

بررسی سطح بیان *inlB* و تهاجم سلولی در ایزوله های لیستریا مونوسیتوژنز جدا شده از زنان باردار

زهرا ظهیرنیا^۱، شهلا منصوری^۱، فرشته صفاری^{۲*}

مقاله پژوهشی

مقدمه: لیستریا مونوسایتوژنز به عنوان یک پاتوژن بالقوه شناخته می شود که می تواند موجب لیستریوز پیریناتال و به دنبال آن، سقط جنین، زایمان زودرس یا تولد نوزاد نارس شود. فاکتورهای متعددی در بیماری زایی این باکتری دخالت دارند، نظیر اینترنالین B که در ورود باکتری به طیف وسیعی از رده های سلولی دخالت دارد. با این حال چندان مشخص نیست که آیا بیان این پروتئین در ایزوله های مختلف یکسان است یا نه.

روش بررسی: این مطالعه تجربی با هدف مقایسه ایزوله های لیستریا مونوسایتوژنز جدا شده از زنان باردار (۷ ایزوله) با پیامدهای مختلف بارداری (شامل تولد نوزاد سالم، تولد نوزاد نابینا و یا مرده) و دچار سقط (۱ ایزوله)، از نظر سطح بیان *inlB* (ژن کد کننده اینترنالین B) و نیز تهاجم سلولی، انجام گرفت. نتایج مرتبط با بیان ژن، با آزمون واریانس یکطرفه و با استفاده از نرم افزار version 16 SPSS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

نتایج: هر چند افزایش بیان ژن *inlB* در اکثر موارد مشاهده شد ولی میزان افزایش در میان ایزوله های مختلف، ناهمگون بوده و ارتباط معناداری با میزان تهاجم سلولی و پیامدهای بارداری نشان نداد ($P > 0/05$). نیمی از ایزوله های مورد مطالعه قادر به تهاجم به سلول های HepG2 (رده سلولی سرطان کبد) بودند، در حالیکه تهاجم به سلول های HeLa، فقط در یک ایزوله مشاهده شد، اما این اختلاف معنادار نبود. ضمناً ارتباط معناداری میان میزان تهاجم سلولی ایزوله ها و پیامدهای بارداری مشاهده نشد ($P > 0/05$).
نتیجه گیری: میزان بیان سطح *inlB* و تهاجم سلولی، نمی تواند تفاوت در بیماری زایی ایزوله ها را توجیه کند. مطالعات بیشتری برای شناسایی عوامل تعیین کننده باکتریایی و احتمالاً میزبانی نیاز است.

واژه های کلیدی: لیستریا مونو سایتوژنز، اینترنالین B، تهاجم سلولی، بارداری، سقط

ارجاع: ظهیرنیا زهرا، منصوری شهلا، صفاری فرشته. بررسی سطح بیان *inlB* و تهاجم سلولی در ایزوله های لیستریا مونوسیتوژنز جدا شده از زنان باردار. مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد ۱۴۰۳؛ ۳۲ (۸): ۴۹-۸۱۴۱.

۱- گروه میکروبی شناسی پزشکی (باکتری شناسی و ویروس شناسی)، دانشکده پزشکی افضلی پور، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران.

۲- مرکز تحقیقات قارچ شناسی و باکتری شناسی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران.

* (نویسنده مسئول): تلفن: ۰۹۱۲۶۷۱۳۲۹۸، پست الکترونیکی: fsafari@kmu.ac.ir، صندوق پستی: ۷۶۱۶۹۱۴۱۱۵

