

مقاله علمی - پژوهشی:

اختلافات جدایه‌های بالینی و غذایی باکتری *Listeria monocytogenes* در میزان بیان ژن‌های *prfA*، *sigB*، *lmo1847*، *lmo1634*، *hly*، *inlA* در محیط آبگوشت میگو

اسماعیل عبداله‌زاده^{*}، امید جعفری^۱، محمد حسن‌زاده صابر^۱

*Abdollahzadeh@rocketmail.com

۱-انستیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری، مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، رشت، ایران

تاریخ پذیرش: خرداد ۱۴۰۳

تاریخ دریافت: فروردین ۱۴۰۳

چکیده

Listeriosis یک بیماری مهم با نرخ مرگ‌ومیر بالاست (تا ۳۰ درصد) که باکتری *Listeria monocytogenes* آن را ایجاد می‌کند. امروزه، تحقیقات نشان می‌دهد، باکتری *L. monocytogenes* در محصولات شیلاتی شیوع دارد. لذا، بررسی و کنترل بیان ژن‌های بیماری‌زا و ژن‌های عامل چسبندگی سویه‌های مختلف این باکتری در مواد غذایی حائز اهمیت است. در مطالعه حاضر، میزان بیان ژن‌های *prfA*، *sigB*، *lmo1847*، *lmo1634*، *hly*، *inlA* در دو سویه مختلف غذایی و بالینی *L. monocytogenes* تحت تاثیر نمک طعام و آبلیمو در آبگوشت میگو مورد بررسی قرار گرفت. نتایج آزمون t مستقل نشان داد که میزان بیان *prfA* در تیمارهای مرتبط با سویه بالینی به صورت معنی‌داری بیشتر از میزان بیان در سویه غذایی بود ($p < 0.05$). به طور مشابه، میانگین بیان هر دو ژن عامل چسبندگی (*lmo1634* و *lmo1847*) و ژن عامل استرس (*sigB*) برای سویه بالینی به صورت معنی‌داری بیشتر از سویه غذایی بود. نقش آبلیمو در افزایش بیان ژن‌های بیماری‌زایی و چسبندگی در دو جدایه غذایی و بالینی به صورت معنی‌داری بیشتر از سطوح مختلف نمک طعام بود ($p < 0.05$). در مجموع، می‌توان اظهار داشت که میزان بیان ژن‌های کلیدی چسبندگی و بیماری‌زایی تحت تاثیر نگهدارنده‌ها و استرس‌های محیطی در سویه‌های مختلف *L. monocytogenes* متفاوت است.

کلمات کلیدی: *Listeria monocytogenes*، تنظیم رونویسی ژن، میگو، بیماری‌زایی

*نویسنده مسئول



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

مقدمه

Listeria monocytogenes یک باکتری گرم مثبت هوازی تا بی‌هوازی اختیاری میله‌ای شکل، پاتوژن درون سلولی فرصت طلب و عامل عمده عفونت‌های انسانی ناشی از غذا در سراسر جهان است. این باکتری در نوزادان، افراد سالخورده، افراد دارای نقص سیستم ایمنی و زنان باردار موجب ایجاد بیماری Listeriosis است (Välimaa et al., 2015; Fagerlund et al., 2016). در ایالت متحده آمریکا (۲۰۱۳)، ۱۹/۵ درصد مبتلایان به Listeriosis جان خود را از دست دادند.

اغلب عفونت‌های ناشی از بیماری Listeriosis به صورت موردی بروز پیدا می‌کنند، اما همه‌گیری‌های ناشی از این بیماری نیز به‌وفور در سراسر جهان گزارش شده است. باکتری *L. monocytogenes* به صورت پراکنده در سطح خاک، سبزیجات، مدفوع حیوانات، کانال‌های آب و رودخانه‌ها، کودها، گیاهان و حیوانات حضور دارد. این باکتری در خاک، تا ۲۹۵ روز و در مواد گیاهی تا ۱۲-۱۰ سال زنده می‌ماند (Swaminathan and Gerner-Smidt, 2007; Abolhasani et al., 2020).

امروزه گزارش‌هایی وجود دارد که نشان می‌دهد، مصرف محصولات غذایی آماده مصرف نظیر محصولات شیلای دودی، هات داگ، شیر و پنیر، منشأ بروز بیماری بوده‌اند (Jensen et al., 2016). در مطالعه Abdollahzadeh و همکاران (۲۰۱۶) از مجموع ۲۰۱ نمونه ماهی، میگو و ناگت (ماهی و میگو) جمع آوری شده از سطح تهران و کرج، حدود ۸/۸ درصد آلوده به *Listeria* بوده‌اند. نتایج تحقیق Momtaz و Yadollahi (۲۰۱۳) در شهرهای اصفهان و شهرکرد، میزان شیوع جنس *Listeria* و *L. monocytogenes* در ماهیان خام به ترتیب حدود ۱۰/۴۵ و ۷/۲۵ درصد بوده است.

ویژگی‌های کلیدی که *L. monocytogenes* را قادر به زنده ماندن و انتشار درون سلول‌های میزبان می‌کند شامل توانایی برای ورود به سلول‌های میزبان و انتشار سلول به سلول آنهاست. زندگی انگلی درون سلولی، احتیاج به بیان یکسری از ژن‌ها دارد. بسیاری از این ژن‌ها در کلاستر ژنی 9-kb جمع شده‌اند که به آنها جزیره بیماری‌زایی *Listeria*

(LIPI-1)^۱ گفته می‌شود. این جزیره بیماری‌زایی ما بین دو ژن *prfA* و *orfX* واقع شده که خود شامل شش ژن به نام‌های *prfA*، *mpl*، *hly*، *actA* و *plcB* است. فعال کننده رونویسی *PrfA*، عمدتاً رونویسی همه این ژن‌ها را کنترل می‌کند (Nadon et al., 2002; Dussurget 2008). در بدن میزبان، بیان هر کدام از ژن‌های بیماری‌زایی دارای عملکرد اختصاصی خاص خود است. برای مثال، بیان ژن *inlA* باعث عبور باکتری از سلول‌های میزبان می‌شود. بیان ژن *hly* باعث القاء آپتوز^۲ لنفوسیتی، سرکوب سیتوکین‌های پیش‌التهابی، سبب تخریب غشاء واکوئلی شده و موجب رهايش باکتری به داخل سیتوپلاسم سلول میزبان می‌گردد. ژن *sigB* باعث تنظیم ژن‌های بیماری‌زا در پاسخ به محرک‌های استرس‌زا می‌شود. افزایش بیان ژن *lmo1634* باعث تولید پروتئین چسبندگی لیستریا (LAP) می‌شود که انتقال باکتری را از سد روده تسهیل می‌کند. علاوه بر *lmo1634*، ژن *lmo1847* نیز در چسبندگی باکتری نقش مهمی دارد (Lopes-Luz et al., 2021; Lakicevic et al., 2022).

