 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 0 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 coliO157:H7, Salmonella spp., Staphylococcus aureus andListeria monocytogenesin kimchi by multiplex polymerase chain reaction (mPCR). J Microbiol. 2006 Feb; 44(1): 92-7.

32. Besnard V, Federighi M, Declerq 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-CulturableListeria monocytogenescells 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

45. Ferreira A, O'Byrne CP, Boor KJ. Role of çB 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