مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد
دوره سی و دو، شماره هشت، آبان ۱۴۰۳
تاریخ دریافت:۱۴۰۳/۰۲/۳۰
تاریخ پذیرش:۱۴۰۳/۰۵/۰۱

بررسی سطح بیان *inl*B 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 می‌شود که می‌تواند موجب لیستریوز پریناتال و به دنبال آن، سقط جنین، زایمان زودرس یا تولد نوزاد نارس شود. فاکتورهای متعددی در بیماری‌زایی این باکتری دخالت دارند، نظیر اینتر نالین B که در ورود باکتری به طیف وسیعی از رده‌های سلولی دخالت دارد. با این‌حال چندان مشخص نیست که آیا بیان این پروتئین در ایزوله‌های 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 *inl*B (ژن کد کننده اینترنالین B) و نیز تهاجم سلولی، انجام گرفت. نتایج مرتبط با بیان ژن ، با آزمون واریانس یکطرفه و با استفاده از نرم‌افزار version 16 SPSS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

نتایج: هر چند افزایش بیان ژن *inl*B در اکثر موارد مشاهده شد ولی میزان افزایش در میان ایزوله‌های مختلف، ناهمگون بوده و ارتباط معناداری با میزان تهاجم سلولی و پیامدهای بارداری نشان نداد ($P >$ ۰/۰۵). نیمی از ایزوله‌های مورد مطالعه قادر به تهاجم به سلول‌های HepG2 (رده سلولی سرطان کبد) بودند، در حالیکه تهاجم به سلول‌های HeLa ، فقط در یک ایزوله مشاهده شد، اما این اختلاف معنادار نبود. ضمناً ارتباط معناداری میان میزان تهاجم سلولی ایزوله‌ها و پیامدهای بارداری مشاهده نشد ($P >$ ۰/۰۵).

نتیجه‌گیری: میزان بیان سطح *inl*B و تهاجم سلولی، نمی‌تواند تفاوت در بیماری‌زایی ایزوله‌ها را توجیه کند. مطالعات بیشتری برای شناسایی عوامل تعیین کننده باکتریایی و احتمالاً میزبانی نیاز است.

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

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

۱-گروه میکروب 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

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-12-27]

[DOI: 10.18502/ssu.v32i8.16854]

مقدمه

لیستریا مونوسایتوژنز یک باکتری داخل سلولی اختیاری است که از عوامل ایجاد کننده بیماری‌های منتقله از غذا به‌حساب 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، به‌خصوص 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 تقریبا 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 نسبتا 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 مونوسایتوژنز 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 به‌کار می‌گیرد. لیستریا مونوسایتوژنز 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 به‌نظر می‌رسد، اینترنالین B، مسئول ورود باکتری به درون انواع رده‌های سلولی نظیر هپاتوسیت‌ها، اسپلنوسیت‌ها، فیبروبلاست‌ها و میوسیت‌های قلبی است (۸). در مطالعه‌ای بر روی ایزوله‌های بالینی و غیر بالینی لیستریا مونوسایتوژنز، 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 ویرولانس و تهاجم سلولی در ایزوله های 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 *inl*B 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 منوسایتوژنز (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 مونوسایتوژنز عبارت بود از: ۲ مورد تولد نوزاد زنده سالم، ۲ مورد تولد نوزاد مرده، ۲ مورد دوقلوزایی که در هر دو مورد یک نوزاد مرده و دیگری نابینا متولد شده بود و ۱ مورد سقط. لیستریا مونوسایتوژنز ATCC 7644 نیز به‌عنوان سویه

CC BY-NC 4.0

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-12-27]
[DOI: 10.18502/ssu.v32i8.16854]

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 C ° ۴ 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 (هایمدیا، 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 پلیمراز، صورت گرفت (۱۲). این ایزوله‌ها در محیط تریپتیکاز سوی براث (مرک، آلمان) حاوی ۱۵٪ گلیسرول، در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد، در بخش میکروب‌شناسی دانشکده پزشکی نگهداری شدند. حضور ژن‌های ویرولانس (*inl*A, *inl*B, *prf*A, *hly*, *act*A)، (۱۳،۱۴) و نیز تعیین سروتیپ‌ها (۱۵)، به روش مولکولی و با استفاده از پرایمرهای مربوطه طی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، بررسی و انجام شده که نتایج آن در جدول ۲، نشان داده شده است.

استخراج RNA و سنتز cDNA: ایزوله های 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.

بررسی بیان ژن *inl*B به روش qRT-PCR: اختصاصیت پرایمرهای مورد استفاده، *tuf*A به عنوان ژن خانه‌دار و *inl*B 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 g × ۱۰۰۰ (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

CC BY-NC 4.0

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-12-27]
[DOI: 10.18502/ssu.v32i8.16854]

رقت‌های سریالی از آن‌ها، بر روی محیط بروسلا آگار (مرک، آلمان) کشت داده شدند. سویه‌های لیستریا مونو سایتوژنز ATCC 7644 و لیستریا اینوکوآ، به ترتیب به عنوان سویه‌های مهاجم و غیر مهاجم مورد استفاده قرار گرفتند. آزمایشات بررسی تهاجم سلولی به‌صورت سه تایی انجام شد. تعداد باکتری‌های داخل سلولی به صورت واحد تشکیل دهنده کلونی (CFU) در هر میلی‌لیتر (CFU/ml) بیان شده و سطح تهاجم سلولی، حداقل به میزان CFU/ml ۳۳/۳۳ در نظر گرفته شد (۶،۹).