تعیین اثرات ژن‌های دخیل در بیماری‌زایی و ارزیابی اثرات ترکیبات غذایی در میزان بیان آنها، موضوع مهم تحقیقات مختلفی بوده است، زیرا کنترل ژن‌های بیماری‌زایی به‌خصوص ژن‌های چسبندگی در کاهش عفونت‌های Listeriosis موثر است. مطالعات پیشین بر چندین ژن به‌خصوص ژن‌های موجود در جزیره بیماری‌زایی *Listeria* (LIPI-1) و اینترنالین‌ها، برای ایجاد ارتباط بین حضور و پتانسیل بیماری‌زایی آنها به شکست انجامید. با این حال، بروز جهش‌های اختصاصی نقطه‌ای به صورت موفقیت‌آمیزی با قابلیت بیماری‌زایی ایزوله‌های معینی ارتباط داده شده است. میزان بیان ژن‌های کلیدی دخیل در بیماری‌زایی باکتری *L. monocytogenes* با عوامل مختلف محیطی نظیر مقادیر pH بیرون سلولی (Behari and Youngman, 1998)، کمبود مواد غذایی (Wang et al., 2022)، دما (Lukowiak et al., 2004)، حضور ترکیبات گیاهی و مواد موثره آنها (Guan et al., 2023)، کربوهیدرات‌ها

^۱ *Listeria* Pathogenicity Island 1 (LIPI-1)

^۲ Apoptosis (روند فیزیولوژیک مرگ سلول)

TSB اضافه و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. کشت‌های مورد نیاز برای ادامه آزمایش‌ها در TSA شیب‌دار در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت حداقل ۴ هفته نگهداری شدند. جهت شمارش باکتری‌های تلقیح شده به نمونه‌های گوشت، ابتدا رقت‌های سریالی با کمک سرم فیزیولوژی تهیه و سپس از هر رقت، ۱۰۰ میکرولیتر با محیط کشت پلیت کانت آگار (PCA) به صورت آمیخته مخلوط و پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند (Pilevar et al., 2020).

آماده سازی آبگوشت میگو

جهت تهیه آبگوشت میگو، ابتدا گوشت میگو (*Litopenaeus vannamei*) دو بار چرخ شده و به نسبت برابر (w/w) با آب مقطر مخلوط گردید. پس از یک ساعت میکس کردن با کمک مخلوط کن، سوپرناتانت رویی با کمک دو بار سانتریفوژ در ۴۰۰۰ g به مدت ده دقیقه استخراج شد. سپس سوپرناتانت رویی فیلتر (با کمک گاز) و استریل شد. آبگوشت میگو تا زمان تلقیح باکتری، در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید.

تلقیح باکتری *Listeria*

جهت تهیه میزان تلقیح از باکتری‌های مورد آزمایش، با لوپ استریل، انتقال باکتری از میکروتیوب‌های اپندرف به محیط آبگوشت BHI و نگهداری به مدت ۱۸ ساعت در ۳۷ درجه انجام گردید. مجدداً کشت دومی از این کشت ۱۸ ساعته اول در آبگوشت BHI دیگر تهیه شده و با لوپ استریل از این کشت‌های ۱۸ ساعته دوم درون لوله‌های دارای آبگوشت قلب و مغز که قبلاً استریل شده بودند، کشت داده شد و از لوله‌های کشت داده شده سریال‌های رقت تهیه شده و با استفاده از دستگاه اسپکتوفوتومتر در طول موج ۶۰۰ نانومتر، جذب نوری لوله‌های مذکور خوانده شد (Abdollahzadeh et al., 2014). از محیط PCA برای شمارش میکروبی و به‌دست آوردن منحنی کالیبراسیون استفاده گردید. میزان جذب نوری ۰/۱-۰/۰۸ معادل 8 Log CFU/ml بود که به هر نمونه آبگوشت میگو میزان 7 Log CFU/ml تلقیح شد.

(Milenbachs et al., 1997; Shi et al., 2013)، باکتریوسین‌ها (Sheikh-Zeinoddin et al., 2000; Bowman et al., 2022)، حرارت (Melian et al., 2022)، فرآیند فشار هیدرواستاتیک بالا، ضد عفونی کننده‌های مختلف، لاکتات و دی استات (Kastbjerg et al., 2011; Stasiewicz et al., 2010)، به‌خوبی به مورد مطالعه قرار گرفته است. نتایج تحقیقات نشان می‌دهد، میزان بیان ژن‌های بیماری‌زا متأثر از عوامل مختلف محیطی مختلف است. با وجود این، فقط تعداد اندکی از مطالعات در محیط واقعی غذا، انجام شده است.