مقدمه

لیستریا مونوسیتوژنز یک باکتری داخل سلولی اختیاری است که از عوامل ایجاد کننده بیماری‌های منتقله از غذا به حساب می‌آید (۱). عفونت لیستریایی (لیستریوز) در انسان به دو فرم دیده می‌شود. لیستریوز غیر مهاجم گوارشی و لیستریوز مهاجم. الگوی لیستریوز به سن و وضعیت ایمنی فرد آلوده بستگی دارد. افراد مسن و بیماران مبتلا به دیابت، سرطان، پیوند کلیه و نقایص در عملکرد سلول T معمولاً به بیماری سیستمیک بدخیمی مبتلا می‌شوند که منجر به مننژیت می‌شود. بیماری در زنان باردار و سایر بالغینی که از نظر ایمنی سالم هستند معمولاً خود محدود شونده است. البته آلودگی زنان باردار به این باکتری، به خصوص در سه ماهه سوم بارداری، ممکن است منجر به سقط، زایمان زودرس یا عفونت نوزاد شود. نوزادانی که از طریق جفت به لیستریوز مبتلا شده‌اند، بیماری زودرس همچون گرانولوماتوز همراه با پنومونی و نوزادانی که در حین تولد با ترشحات آلوده در طول کانال زایمانی آلوده می‌شوند به لیستریوز تأخیری همچون مننژیت مبتلا می‌شوند (۲). هرچند مرگ و میر ناشی از لیستریوز تقریباً بین ۲۵-۲۰ درصد گزارش شده است ولی عوارض دائمی ناشی از این عفونت در ۵۰-۳۰ درصد از مبتلایانی که زنده می‌مانند، به جا می‌ماند (۳). علی‌رغم آلودگی بالای محصولات غذایی با این باکتری، بروز لیستریوز نسبتاً پایین است (۴). این تفاوت را می‌توان به دو صورت توجیه کرد: تفاوت در میزان آلودگی محصولات غذایی یا تفاوت در پتانسیل بیماری‌زایی ایزوله‌ها (۵،۶). مراحل بیماری‌زایی لیستریا مونوسیتوژنز شامل اتصال و تهاجم به سلول میزبان، تکثیر داخل سلولی و انتشار سلول به سلول است (۷). وقوع هر مرحله تابع فعالیت فاکتورهای مختلف در باکتری و عملکرد سلول میزبان است. اینترنالین اولین مولکول شناخته شده‌ای است که لیستریا مونوسیتوژنز برای حمله به سلول‌های غیر فاگوسیت، مانند اپیتلیوم روده انسان و سلول‌های جفت به کار می‌گیرد. لیستریا مونوسیتوژنز از طریق پروتئین‌های سطحی خود به نام اینترنالین (خصوصاً اینترنالین A و B) وارد سلول‌های اپی‌تلیوم روده می‌شود. سایر اینترنالین‌ها

(اینترنالین‌های C و J)، در مراحل بعدی عفونت نقش دارند. اینترنالین B جذب را به واسطه به راه انداختن یک آبشار پیام‌رسانی که منجر به بازآرایی اکتین می‌شود، هدایت می‌کند. بر خلاف اینترنالین A که برای بقای باکتری در سطح انتروسیت‌های روده حیاتی‌تر به نظر می‌رسد، اینترنالین B، مسئول ورود باکتری به درون انواع رده‌های سلولی نظیر هیپاتوسیت‌ها، اسپلنوسیت‌ها، فیبروبلاست‌ها و میوسیت‌های قلبی است (۸). در مطالعه‌ای بر روی ایزوله‌های بالینی و غیر بالینی لیستریا مونوسیتوژنز، نشان داده شد که سطح بیان اینترنالین‌های A و B در سویه‌های بالینی به‌طور معناداری کمتر از سویه‌های بالینی است. آن‌ها نشان دادند که وقوع برخی جهش‌ها در ژن اینترنالین می‌تواند سبب عدم ورود لیستریاها به داخل سلول‌ها و به تبع آن کاهش قدرت تهاجمی به سلول‌ها شود (۶). از سوی دیگر، افزایش سطح بیان فاکتورهای ویرولانسی و تهاجم سلولی در ایزوله‌های بالینی نسبت به ایزوله‌های جدا شده از مواد غذایی در مطالعه دیگری گزارش شده است (۹). از آنجا که اینترنالین B برای ایجاد عفونت سیستمیک ضروری است (۶) و با توجه به اینکه مقایسه ایزوله‌های بالینی از نظر سطح بیان *inlB* و میزان تهاجم سلولی از دیدگاه پیامدهای مختلف بارداری مورد توجه قرار نگرفته بود، مطالعه حاضر با هدف فوق طراحی شد.

روش بررسی

ایزوله‌های باکتریایی: این مطالعه تجربی، مجموعاً بر روی هشت ایزوله لیستریا مونوسیتوژنز (LMO 33, LMO 34, LMO 38, LMO 39, LMO44, LMO47, LMO 72, LMO 90)، جدا شده از ۲۰۰ نمونه سواب واژینال از خانم‌های باردار (۷۶ نمونه) یا دچار سقط (۱۲۴ نمونه)، انجام شد: هفت ایزوله از خانم‌های باردار و یک ایزوله از یک خانم دچار سقط. پیامد بارداری در هفت خانم باردار آلوده به لیستریا مونوسیتوژنز عبارت بود از: ۲ مورد تولد نوزاد زنده سالم، ۲ مورد تولد نوزاد مرده، ۲ مورد دوقلو زایی که در هر دو مورد یک نوزاد مرده و دیگری نابینا متولد شده بود و ۱ مورد سقط. لیستریا مونوسیتوژنز ATCC 7644 نیز به‌عنوان سویه