تجزیه و تحلیل آماری

از نرم‌افزار SPSS version 16 جهت آنالیز یافته‌ها استفاده شد. مقدار P مساوی یا کمتر از ۰۵ /۰با ضریب اطمینان ۹۵٪ به عنوان سطح معنی‌داری در نظرگرفته شد.

جدول۱. پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه

ژن هدف	ترادف الیگو نوکلئوتیدی ('۵ به '۳)	منبع
*inl*B	F- GGAAAAGCAAAAGCAIGATTTC	۹
	R-TCCATCAACATCATAACTTACTGTGTAAA	
*tuf*A	F-GCTGAAGCTGGCGACAACA	۹
	R- CTTGACCACGTTGGATATCTTCAC	

نتایج

مشخصات ایزوله‌های مورد مطالعه، شامل حضور برخی فاکتورهای بیماریزایی و سروتیپ ایزوله‌ها، که مربوط به طرح قبلی می‌باشد، در جدول ۲ نشان داده شده است. زنان باردار آلوده، پس از زایمان مورد پیگیری قرار گرفتند و پیامد بارداری آن‌ها ثبت گردید (جدول ۲).

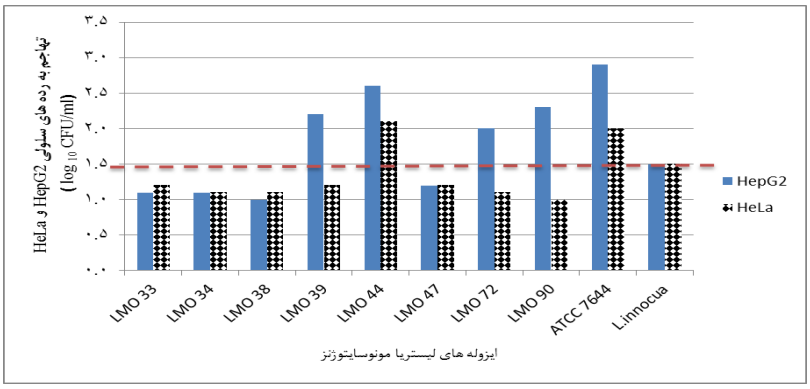
بیان ژن *inlB*: آنالیز واریانس یک‌طرفه (آزمون کروسکال والیس)، تفاوت معناداری را در سطح بیان ژن *inl*B در میان ایزوله‌های مورد بررسی نشان داد (0.05P<). ایزوله‌های LMO72 و LMO38 به ترتیب کمترین و بیشترین میزان بیان ژن را نشان دادند. در مقابل، کاهش پنج برابری در سطح بیان *inl*B تنها در یک ایزوله (LMO44)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

تهاجم به رده‌های سلولی HepG2 و HeLa: در این مطالعه از دو رده سلولی با منشا متفاوت استفاده شد. 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 ایزوله‌های باکتریایی بررسی شد. نتایج، تفاوت معناداری بین تهاجم در زمان‌های مختلف نشان نداد (P> 0.05). همانطور که در شکل ۱ نشان داده شده است، نیمی از ایزوله‌های مورد مطالعه (LMO39, LMO44, LMO72, LMO90)، قادر به تهاجم به سلول‌های HepG2 بودند، در حالی‌که تهاجم به سلول‌های HeLa، فقط در یک ایزوله (LMO44) مشاهده شد. هم‌چنین، فقط یک ایزوله (LMO44)، قادر به تهاجم به هر دو رده سلولی مورد مطالعه بود. یافته‌های این مطالعه، ارتباط معناداری بین سطح بیان *inl*B و توانایی تهاجم سلولی نشان نداد (P>۰/۰۵). جالب اینکه، ایزوله LMO44 که توانایی تهاجم به هر دو رده سلولی را داشت، کاهش بیان *inl*B را نشان داد.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-12-27]

[DOI: 10.18502/ssu.v32i8.16854]