تاکنون مطالعه‌ای بر بررسی تفاوت بیان ژن‌های چسبندگی و بیماری‌زایی سویه‌های مختلف *L. monocytogenes* (بالینی و غذایی) در محیط غذایی میگو انجام نپذیرفته، لذا، در تحقیق حاضر بیان ژن‌های عامل چسبندگی و بیماری‌زایی دو سویه مختلف غذایی و بالینی *L. monocytogenes* تحت تاثیر نمک طعام و آبلیمو در آبگوشت میگو، مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش کار

آماده‌سازی سویه‌ها

در تحقیق حاضر، از دو سویه *Listeria monocytogenes* که سابقاً از نمونه‌های غذایی و بالینی جداسازی شده بودند، استفاده گردید. در تحقیقات گذشته نویسندگان، سویه‌های جداسازی شده با روش PCR و آزمون‌های بیوشیمیایی در کنار سویه استاندارد *L. monocytogenes* مورد تأیید قرار گرفت (Abdollahzadeh et al., 2016). همچنین باکتری‌های مورد استفاده در تحقیق حاضر، در آزمایشگاه همکار سازمان بهداشت جهانی در انستیتو پاستور فرانسه ثبت و مورد تأیید قرار گرفته است (شماره‌های رفرنس ۱۷/۰۱۰۲۵ برای سویه غذایی و ۱۷/۰۱۰۲۶ برای سویه بالینی). به منظور نگهداری طولانی‌مدت، باکتری‌ها در محیط حاوی گلیسرول (۲۵ درصد) و TSB (۷۵ درصد حجمی/حجمی) در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. پس از دو بار پاساژ در TSB به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد احیاء شدند. سپس در محیط TSA کلنی‌های تک، جداسازی شده و به ۱۰ میلی لیتر

و میزان ۰/۸ میکرولیتر پرایمر (F و R) بود. مراحل RT-PCR شامل ۱۵ دقیقه نگهداری اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد و سپس ۴۰ سیکل در دماهای مختلف (۲۵ ثانیه ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ ثانیه در ۶۰ درجه و ۳۰ ثانیه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد) بود (Hosseini et al., 2024).

روش تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

ابتدا میزان بیان به دست آمده برای ژن‌های هدف (Ct) با کمک ژن رفرنس (16S) نرمال سازی شد. سپس میزان بیان نسبی ژن‌ها با کمک فرمول $2^{-\Delta\Delta Ct}$ محاسبه گردید. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS ورژن ۲۳ صورت پذیرفت. جهت بررسی نرمال بودن داده‌ها از آزمون K-S استفاده گردید. جهت بررسی اختلافات معنی‌دار بین تیمارهای مختلف، از آزمون t مستقل و آزمون آنالیز واریانس یک طرفه (با آزمون تعقیبی دانکن) استفاده شد. اختلافات بین میانگین‌های میزان بیان، در سطح $p < 0.05$ معنی‌دار گزارش شد.

نتایج

جهت مقایسه دو سویه *Listeria monocytogenes* مورد مطالعه، میانگین بیان ژن‌های مختلف برای هر دو جدایه غذایی و بالینی محاسبه شد (جدول ۲). نتایج آزمون t مستقل نشان داد میانگین بیان ژن‌های *hly* و *inlA* در همه تیمارهای مورد مطالعه (دو سطح مختلف نمک طعام و آبلیمو)، در دو سویه تفاوت معنی‌داری نداشتند ($p > 0.05$). در مقابل، نتایج آزمون t مستقل برای ژن *prfA* نشان داد که میزان بیان در تیمارهای سویه بالینی به صورت معنی‌داری بیشتر از میزان بیان سویه غذایی است ($p < 0.05$). به طور مشابه، میانگین بیان هر دو ژن چسبندگی (*lmo1847* و *lmo1634*) و ژن استرس (*sigB*) در تیمارهای مورد مطالعه برای سویه بالینی به صورت معنی‌داری بیشتر از سویه غذایی بود ($p < 0.05$).

در سویه غذایی، میزان بیان ژن‌های بیماری‌زایی، چسبندگی و استرس پس از ۴۸ ساعت نگهداری (۳۷ درجه سانتی‌گراد) در دو تیمار نمک طعام (۵ و ۲ درصد) و تیمار آبلیمو (۵۰ میکرولیتر بر میلی لیتر) به صورت معنی‌داری بیشتر از تیمار

بر اساس مطالعات پیشین و انجام پیش آزمون، غلظت نمک طعام و آبلیمو (غلظت‌های کمتر از MBC و MIC) به نحوی انتخاب شد که باعث مرگ و میر جمعیت میکروبی تلقیح شده به میگو نشود. تیمارهای مختلفی از نمک طعام (۲ و ۵ درصد) و آبلیمو (۲۵ و ۵۰ میکرولیتر در میلی لیتر) در آبگوشت میگو تهیه شد (Pilevar et al., 2020; Abdollahzadeh et al., 2021). سپس نمونه‌ها در دمای ۳۷ (دمای اپتیمم رشد) و ۱۲ (به عنوان دمای نامناسب یخچالی) درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت نگهداری شدند (Huang et al., 2023).

بررسی بیان ژن‌های بیماری‌زایی و چسبندگی در آبگوشت میگو

نمونه‌برداری از تیمارهای مختلف آبگوشت میگو در ساعت صفر و ۴۸ ساعت نگهداری انجام پذیرفت. با کمک سانتریفوژ یخچال دار (در دو دمای ۱۲ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد) سوپرناتانت میگو از بایومس باکتریایی جداسازی شد (با دور ۴۰۰۰ g به مدت ۵ دقیقه) و بایومس باکتریایی با ۲۰۰ میکرولیتر از محلول RNeasy lysis buffer مخلوط گردید. آزمایش‌ها سه تکرار انجام پذیرفت (Hadjilouka et al., 2016; Hosseini et al., 2024).

جهت استخراج RNA، از کیت GeneAll Hybrid-R™ استفاده گردید. از محلول RiboEx (موجود در کیت) به منظور غیرفعال سازی RNases استفاده شد. پرایمرهای مورد استفاده شامل ژن‌های رفرنس^۱، بیماری‌زایی و چسبندگی بودند (جدول ۱). ژن 16S به عنوان ژن مرجع (رفرنس) انتخاب و کمیت و کیفیت نمونه‌های RNA استخراجی با کمک دستگاه نانودراپ ارزیابی شد (Hadjilouka et al., 2016).

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز بی‌درنگ (Real-Time PCR)

آزمایش‌های بیان ژن در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر انجام پذیرفت. ترکیب واکنش شامل ۱۲/۲ میکرولیتر آب، ۲ میکرولیتر cDNA، ۱۰ میکرولیتر مسترمیکس high Rox،

¹ Housekeeping

شاهد (بدون افزودنی و نگهدارنده) بود ($p < 0.05$). نتایج نسبتاً مشابهی برای سویه بالینی برای ژن‌های مذکور حاصل شد با این تفاوت که تیمار ترکیبی نمک طعام و آبلیمو دارای بیشترین تاثیر در افزایش بیان ژن‌هایی چسبندگی و بیماری‌زایی بود. همچنین نقش آبلیمو در افزایش بیان ژن‌های بیماری‌زایی و چسبندگی به صورت معنی‌داری بیشتر از سطوح مختلف نمک طعام بود ($p < 0.05$).