بررسی بیان ژن *inlB* به روش **qRT-PCR**: اختصاصیت پرایمرهای مورد استفاده، *tufA* به عنوان ژن خانه‌دار و *inlB* به عنوان ژن هدف، (جدول ۱)، با کمک نرم‌افزار پرایمر بلاست بررسی شد. واکنش RT-PCR در حجم ۲۰ میکرولیتر، شامل ۲ میکرولیتر cDNA به عنوان الگو، ۱ میکرولیتر از پرایمرهای مربوطه و ۱۰ میکرولیتر SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II (تاکارا، ژاپن) با استفاده از StepOne Real-Time PCR System و به صورت دوتایی انجام شد. آنالیز منحنی ذوب به منظور تعیین اختصاصیت محصول تکثیر یافته انجام شد. میزان بیان *inlB* از طریق مقایسه میزان بیان این ژن با ژن خانه‌دار محاسبه شد.

بررسی تهاجم سلولی: رده سلولی HepG2 (کارسینوم هپاتوستیک انسانی) و رده سلولی HeLa (تهیه شده از بانک سلولی مرکز ملی ذخائر ژنتیکی و زیستی ایران) در محیط RPMI 1640 با ۱۰٪ سرم جنین گاوی (مرک، آلمان) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در اتمسفر ۵٪ CO₂ کشت شدند. سلول‌ها در پلیت‌های کشت ۱۲ خانه‌ای تلقیح و به مدت ۲۴ ساعت گرماگذاری شدند تا یک لایه نازک (حدود ۱۰^۵ × ۲ سلول در هر چاهک) تشکیل شود. سپس این سلول‌ها با سوسپانسیون باکتریایی با ضریب عفونی ۲۰ در محیط RPMI 1640 فاقد آنتی‌بیوتیک آلوده شدند. سپس پلیت‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰۰ × g (در ۳۷ درجه سانتی‌گراد) در شیکر انکوباتور قرار گرفتند تا باکتری‌ها در تماس با سلول‌های تک لایه قرار گیرند و پس از آن به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد (۵٪ CO₂) انکوبه شدند تا باکتری‌ها سلول‌ها را مورد هجوم قرار دهند. در ادامه، به منظور حذف باکتری‌های متصل نشده، سلول‌ها دو بار با بافر فسفات سالین شستشو شدند و سپس به مدت ۲ (رده سلولی HepG2) و ۴ (رده سلولی HeLa) ساعت در محیط RPMI 1640 حاوی ۱٪ سرم جنین گاوی و ۵۰ میکروگرم/میلی‌لیتر جنتامایسین (مرک، آلمان) انکوبه شدند تا باکتری‌های خارج سلولی کشته شوند. مجدداً پس از شستشو با بافر فسفات سالین، سلول‌ها با ۲۰۰ میکرولیتر تریتون X-100 یک درصد (مرک، آلمان) لیز شده و پس از تهیه

استاندارد در این مطالعه استفاده شد. تمامی نمونه‌های گرفته شده از سواب واژینال، در روز اول و هم‌چنین پس از حداقل ۱۰ روز نگهداری در ۴ °C در محیط آگار حاوی خون گوسفند برای بررسی همولیز کشت داده شدند. کلنی‌های ریز که دارای همولیز بتا ضعیف بودند برای تایید در محیط اختصاصی پالکام آگار (هپامدیا، هند) کشت داده شدند (۱۰). جداسازی و شناسایی ایزوله‌های مورد بررسی در این مطالعه، بر اساس رنگ‌آمیزی گرم و آزمون‌های بیوشیمیایی (آزمون کاتالاز، تست کمپ، بررسی حرکت در دمای ۲۵ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد) بوده (۱۱) و تایید نهایی از طریق تکثیر ژن *iap* در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، صورت گرفت (۱۲). این ایزوله‌ها در محیط تریپتیکاز سوی براث (مرک، آلمان) حاوی ۱۵٪ گلیسرول، در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد، در بخش میکروبی‌شناسی دانشکده پزشکی نگهداری شدند. حضور ژن‌های ویروالانس *(inlA, inlB, prfA, hly, actA)*، (۱۳، ۱۴) و نیز تعیین سروتیپ‌ها (۱۵)، به روش مولکولی و با استفاده از پرایمرهای مربوطه طی واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، بررسی و انجام شده که نتایج آن در جدول ۲، نشان داده شده است.