CC BY-NC 4.0



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

جدول ۲: خصوصیات ایزوله‌های لیستریا مونو سایتوژنز: بیان نسبی *inl*B و تهاجم سلولی

پیامد بارداری	قدرت تهاجم به رده‌های سلولی HeLa	HepG2	میزان بیان **inlB** **	ژن‌های ویرولانس	سروتیپ	منبع جداسازی نمونه*	ایزوله ها
نوزاد مرده	-	-	۲۲	*actA, prf , inlB*	4b	سواب واژینال	LMO33
تولد نوزاد سالم	-	-	۱۷۲	*actA, prf , inlB*	NT	سواب واژینال	LMO34
دوقلو (یکی مرده و دیگری نابینا)	-	-	۴۲۴	*actA, prf , inlB*	NT	سواب واژینال	LMO38
تولد نوزاد سالم	-	+	۵۸	*actA, prf , inlB*	NT	سواب واژینال	LMO39
نوزاد مرده	+	+	۰/۲	*actA, prf , inlB*	NT	سواب واژینال	LMO44
تولد نوزاد سالم	-	-	۳۷۹	*actA, prf , inlB*	NT	سواب واژینال	LMO47
دوقلو (یکی مرده و دیگری نابینا)	-	+	۷/۲	*inlB , hly*	½ c	سواب واژینال	LMO72
سقط جنین	-	+	۳۰۶	*inlB*	NT	سواب واژینال	LMO90

*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 *inl*B mRNA توسط real time PCR اندازه گیری شده است.

بحث

لیستریا مونوسیتوژنز عامل اتیولوژیک لیستریوز است که یک بیماری عفونی جدی در گروه های پرخطر محسوب می‌شود. این باکتری، می‌تواند در محیط‌های ساپروفیت زنده مانده و بیماری را در میزبان‌های پستاندار القا کند (۱۶). بیشترین اهمیت آلودگی به این باکتری در زنان باردار می‌باشد. لیستریا مونوسیتوژنز یکی از معدود باکتری‌هایی است که می‌تواند از سد جنینی عبور کرده و موجب آسیب به جنین، تولد زودهنگام نوزادان، پارگی کیسه آب و تولد نوزاد با عفونت سیستمیک شود (۱۰). از آنجا که اطلاعات کمی در مورد نقش هر فاکتور ویرولانس و بیماری‌زایی ایزوله‌ها وجود دارد، لذا هر ایزوله لیستریا مونوسایتوژنز به عنوان یک پاتوژن بالقوه محسوب می‌شود یکی از عوامل مطرح در بیماری‌زایی این باکتری، اینترنالین است. این مطالعه جهت پاسخ به این سوال انجام شد که آیا میان ایزوله‌های جدا شده از زنان باردار (با پیامدهای بارداری متفاوت)، تفاوتی از نظر میزان بیان *inl*B 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 رده‌های سلولی، امکان‌پذیر می‌سازد. در میان مولکول‌های متعدد میزبانی دخیل در این پروسه به عنوان گیرنده‌های بالقوه، پروتئین Met مهم‌ترین گیرنده به‌حساب می‌آید (۱۶). در این مطالعه

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-12-27]

[DOI: 10.18502/ssu.v32i8.16854]

CC BY-NC 4.0

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 بر خلاف انتظار ما، تهاجم به این دو رده سلولی، مشابه نبود. از سوی دیگر، کاهش بیان *inl*B، 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 *inl*B 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 مونوسایتوژنز و یا سویه‌های جداشده از منابع غذایی انجام شده است. در مطالعه‌ای که توسط Tamburo و همکاران بر روی ایزوله‌های لیستریا مونوسایتوژنز جدا شده از منابع غذایی و بالینی، انجام شد، سطح بیان برخی ژن‌های ویرولانس و نیز تهاجم سلولی به رده سلولی Caco-2 در این ایزوله ها بررسی و مقایسه شد (۹). در این مطالعه نیز مشابه یافته‌های ما، اختلاف معناداری بین ایزوله‌های با منشا متفاوت، از نظر بیان ژن‌های ویرولانس (از جمله *inl*B) مشاهده نشد. البته بر خلاف 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 *inl*A 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 *inl*B و تهاجم سلولی نیز ارتباط مشخصی را با پیامد بارداری نشان نداد. در تایید نتایج مطالعه ما، Phleps و همکاران نیز بر خلاف انتظار شان مشاهده کردند که اینترنالین B نقشی در تهاجم به هپاتوسیت‌ها 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 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 *inl*B 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 تعیین کننده 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 می باشد. لذا محققان برخود لازم می‌دانند که از معاونت محترم پژوهشی و هم چنین از پرسنل بیمارستان افضلی‌پور 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

پیش نویس 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.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-12-27]

[DOI: 10.18502/ssu.v32i8.16854]

CC BY-NC 4.0

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.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-12-27]

[DOI: 10.18502/ssu.v32i8.16854]

CC BY-NC 4.0

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.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-12-27]

[DOI: 10.18502/ssu.v32i8.16854]

CC BY-NC 4.0

Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences
Vol 32| NO 8 | Oct 2024

Received: 19 May 2024
Accepted: 22 July 2024

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

Zahra Zahirnia[1], Shahla Mansouri[1], Fereshteh Saffari[†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 *inl*B (internalin B encoding gene) and cell invasion.

Results: Despite overexpression of *inl*B 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 *inl*B 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 *inl*B and Cell Invasion in *Listeria monocytogenes* Isolated from Pregnant Women.** J Shahid Sadoughi Uni Med Sci 2024; 32(8): 8141-49.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-12-27]

[DOI: 10.18502/ssu.v32i8.16854]

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

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

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

CC BY-NC 4.0