جدول ۱: توالی پرایمرهای مورد استفاده در آزمایش‌های بیان ژن

Table 1: The primer sequences used for gene expression experiments

Gene	Sequences	target	References
1 16s	GATGCATAGCCGACCTGAGA CTCCGTCAGACTTTCGTCCA	Housekeeping gene	(Hadjilouka <i>et al.</i> , 2016)
2 hly	TACATTAGTGGAAAGATGG ACATTCAAGCTATTATTACA	virulence gene	(Hadjilouka <i>et al.</i> , 2016)
3 inlA	TGTTACAAGAACCTACGGCACCACAA TTGGCGCTATATTGGGCATATAAGGTGATG	virulence gene	(Tiong and Muriana, 2016)
4 lmo1634	GTTGTTGCCGGC GTTACAC CGCGATA ATTGCTTTGAAAAGA	adhesion gene	(Upadhyay <i>et al.</i> , 2012)
5 lmo1847	GCGTGGATCC GCATGAAT GCATCCG CAGCACTTTGAAT	adhesion gene	(Upadhyay <i>et al.</i> , 2012)
6 sigB	CCAAGAAAATGGCGATCAAGAC CGTTGCATCATATCTTCTAATAGCT	stress response gene	(Hadjilouka <i>et al.</i> , 2016)
7 prfA	CGGGAAGCTTGGCTCTATTTG GCTAACAGCTGAGCTATGTGC	transcriptional activator of virulence genes	(Upadhyay <i>et al.</i> , 2012)

جدول ۲: مقایسه میزان بیان ژن دو سویه غذایی و بالینی *Listeria monocytogenes* در محیط آبگوشت میگو پس از ۴۸ ساعت در معرض قرارگیری با دو غلظت نمک طعام (۲ و ۵ درصد) و دو غلظت آبلیمو (۲۵ و ۵۰ میکرولیتر بر میلی‌لیتر) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد

Table 2: Comparison of gene expression of two food and clinical isolates of *Listeria monocytogenes* in shrimp broth after 48 hours of exposure to two concentrations of NaCl (2 and 5%) and two concentrations of lime juice (25 and 50 microliters/ml) at 37 degrees Celsius

Gene	Isolate types	Gene expression (the delta Ct average of treatments)
hly	Food	12.40 ± 1.12 ^a
	Clinical	12.67 ± 2.74 ^a
prfA	Food	11.07 ± 1.04 ^b
	Clinical	8.04 ± 3.84 ^a
inlA	Food	16.11 ± 1.79 ^a
	Clinical	14.54 ± 3.13 ^a
lmo1634	Food	19.84 ± 1.59 ^a
	Clinical	14.01 ± 3.38 ^b
lmo1847	Food	17.00 ± 1.64 ^a
	Clinical	12.08 ± 3.27 ^b
sigB	Food	19.22 ± 1.64 ^a
	Clinical	13.79 ± 3.29 ^b

دلتا سی تی کمتر معادل با بیان بیشتر در نظر گرفته شده است. حروف کوچک نشان‌دهنده تفاوت‌های معنی‌دار در تمامی تیمارهای در سویه‌های غذایی و بالینی است.

if delta CT has a small value, the gene is highly expressed. Small letters indicate significant differences between food and clinical isolates in studied treatments.

به منظور بررسی تأثیر همزمان کاهش دما (۱۲ درجه سانتی‌گراد) و حضور نگهدارنده‌ها بر دو سویه غذایی و بالینی، میزان بیان ژن‌های چسبندگی و استرس مورد بررسی قرار گرفت. نتایج آزمون t مستقل نشان داد، میانگین بیان ژن‌های چسبندگی (*lmo1634* و *lmo1847*) در دو سویه مورد مطالعه پس از ۴۸ ساعت نگهداری در تیمارهای

مختلف در سویه بالینی به صورت معنی‌داری بیشتر از سویه غذایی بود، اما تفاوت معنی‌داری در میزان بیان ژن استرس (*sigB*) در دو سویه مد نظر مشاهده نشد ($p > 0.05$). نتایج آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه برای سویه غذایی در دمای ۱۲ درجه سانتی‌گراد نشان داد که نمک طعام (پس از ۴۸ ساعت نگهداری) موجب کاهش معنی‌دار میزان بیان ژن *lmo1634* می‌شود. اگرچه آبلیمو باعث کاهش بیان ژن *lmo1634* شد اما این کاهش از لحاظ آماری معنی‌دار نبود. میزان بیان ژن *lmo1847*، در تمامی تیمارها نسبت به گروه

شاهد به صورت معنی‌داری کاهش یافت. به طور مشابه، میزان بیان ژن استرس (*sigB*) در تیمارهای مورد مطالعه نسبت به گروه شاهد کاهش معنی‌داری نشان داد ($p < 0.05$). در سویه بالینی، میزان بیان ژن *lmo1634* در اکثر تیمارهای مورد مطالعه (به جز تیمار ترکیبی نمک طعام و آبلیمو)، نسبت به گروه شاهد کاهش معنی‌داری داشتند. برای ژن چسبندگی *lmo1847* میزان بیان در تمامی تیمارها نسبت به گروه شاهد کاهش معنی‌داری داشت (جدول ۳).

جدول ۳: مقایسه میزان بیان ژن دو سویه غذایی و بالینی *Listeria monocytogenes* در محیط آبگوشت میگو پس از ۴۸ ساعت در معرض قرارگیری با دو غلظت نمک طعام (۲ و ۵ درصد) و دو غلظت آبلیمو (۲۵ و ۵۰ میکرولیتر بر میلی‌لیتر) در دمای ۱۲ درجه سانتی‌گراد

Table 3: Comparison of gene expression of two food and clinical strains of *Listeria monocytogenes* in shrimp broth after 48 hours of exposure to two concentrations of NaCl (2 and 5%) and two concentrations of lime juice (25 and 50 microliters/ml) at 12 degrees Celsius

Gene	Isolate types	Gene expression (the delta Ct average of treatments)
lmo1634	Food	15.55±1.22 ^a
	Clinical	13.89±1.24 ^b
lmo1847	Food	14.34±3.14 ^a
	Clinical	12.97±2.09 ^b
sigB	Food	15.50±1.80 ^a
	Clinical	15.19±1.30 ^a

دلتا سی تی کمتر معادل با بیان بیشتر در نظر گرفته شده است. حروف کوچک نشان‌دهنده تفاوت‌های معنی‌دار در تمامی تیمارهای در سویه‌های غذایی و بالینی است.

if delta CT has a small value, the gene is highly expressed. Small letters indicate significant differences between food and clinical isolates in studied treatments.