استخراج RNA و سنتز cDNA: ایزوله‌های باکتریایی در محیط کشت آبگوشت عصاره قلب - مغز (مرک، آلمان)، تا رسیدن به میانه فاز لگاریتمی (غلظت نوری: ۰/۹۵-۰/۸۵ در طول موج ۶۰۰ نانومتر) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، گرماگذاری شدند. جهت استخراج RNA، سلول‌های باکتریایی (۱۰^۹ سلول) از طریق سانتریفوژ جمع‌آوری شده و RNA کل، با استفاده از کیت high pure isolation kit (Roche، آلمان) و بر اساس دستور العمل شرکت سازنده استخراج شد. جهت تخلیص RNA از RNase-Free DNase Set (Roche، آلمان) استفاده شد. کمیت و کیفیت RNA حاصله به ترتیب با استفاده از نانودراپ و ژل الکتروفورز بررسی شد. سنتز cDNA، با استفاده از ۲ میکروگرم RNA استخراج شده به عنوان الگو و با استفاده از PrimeScript TM RT reagent kit (تاکارا، ژاپن) انجام شد.

تهاجم سلولی، حداقل به میزان ۳۳/۳۳ CFU/ml در نظر گرفته شد (۶،۹).

تجزیه و تحلیل آماری

از نرم افزار SPSS version 16 جهت آنالیز یافته ها استفاده شد. مقدار P مساوی یا کمتر از ۰/۰۵ با ضریب اطمینان ۹۵٪ به عنوان سطح معنی داری در نظر گرفته شد.

رقت های سریالی از آن ها، بر روی محیط بروسلا آگار (مرک، آلمان) کشت داده شدند. سویه های لیستریا مونو سایتوژنز ATCC 7644 و لیستریا اینوکوا، به ترتیب به عنوان سویه های مهاجم و غیر مهاجم مورد استفاده قرار گرفتند. آزمایشات بررسی تهاجم سلولی به صورت سه تایی انجام شد. تعداد باکتری های داخل سلولی به صورت واحد تشکیل دهنده کلونی (CFU) در هر میلی لیتر (CFU/ml) بیان شده و سطح

جدول ۱. پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه

| ژن هدف | ترادف الیگو نوکلئوتیدی (۵' به ۳') | منبع |
|-------------|--------------------------------------------------------------|------|
| <i>inlB</i> | F- GGAAAAGCAAAAGCAIGATTTC R-TCCATCAACATCATAACTTACTGTGTAAA | ۹ |
| <i>tufA</i> | F-GCTGAAGCTGGCGACAACA R- CTTGACCACGTTGGATATCTTCAC | ۹ |

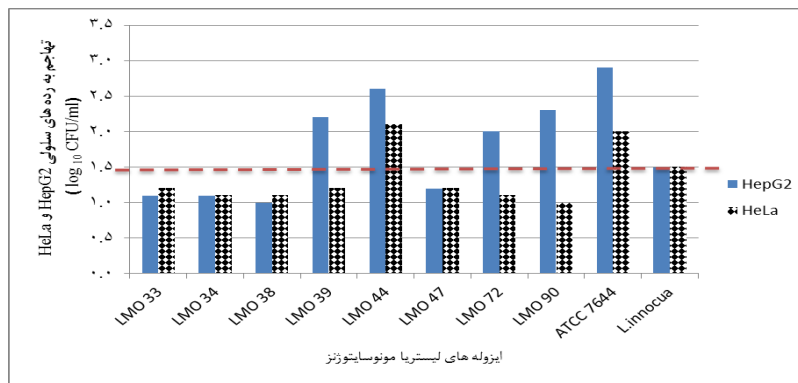
HepG2، رده سلولی سرطان کبد و HeLa، رده سلولی سرطان دهانه رحم. تهاجم به این دو رده سلولی پس از ۲ و ۴ ساعت مجاورت با ایزوله های باکتریایی بررسی شد. نتایج، تفاوت معناداری بین تهاجم در زمان های مختلف نشان نداد ($P > 0.05$). همانطور که در شکل ۱ نشان داده شده است، نیمی از ایزوله های مورد مطالعه (*LMO39*, *LMO44*, *LMO72*)، قادر به تهاجم به سلول های HepG2 بودند، در حالی که تهاجم به سلول های HeLa، فقط در یک ایزوله (*LMO44*) مشاهده شد. همچنین، فقط یک ایزوله (*LMO44*)، قادر به تهاجم به هر دو رده سلولی مورد مطالعه بود. یافته های این مطالعه، ارتباط معناداری بین سطح بیان *inlB* و توانایی تهاجم سلولی نشان نداد ($P > 0.05$). جالب اینکه، ایزوله *LMO44* که توانایی تهاجم به هر دو رده سلولی را داشت، کاهش بیان *inlB* را نشان داد.