بحث

باکتری *Listeria monocytogenes* یک پاتوژن غذایی مهم در محصولات گوشت و فرآورده‌های گوشتی به‌شمار می‌رود. بررسی تفاوت‌های بین سویه‌های این باکتری (غذایی و بالینی)، می‌تواند به شناخت بیشتر این باکتری و مکانیسم‌های دخیل در بیماری‌زایی آن منجر شود. علاوه‌براین، مطالعه ژن‌های دخیل در چسبندگی و بیماری‌زایی باکتری می‌تواند به توسعه روش‌های مناسب جهت نگهداری ایمن مواد غذایی و تعیین میزان مناسب نگهدارنده‌های غذایی بیانجامد (Hosseini et al., 2024). در تحقیق حاضر، اختلافات بین دو جدایه مختلف *L. monocytogenes* (جداسازی شده از محصولات شیلاتی و سویه بالینی)، در سطح مولکولی مورد بررسی قرار گرفت.

با جمع‌بندی نتایج حاصل از دو سویه مورد مطالعه می‌توان اظهار داشت که میزان بیان ژن‌های چسبندگی و استرس پس از ۴۸ ساعت در معرض قرارگیری با نگهدارنده‌ها کاهش می‌یابد. میزان بیان ژن‌های چسبندگی و استرس تیمار شاهد سویه غذایی (بدون نگهدارنده) پس از ۴۸ ساعت نگهداری در سه دمای ۱۲، ۲۲ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد مورد مطالعه قرار گرفت (نتایج نشان داده نشده است). نتایج نشان داد، میزان بیان ژن‌های چسبندگی و استرس با کاهش دما افزایش می‌یابد. به طور مشابه، در تیمار شاهد سویه بالینی میزان بیان ژن‌های چسبندگی و استرس در دمای ۱۲ درجه سانتی‌گراد، بیشتر از سایر دماهای مورد مطالعه بود.

2023). نتایج تحقیق Cheng و همکاران (۲۰۲۳) نشان داد، سویه غذایی *L. monocytogenes* نسبت به محیط اسیدی مقاوم تر است.

Rantsiou و همکاران (۲۰۱۲) میزان بیان ۵۴ ژن موثر در بیماری زایی، چسبندگی و استرس را در ۳ سویه مختلف مورد بررسی قرار دادند. نتایج این تحقیق نشان داد، تفاوتی در میزان بیان ژن در بین سویه ها زمانی که در محیط کشت BHI حضور دارند، وجود ندارد. اما زمانی که سویه ها به محیط غذایی (آبگوشت و سوسیس) تلقیح می شوند، میزان بیان ژن های *gadC*، *iap* و *gadE* به همراه ژن های مختلف اینترنالین به صورت آماری متفاوت خواهد بود. نتایج این تحقیق با یافته های پژوهش حاضر که مؤید تفاوت معنی دار سویه های مختلف (غذایی و بالینی) در آبگوشت گوشت میگو است، تطابق دارد.

نتایج تحقیق حاضر نشان داد، میزان بیان ژن های چسبندگی و استرس با کاهش دما افزایش می یابد. به طور مشابه، برای سویه بالینی نیز تیمار شاهد در دمای ۱۲ درجه سانتی گراد، میزان بیان ژن های چسبندگی و استرس آن بیشتر از سایر دماهای مورد مطالعه بود. نتایج تحقیق حاضر تاحدی با نتایج مطالعه Hadjilouka و همکاران (۲۰۱۶) همخوانی داشت. در مطالعه Hadjilouka و همکاران (۲۰۱۶) میزان بیان ژن های کلیدی در بیماری زایی باکتری *L. monocytogenes* در محیط کشت مایع، ملون و سبزی مورد بررسی قرار گرفت. در مطالعه مذکور از محیط BHI به عنوان محیط کشت مایع استفاده شد. میزان بیان ژن های *lmo2627 inlJ inlB inlA sigB plcB plcA hly* و *lmo2470* در سه دمای نگهداری ۴، ۱۰ و ۳۰ درجه سانتی گراد با کمک RT-PCR مورد بررسی قرار گرفت. نتایج مطالعه Hadjilouka و همکاران (۲۰۱۶) نشان داد، میزان بیان ژن *sigB* در آبگوشت محیط کشت در دمای ۳۰ درجه نسبت به دو دمای ۱۰ و ۴ درجه سانتی گراد افزایش یافته، اما در دماهای مشابه میزان بیان این ژن در سبزیجات کاهش یافت. همچنین میزان بیان *hly* (ژن بیماری زایی) در ملون در دمای ۱۰ و ۳۰ درجه سانتی گراد نسبت به دمای ۴ درجه سانتی گراد کاهش یافت. تحقیقات نشان می دهد، ژن *hly* لیستریولایزین O (LLO) تولید می کند که یک سم

مطالعات مختلفی بر اثر نگهدارنده های مختلف در میزان بیان ژن های فیلامنتیشن، بیماری زایی و چسبندگی *L. monocytogenes* انجام شده است. مطالعات نشان می دهد، نگهدارنده های غذایی به میزان زیاد در میزان بیان ژن های عامل بیماری زایی یا چسبندگی موثر هستند. علاوه بر نگهدارنده ها، حضور پروبیوتیک ها و باکتریوسین ها در بیان بسیاری از ژن های بیماری زا *L. monocytogenes* موثر است (Melian et al., 2022). در مطالعه ای که اخیراً بر ژن های موثر در تشکیل بیوفیلم باکتری *L. monocytogenes* انجام گردید، مشخص شد که کمبود مواد غذایی می تواند موجب چسبندگی بیشتر و متعاقباً تشکیل بیوفیلم گردد (Wang et al., 2022).

در مطالعه Liu و همکاران (۲۰۱۷) میزان بیان ژن های *L. monocytogenes* در پاسخ به دو نگهدارنده غذایی سدیم لاکتات و سدیم دی استات در محیط کشت TSB مورد بررسی قرار گرفت. استفاده ترکیبی دو نگهدارنده سدیم لاکتات و سدیم دی استات منجر به کم شدن بیان ژن های موثر در گلیکولیز (*pgm* و *fbaA eno pykA*) و افزایش بیان ژن های دخیل در ترمیم DNA (ژن *radC*)، تقسیم سلولی (*ftsE*) و سنتز ساختار سلولی (سنتز فلاژلها: *flgK*، *fliD* و *fliF*) شد. همچنین میزان Filamentation با کمک فلوسایتومتری^۱ مورد پایش قرار گرفت. نتایج این تحقیق نشان داد که استفاده ترکیبی از این دو نگهدارنده موجب Filamentation در *L. monocytogenes* می شود. نتایج مطالعه ای که اخیراً بر اثرات نگهدارنده ها در میگو انجام شده است، نشان داد سطوح مختلف نمک طعام و آبلیمو پس از ۴۸ ساعت می تواند منجر به کاهش میزان بیان ژن های استرس و چسبندگی گردد، اما میزان بیان ژن های بیماری زایی در محیط گوشت چرخ شده میگو پس از ۴۸ ساعت افزایش می یابد (Hosseini et al., 2024). مطالعات نشان می دهد، میزان مقاومت و بازماندگی سویه های مختلف *L. monocytogenes* (بالینی و غذایی) نسبت به استرس حرارتی و غلظت اسید متفاوت است (Cheng et al., ۲۰۲۳).

^۱ Flow cytometry

(روش سلول شناسی که به بررسی ویژگی های فیزیکی و شیمیایی سلول ها یا اجزاء مختلف آنها می پردازد).

قزل‌آلای رنگین‌کمان مورد بررسی قرار گرفت. نتایج محققان نشان داد افزودن غلظت‌های کمتر از MIC اسانس آویشن باعث افزایش معنی‌دار ژن‌های بیماری‌زای *L. monocytogenes* می‌شود.

در تحقیق حاضر، برای نخستین بار اختلافات بین جدایه‌های باکتری *L. monocytogenes* در آبگوشت گوشت میگو تحت تاثیر نگهدارنده‌های غذایی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج تحقیق حاضر نشان داد، میزان بیان ژن‌های بیماری‌زا و چسبندگی در این باکتری بستگی به نوع سویه مورد مطالعه دارد. در این مطالعه هتروژنیتی سویه‌های مختلف *L. monocytogenes* در پتانسیل بیماری‌زایی، تأیید شد.

منابع

- Abdollahzadeh, E., Rezaei, M. and Hosseini, H., 2014. Antibacterial activity of plant essential oils and extracts: The role of thyme essential oil, nisin, and their combination to control *Listeria monocytogenes* inoculated in minced fish meat. *Food Control*, 35(1):177-183. DOI:10.1016/j.foodcont.2013.07.004
- Abdollahzadeh, E., Ojagh, S.M., Hosseini, H., Irajian, G. and Ghaemi, E.A., 2016. Prevalence and molecular characterization of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* isolated from fish, shrimp, and cooked ready-to-eat (RTE) aquatic products in Iran. *LWT-Food Science and Technology*, 73:205-211. DOI:10.1016/j.lwt.2016.06.020
- Abdollahzadeh, E., Hosseini, H., Ojagh, S.M., Koushki, M.R., Moghaddam, L.A. 2021., Secondary modeling and strain variability of *Listeria monocytogenes* isolated from seafood and clinical samples at various environmental conditions using high-throughput turbidity method. *Applied Food Biotechnology*, 8(3):225-236. DOI:10.22037/afb.v8i3.33746
- ضروری برای فرار باکتری از بیگانه‌خوارها^۱ به‌شمار می‌رود. ژن‌های *plcA* و *plcB* نیز به‌ترتیب فسفوتیدیل اینوزیتول فسفولیپاز C (PI-PLC) و فسفاتیدیل کولین فسفولیپاز C (PI-PLC) تولید می‌کنند. هر دو این فسفولیپازها با LLO همکاری می‌کنند و برای رهایش باکتری از واکوئل فاگوسیت موثرند و به باکتری اجازه می‌دهد به سیتوپلاسم سلول نفوذ کند (Lopes-Luz et al., 2021; Lakicevic et al., 2022).
- در تحقیق Alessandria و همکاران (۲۰۱۳) میزان بیان ژن‌های *iap*، *hly*، *plcA* و *sigB* هفت سویه مختلف *Listeria* در پنیر در دو دمای نگهداری (۴ و ۱۰ درجه سانتی‌گراد) به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت مورد بررسی قرار گرفت. در رابطه با ژن *hly* و *plcA*، هیچ تفاوت معنی‌داری بین ۲۴ و ۴۸ ساعت نگهداری وجود نداشت. اما میزان بیان ژن *sigB* در بین سویه‌ها متفاوت بود که این یافته‌ها نشان می‌دهد، نوع سویه در بیان برخی از ژن‌ها اثرگذار است.
- ژن‌های *lmo1634*، *lmo1666* و *lmo1847* به‌ترتیب موجب رونویسی پروتئین چسبندگی *Listeria*، پروتئین B چسبندگی *Listeria* (LAP-B) و پروتئین اتصال‌دهنده چسبندگی می‌شود که نقش موثری در اتصال باکتری به میزبان ایفاء می‌کنند (Lakicevic et al., 2020; Mattila et al., 2022). همچنین ژن *imo2558* در ارتقاء چسبندگی به اپیتلیال سلولی پستانداران موثر است (Tiong and Muriana, 2016). در تحقیق حاضر، میزان بیان ژن‌های چسبندگی، بیماری‌زایی و استرس سویه غذایی پس از ۴۸ ساعت نگهداری (۳۷ درجه سانتی‌گراد) در دو سطح ۵ و ۲ درصد نمک طعام و سطح ۵۰ میکرولیتر بر میلی لیتر آبلیمو به صورت معنی‌داری بیشتر از تیمار شاهد (بدون افزودنی و نگهدارنده) بود. نتایج نسبتاً مشابهی برای سویه بالینی برای ژن‌های بیماری‌زایی، چسبندگی و استرس حاصل شد. این نتایج به صورت کامل با مطالعه انجام شده در آبگوشت قزل‌آلای رنگین‌کمان همخوانی داشت (Pilevar et al., 2020). در مطالعه Pilevar و همکاران (۲۰۲۰) بیان ژن‌های *inlA*، *prfA*، *hly* و *inlB* متعلق به *L. monocytogenes* در آبگوشت و گوشت چرخ شده ماهی