نتایج

مشخصات ایزوله های مورد مطالعه، شامل حضور برخی فاکتورهای بیماریزایی و سروتیپ ایزوله ها، که مربوط به طرح قبلی می باشد، در جدول ۲ نشان داده شده است. زنان باردار آلوده، پس از زایمان مورد پیگیری قرار گرفتند و پیامد بارداری آن ها ثبت گردید (جدول ۲).

بیان ژن *inlB* آنالیز واریانس یک طرفه (آزمون کروسکال والیس)، تفاوت معناداری را در سطح بیان ژن *inlB* در میان ایزوله های مورد بررسی نشان داد ($P < 0.05$). ایزوله های *LMO72* و *LMO38* به ترتیب کمترین و بیشترین میزان بیان ژن را نشان دادند. در مقابل، کاهش پنج برابری در سطح بیان *inlB* تنها در یک ایزوله (*LMO44*) مشاهده شد.

تهاجم به رده های سلولی **HepG2** و **HeLa**: در این مطالعه از دو رده سلولی با منشا متفاوت استفاده شد.



شکل ۱: تهاجم لیستریا مونوسایتوژنز به دو رده سلولی HepG2 (رده سلولی کارسینومای کبدی) (ستون های آبی) و HeLa (رده سلولی سرطان دهانه رحم) (ستون های سیاه و سفید). تهاجم سلولی، بر اساس تعداد باکتری های داخل سلولی پس از ۴ ساعت انکوباسیون، به صورت میانگین $\pm \log_{10} \text{CFU/ml}$ انحراف معیار، نشان داده شده است. خط چین قرمز رنگ، آستانه تهاجم سلولی را نشان می دهد.

جدول ۲: خصوصیات ایزوله های لیستریا مونوسایتوژنز: بیان نسبی *inlB* و تهاجم سلولی

| ایزوله ها | منبع جداسازی نمونه* | سروتیپ | ژن های ویروالانس | میزان بیان <i>inlB</i> ** | قدرت تهاجم به رده های سلولی | | پیامد بارداری |
|-----------|---------------------|--------|------------------------|---------------------------|-----------------------------|------|---------------------------------|
| | | | | | HepG2 | HeLa | |
| LMO33 | سواب واژینال | 4b | <i>actA, prf, inlB</i> | ۲۲ | - | - | نوزاد مرده |
| LMO34 | سواب واژینال | NT | <i>actA, prf, inlB</i> | ۱۷۲ | - | - | تولد نوزاد سالم |
| LMO38 | سواب واژینال | NT | <i>actA, prf, inlB</i> | ۴۲۴ | - | - | دوقلو (یکی مرده و دیگری نابینا) |
| LMO39 | سواب واژینال | NT | <i>actA, prf, inlB</i> | ۵۸ | + | - | تولد نوزاد سالم |
| LMO44 | سواب واژینال | NT | <i>actA, prf, inlB</i> | ۰/۲ | + | + | نوزاد مرده |
| LMO47 | سواب واژینال | NT | <i>actA, prf, inlB</i> | ۳۷۹ | - | - | تولد نوزاد سالم |
| LMO72 | سواب واژینال | 1/2 c | <i>inlB, hly</i> | ۷/۲ | + | - | دوقلو (یکی مرده و دیگری نابینا) |
| LMO90 | سواب واژینال | NT | <i>inlB</i> | ۳۰۶ | + | - | سقط جنین |

* تمامی ایزوله ها (به استثنای LMO90)، از سواب واژینال از خانم های باردار جدا شده است. ایزوله LMO90 از خانم دچار سقط جدا شده است.
** سطح بیان *inlB* mRNA توسط real time PCR اندازه گیری شده است.

وجود دارد، لذا هر ایزوله لیستریا مونوسایتوژنز به عنوان یک پاتوژن بالقوه محسوب می شود یکی از عوامل مطرح در بیماری زایی این باکتری، اینترنالین است. این مطالعه جهت پاسخ به این سوال انجام شد که آیا میان ایزوله های جدا شده از زنان باردار (با پیامدهای بارداری متفاوت)، تفاوتی از نظر میزان بیان *inlB* و یا توانایی تهاجم سلولی وجود دارد. در این مطالعه، اینترنالین B را هدف قرار دادیم. این پروتئین، ورود باکتری را به درون طیفی از رده های سلولی، امکان پذیر می سازد. در میان مولکول های متعدد میزبانی دخیل در این پروسه به عنوان گیرنده های بالقوه، پروتئین Met مهم ترین گیرنده به حساب می آید (۱۶). در این مطالعه

بحث

لیستریا مونوسیتوژنز عامل اتیولوژیک لیستریوز است که یک بیماری عفونی جدی در گروه های پرخطر محسوب می شود. این باکتری، می تواند در محیط های ساپروفیت زنده مانده و بیماری را در میزبان های پستاندار القا کند (۱۶). بیشترین اهمیت آلودگی به این باکتری در زنان باردار می باشد. لیستریا مونوسیتوژنز یکی از معدود باکتری هایی است که می تواند از سد جنینی عبور کرده و موجب آسیب به جنین، تولد زود هنگام نوزادان، پارگی کیسه آب و تولد نوزاد با عفونت سیستمیک شود (۱۰). از آنجا که اطلاعات کمی در مورد نقش هر فاکتور ویروالانس و بیماری زایی ایزوله ها

وجود موتاسیون در ژن اصلی تنظیم‌کننده این ژن، *prfA*، بیان اینترنالین B در مقایسه با سایر فاکتورهای بیماری‌زایی بیشتر افزایش یافته (رونویسی بیش از ۴۰ برابر) که منجر به ورود بیشتر باکتری نیز شده است. این محققین، عنوان کرده‌اند که نقش اینترنالین‌های A و B و لیستریولیزین O که در میان سویه‌های بالینی لیستریا مونوسیتوژنز محافظت شده‌اند، بسته به بافت و سویه، متفاوت است.

نتیجه گیری

میزان سطح بیان *inlB* و تهاجم سلولی، به تنهایی نمی‌تواند تفاوت در بیماری‌زایی ایزوله‌ها را به خوبی توجیه کند. لذا مطالعات وسیع‌تر و با حجم نمونه بیشتر، برای شناسایی عوامل تعیین‌کننده باکتریایی و احتمالاً میزبانی مورد نیاز است.

سپاس‌گزاری

مقاله حاضر حاصل از طرح مصوب دانشگاه علوم پزشکی کرمان (کد ۹۵/۲۱۴) و با حمایت مالی دانشگاه علوم پزشکی کرمان می‌باشد. لذا محققان بر خود لازم می‌دانند که از معاونت محترم پژوهشی و هم‌چنین از پرسنل بیمارستان افضل‌پور کرمان که در اجرای هر چه بهتر این تحقیق صمیمانه همکاری نمودند، تشکر و قدردانی نمایند.

حامی مالی: دانشگاه علوم پزشکی کرمان

تعارض منافع: وجود ندارد.

ملاحظات اخلاقی

پیش‌نویس این مطالعه توسط کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی کرمان، با کد اخلاق شماره ۱۳۹۵-۳۹۹ IR.KMU.REC مورد تایید قرار گرفته است.

مشارکت نویسندگان

شهلا منصوری و فرشته صفاری در ارائه ایده و طراحی مطالعه، زهرا ظهیر نیا در جمع‌آوری داده‌ها، فرشته صفاری و زهرا ظهیر نیا در تجزیه و تحلیل داده‌ها مشارکت داشته و همه نویسندگان در تدوین، ویرایش اولیه و نهایی مقاله و پاسخگویی به سوالات مرتبط با مقاله سهیم هستند.