¹ Phagosome

- Abolhasani, M.H., Talebi, Z. and Payami Khomeran, M., 2020.** Survey of pollution in areas of Anzali wetland to *Yersinia enterocolitica* and *Listeria monocytogenes* by microbial culture and PCR and their relationship to the pH and electrical conductivity of water. *Iranian Scientific Fisheries Journal*, 29(3):143-153. [in Persian]
- Alessandria, V., Rantsiou, K., Dolci, P., Zeppa, G. and Cocolin, L., 2013.** A comparison of gene expression of *Listeria monocytogenes* in vitro and in the soft cheese Crescenza. *International Journal of Dairy Technology*, 66(1):83-89. DOI:10.1111/1471-0307.12008
- Behari, J. and Youngman, P., 1998.** Regulation of *hly* Expression in *Listeria monocytogenes* by Carbon Sources and pH Occurs through Separate Mechanisms Mediated by *PrfA*. *Infection and Immunity*, 66(8):3635-3642. DOI:10.1128/iai.66.8.3635-3642.1998
- Bowman, J.P., Bittencourt, C.R. and Ross, T., 2008.** Differential gene expression of *Listeria monocytogenes* during high hydrostatic pressure processing. *Microbiology*, 154(2):462-475. DOI:10.1099/mic.0.2007/010314-0
- Cheng, Y., Wang, X., Liu, Y., Qin, X., Li, Z. and Dong, Q., 2023.** Growth and survival characteristics of *Listeria monocytogenes* of different sources and subtypes. *LWT-Food Science and Technology*, 184, 115-119. DOI:10.1016/j.lwt.2023.115114
- Dussurget, O., 2008.** New insights into determinants of *Listeria monocytogenes* virulence. *International Review of Cell and Molecular Biology*, 270:1-38. DOI:10.1016/S1937-6448(08)01401-9
- Fagerlund, A., Langsrud, S., Schirmer, B.C., Møretrø, T. and Heir, E., 2016.** Genome analysis of *Listeria monocytogenes* sequence type 8 strains persisting in salmon and poultry processing environments and comparison with related strains. *PLoS One*, 11(3):e0151117. DOI:10.1371/journal.pone.0151117
- Guan, P., Wang, X., Dong, Z., Song, M., Zhu, H. and Suo, B., 2023.** Cinnamaldehyde inactivates *Listeria monocytogenes* at a low temperature in ground pork by disturbing the expression of stress regulatory genes. *Food Bioscience*, 51:102277. DOI:10.1016/j.fbio.2022.102277
- Hadjilouka, A., Molfeta, C., Panagiotopoulou, O., Paramithiotis, S., Mataragas, M. and Drosinos, E.H., 2016.** Expression of *Listeria monocytogenes* key virulence genes during growth in liquid medium, on rocket and melon at 4, 10 and 30 °C. *Food Microbiology*, 55:7-15. DOI:10.1016/j.fm.2015.11.008
- Hosseini, H., Abdollahzadeh, E. and Pilevar, Z., 2024.** Addition of lime juice and NaCl to minced seafood may stimulate the expression of *Listeria monocytogenes* virulence, adhesion, and stress response genes. *Food Science Nutrition*, 00:1-8. DOI:10.1002/fsn3.4064
- Huang, L., Hwang, C. A. and Sheen, S., 2023.** Shelf-life boundaries of *Listeria monocytogenes* in cold smoked salmon during refrigerated storage and temperature abuse. *Food Research International*, 173:113362. DOI:10.1016/j.foodres.2023.113362

- Jensen, A.K., Björkman, J.T., Ethelberg, S., Kiil, K., Kemp, M. and Nielsen, E.M., 2016. Molecular Typing and Epidemiology of Human Listeriosis Cases, Denmark, 2002–20121. *Emerging Infectious Diseases*, 22(4):625-633. DOI:10.3201/eid2204.150998
- Kastbjerg, V.G., Larsen, M.H., Gram, L. and Ingmer, H., 2010. Influence of sublethal concentrations of common disinfectants on expression of virulence genes in *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(1):303-309. DOI:10.1128/AEM.00925-09
- Lakicevic, B.Z., Den Besten, H.M. and De Biase, D., 2022. Landscape of stress response and virulence genes among *Listeria monocytogenes* strains. *Frontiers in Microbiology*, 12:738470. DOI:10.3389/fmicb.2021.738470
- Liu, X., Basu, U., Miller, P. and McMullen, L.M., 2017. Differential gene expression and filamentation of *Listeria monocytogenes* 08-5923 exposed to sodium lactate and sodium diacetate. *Food Microbiology*, 63:153-158. DOI:10.1016/j.fm.2016.11.009
- Lopes-Luz, L., Mendonça, M., Bernardes Fogaça, M., Kipnis, A., Bhunia, A.K. and Bühner-Sékula, S., 2021. *Listeria monocytogenes*: review of pathogenesis and virulence determinants-targeted immunological assays. *Critical Reviews in Microbiology*, 47(5):647-666. DOI:10.1080/1040841X.2021.1911930
- Lukowiak, A.M., Mueller, K. J., Freitag, N.E. and Youngman, P., 2004. Dereglulation of *Listeria monocytogenes* virulence gene expression by two distinct and semi-independent pathways. *Microbiology*, 150(2):321-333. DOI:10.1099/mic.0.26718-0
- Mattila, M., Somervuo, P., Korkeala, H., Stephan, R. and Tasara, T., 2020. Transcriptomic and Phenotypic Analyses of the Sigma B-Dependent Characteristics and the Synergism between Sigma B and Sigma L in *Listeria monocytogenes* EGD-e. *Microorganisms*, 8(11), 1644. DOI:10.3390/microorganisms8111644
- Melian, C., Bentencourt, E., Castellano, P., Ploper, D., Vignolo, G. and Mendoza, L.M., 2022. Biofilm genes expression of *Listeria monocytogenes* exposed to *Latilactobacillus curvatus* bacteriocins at 10 °C. *International Journal of Food Microbiology*, 370:109648. DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2022.109648
- Milenbachs, A.A., Brown, D.P., Moors, M. and Youngman, P., 1997. Carbon-source regulation of virulence gene expression in *Listeria monocytogenes*. *Molecular Microbiology*, 23(5):1075-1085. DOI:10.1046/j.1365-2958.1997.2711634.x
- Momtaz, H. and Yadollahi, S., 2013. Molecular characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from fresh seafood samples in Iran. *Diagnostic Pathology*, 8:149. DOI:10.1186/1746-1596-8-149
- Nadon, C.-A., Bowen, B.-M., Wiedmann, M. and Boor, K.-J., 2002. Sigma B contributes to PrfA-mediated virulence in *Listeria monocytogenes*. *Infection and Immunity*, 70:3948-3952. DOI:10.1128/IAI.70.7.3948-3952.2002
- Pilevar, Z., Hosseini, H., Abdollahzadeh, E., Shojaee-Aliabadi, S., Tajedin, E., Yousefi, M., Bahrami, A. and Khosroshahi, N.K., 2020. Effect of *Zataria multiflora* Boiss. Essential oil, time, and temperature on the expression of *Listeria monocytogenes*