تهاجم به دو رده سلولی با منشا مختلف مورد بررسی قرار گرفت. که هر دو رده، برای مسیر تهاجمی فقط از این گیرنده استفاده می‌کنند. اما برخلاف انتظار ما، تهاجم به این دو رده سلولی، مشابه نبود. از سوی دیگر، کاهش بیان *inlB* فقط در یک ایزوله که قادر به تهاجم به هر دو رده سلولی بود، مشاهده شد. هر چند دستیابی به نتیجه دقیق، با توجه به حجم کم نمونه (خصوصاً موارد جدا شده از سقط) و نیز عدم بررسی همزمان سایر ژن‌های مطرح در تهاجم باکتری، دشوار است ولی با کنار هم قرار دادن این موارد، می‌توان گفت که بیان *inlB* احتمالاً تحت تاثیر فاکتورهای دیگری قرار دارد یا حتی ممکن است فاکتورهای میزبانی در این پروسه دخیل باشند. از دیگر چالش‌های موجود در تفسیر نتایج، این است که مطالعات محدود موجود در این زمینه، غالباً بر روی سویه‌های استاندارد لیستریا مونوسیتوژنز و یا سویه‌های جدا شده از منابع غذایی انجام شده است. در مطالعه‌ای که توسط Tamburo و همکاران بر روی ایزوله‌های لیستریا مونوسیتوژنز جدا شده از منابع غذایی و بالینی، انجام شد، سطح بیان برخی ژن‌های ویروالانس و نیز تهاجم سلولی به رده سلولی Caco-2 در این ایزوله‌ها بررسی و مقایسه شد (۹). در این مطالعه نیز مشابه یافته‌های ما، اختلاف معناداری بین ایزوله‌های با منشا متفاوت، از نظر بیان ژن‌های ویروالانس (از جمله *inlB*) مشاهده نشد. البته برخلاف مطالعه ما، آن‌ها اختلاف معناداری در قدرت تهاجم ایزوله‌های با منشا متفاوت (تهاجم بیشتر در ایزوله‌های بالینی) گزارش کردند. هم‌چنین با بررسی ارتباط میان میزان بیان ژن *inlA* با تهاجم سلولی، ارتباط معناداری گزارش نکردند که تا حدودی نتایج مطالعه ما در مورد عدم ارتباط بیان *inlB* با قدرت تهاجم سلولی را تایید می‌کند. مقایسه سطح بیان *inlB* و تهاجم سلولی نیز ارتباط مشخصی را با پیامد بارداری نشان نداد. در تایید نتایج مطالعه ما، Phleps و همکاران نیز برخلاف انتظارشان مشاهده کردند که اینترنالین B نقشی در تهاجم به هیپاتوسیت‌ها نداشته و نقش اصلی بر عهده اینترنالین A و لیستریولیزین O می‌باشد (۱۷). این محققین دلیل اختلاف نتایج خود با بسیاری از مطالعاتی که اینترنالین B را در تهاجم به سلول‌های میزبان موثر دانسته‌اند این‌طور عنوان می‌کند که در اکثر مطالعات از سویه EGD استفاده شده که به دلیل

References:

- 1-Quereda JJ, Morón-García A, Palacios-Gorba C, Dessaux C, García-del Portillo F, Pucciarelli MG, et al. *Pathogenicity and Virulence of Listeria Monocytogenes: A Trip from Environmental to Medical Microbiology*. Virulence 2021; 12(1): 2509-45.
- 2-Jackson KA, Iwamoto M, Swerdlow D. *Pregnancy-Associated Listeriosis*. Epidemiol Infect 2010; 138(10): 1503-9.
- 3-Hohmann EL, Portnoy DA. *Harrison's Principles of Internal Medicine*. 17th Edition. New York: McGraw-Hill Education; 2008: 895-7.
- 4-Wiedmann M, Bruce JL, Keating C, Johnson AE, McDonough PL, Batt CA. *Ribotypes and Virulence Gene Polymorphisms Suggest Three Distinct Listeria Monocytogenes Lineages with Differences in Pathogenic Potential*. Infect Immun 1997; 65: 2707-16.
- 5-Koopmans MM, Brouwer MC, Vázquez-Boland JA, van de Beek D. *Human Listeriosis*. Clin Microbiol Rev 2023; 36(1): e00060-19.
- 6-Werbrouck H, Grijspeerdt K, Botteldoorn N, Van Pamel E, Rijpens N, Van Damme J, et al. *Differential Inla and Inlb Expression and Interaction with Human Intestinal and Liver Cells by Listeria Monocytogenes Strains of Different Origins*. Appl Environ Microbiol 2006; 72(6): 3862-71.
- 7-Valenti M, Ranganathan N, Moore LS, Hughes S. *Listeria Monocytogenes Infections: Presentation, Diagnosis and Treatment*. BrJ Hosp Med 2021; 82(10):1-6.
- 8-Ireton K, Mortuza R, Gyanwali GC, Gianfelice A, Hussain M. *Role of Internalin Proteins in the Pathogenesis of Listeria Monocytogenes*. Mol Microbiol. 2021; 116(6):1407-19
- 9-Tamburro M, Sammarco ML, Ammendolia MG, Fanelli I, Minelli F, Ripabelli G. *Evaluation of Transcription Levels of Inla, Inlb, Hly, Bsh and Prfa Genes in Listeria Monocytogenes Strains Using Quantitative Reverse-Transcription PCR and Ability of Invasion into Human Caco-2 Cells*. FEMS Microbiol Lett 2015; 362(6): fnv018.
- 10-Zahirnia Z, Mansouri S, Saffari F. *Pregnancy-Related Listeriosis: Frequency and Genotypic Characteristics of L. Monocytogenes from Human Specimens in Kerman, Iran*. Wien Med Wochenschr 2018; 169(9-10): 226-31
- 11-Silva AS, Duarte EA, Oliveira TA, Evangelista-Barreto NS. *Identification of Listeria Monocytogenes in Cattle Meat Using Biochemical Methods and Amplification of the Hemolysin Gene*. An Acad Bras Ciênc 2020; 92: e20180557.
- 12-Orndorff PE, Hamrick TS, Smoak IW, Havell EA. *Host and Bacterial Factors in Listeriosis Pathogenesis*. Vet Microbiol 2006; 114(1-2): 1-15.
- 13-Eslami G TA. *Frequency of Listeria Monocytogenes Prfa, Acta, Inlb Genes among Infertile Women Referred to Medical Center of University by PCR Method in 2013*. NCMBJ 2015; 5(18): 95-9.