- virulence genes in broth and minced rainbow trout. *Food Control*, 109:106863. DOI:10.1016/j.foodcont.2019.106863
- Rantsiou, K., Greppi, A., Garosi, M., Acquadro, A., Mataragas, M. and Cocolin, L., 2012.** Strain dependent expression of stress response and virulence genes of *Listeria monocytogenes* in meat juices as determined by microarray. *International Journal of Food Microbiology*, 152(3):116-122. DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2011.08.009
- Sheikh-Zeinoddin, M., Perehinec, T.M., Hill, S.E. and Rees, C.E., 2000.** Maillard reaction causes suppression of virulence gene expression in *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*, 61(1):41-49. DOI:10.1016/s0168-1605(00)00371-8
- Shi, H., Trinh, Q., Xu, W., Luo, Y., Tian, W. and Huang, K., 2013.** The transcriptional response of virulence genes in *Listeria monocytogenes* during inactivation by nisin. *Food Control*, 31(2):519-524. DOI:10.1016/j.foodcont.2012.11.008
- Stasiewicz, M.J., Wiedmann, M. and Bergholz, T.M., 2011.** The transcriptional response of *Listeria monocytogenes* during adaptation to growth on lactate and diacetate includes synergistic changes that increase fermentative acetoin production. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(15):5294-5306. DOI:10.1128/AEM.02976-10
- Swaminathan, B. and Gerner-Smidt, P., 2007.** The epidemiology of human listeriosis. *Microbes and Infection*, 9(10):1236-1243. DOI:10.1016/j.micinf.2007.05.011
- Tiong, H.K. and Muriana, P.M., 2016.** RT-qPCR analysis of 15 genes encoding putative surface proteins involved in adherence of *Listeria monocytogenes*. *Pathogens*, 5(4), 60. DOI:10.3390/pathogens5040060
- Upadhyay, A., Johny, A.K., Amalaradjou, M.A.R., Baskaran, S.A., Kim, K.S. and Venkitanarayanan, K., 2012.** Plant-derived antimicrobials reduce *Listeria monocytogenes* virulence factors in vitro, and down-regulate expression of virulence genes. *International Journal of Food Microbiology*, 157(1):88-94. DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2012.04.018
- Välimaa, A.-L., Tilsala-Timisjärvi, A. and Virtanen, E., 2015.** Rapid detection and identification methods for *Listeria monocytogenes* in the food chain—A review. *Food Control*, 55:103-114. DOI:10.1016/j.foodcont.2015.02.037
- Wang, Y., Sun, L., Hu, L., Wang, Z., Wang, X. and Dong, Q., 2022.** Adhesion and kinetics of biofilm formation and related gene expression of *Listeria monocytogenes* in response to nutritional stress. *Food Research International*, 156:111-143. DOI:10.1016/j.foodres.2022.111143

Differences between clinical and food isolates of *Listeria monocytogenes* in transcription levels of *inlA*, *hly*, *lmo1634*, *lmo1847*, *sigB*, and *prfA* genes in shrimp broth

Abdollahzadeh E.^{1*}; Jafari O.¹; Hassanzadeh Saber M.¹

*abdollahzadeh@rocketmail.com

1-International Sturgeon Research Institute, Iranian Fisheries Science Research Institute (IFSRI), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Rasht, Iran

Abstract

Listeriosis, an important illness with a high mortality rate (up to 30%), is caused by *Listeria monocytogenes*. Nowadays, there are several reports that display the prevalence of *L. monocytogenes* in fisheries products. Therefore, it is important to investigate and control the expression of virulence genes and adhesion-related genes in different strains of this bacterium in foodstuffs. In this study, the expression levels of *inlA*, *hly*, *lmo1634*, *lmo1847*, *sigB*, and *prfA* genes in two isolates (food and clinical) were investigated under the influence of NaCl and lime juice in the shrimp broth. The results of the independent t-test for the *prfA* gene demonstrated that the expression level in the treatments of clinical strain was significantly higher than the food strain ($p < 0.05$). Similarly, the average expression of both adhesion genes (*lmo1847* and *lmo1634*) and stress gene (*sigB*) in the studied treatments for the clinical strain was significantly higher than the food strain. In both strains, the role of lime juice in increasing the expression of virulence and adhesion genes was significantly higher than in NaCl treatments ($p < 0.05$). Overall, it can be stated that the transcription level of virulence- and adhesion-related genes upon exposure to preservatives may be different in the various *L. monocytogenes* isolates.

Keywords: *Listeria monocytogenes*, Transcriptional regulation of gene, Shrimp, Pathogenicity

*Corresponding author