14-Rip D, Gouws PA. *Development of An Internal Amplification Control Using Multiplex PCR for the Detection of Listeria Monocytogenes in Food Products*. Food Anal Methods 2009; 2:190-6.

15-Borucki MK, Call DR. *Listeria Monocytogenes Serotype Identification by PCR*. J Clin Microbiol 2003; 41(12): 5537-40.

16-Pizarro-Cerdá J, Kühbacher A, Cossart P. *Entry of Listeria Monocytogenes in Mammalian Epithelial Cells: An Updated View*. Cold Spring Harb Perspect Med 2012; 2(11): a010009

17-Phelps CC, Vadia S, Arnett E, Tan Y, Zhang X, Pathak-Sharma S, Gavrilin MA, Seveau S. *Relative Roles of Listeriolysin O, Inla, and Inlb in Listeria Monocytogenes Uptake by Host Cells*. Infect Immun 2018; 86(10): e00555.

Evaluation the Expression Level of *inlB* and Cell Invasion in *Listeria monocytogenes* Isolated from Pregnant Women

Zahra Zahirnia¹, Shahla Mansouri¹, Fereshteh Saffari^{1,2}

Original Article

Introduction: *Listeria monocytogenes* is known as a potentially pathogen, which can cause perinatal listeriosis, results in abortion, stillbirth or premature birth. Different factors are involved in the pathogenesis, including internalin B, which mediates the internalization of bacteria into a broad range of cell lines. However, it is not clear if expression of this protein is the same between different isolates.

Methods: This study was conducted with the aim to compare *L. monocytogenes* isolated from pregnant women (n= 7) with different pregnancy outcomes (including healthy birth, still birth or blindness) and with abortion (n= 1), regarding expression level of *inlB* (internalin B encoding gene) and cell invasion.

Results: Despite overexpression of *inlB* in most of the isolates, there was heterogeneity in the expression level between different isolates and no significant association with cell invasion and/ or pregnancy outcome was found ($P > 0.05$). About half of the studied isolates were able to invade HepG2 cells, while invasion to HeLa cells (cervix carcinoma cell line) was found only in one isolate. However, the difference was not significant. Likewise, no meaningful association was found between cell invasion and pregnancy outcomes.

Conclusion: The expression level of *inlB* and cell invasion, cannot explain the difference of isolates in pathogenicity. Further studies are needed to identify bacterial and possibly host determinants.

Keywords: *Listeria monocytogenes*, Internalin B, Cell invasion, Pregnancy, Abortion.

Citation: Zahirnia Z, Mansouri SH, Saffari F. Evaluation the Expression Level of *inlB* and Cell Invasion in *Listeria monocytogenes* Isolated from Pregnant Women. J Shahid Sadoughi Uni Med Sci 2024; 32(8): 8141-49.

¹Department of Medical Microbiology (Bacteriology and Virology), Afzalipour Faculty of Medicine, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran.

²Mycology and Bacteriology Research Center, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran.

*Corresponding author: Tel: 0912671328, E-mail: fsafari@kmu.ac.ir