مقاله پژوهشی

بررسی اثر پروبیوتیک‌های اسپوردار بر بیان ژن‌های بیماری‌زای *hly*، *plc* و *inlA* باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز*

سجاد رجبی[۱]، داوود دربان[۲]، رباب رفیعی طباطبائی[۱]، فرزانه حسینی[۱*]

۱- گروه میکروب‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، تهران، ایران
۲- گروه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۹/۰۶/۳۱ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۹/۱۰/۰۹

چکیده

زمینه و هدف: *لیستریا مونوسیتوژنز* به‌عنوان یک عامل بیماری‌زای قابل‌انتقال از طریق مواد غذایی و مسئول ایجاد بیماری در انسان شناخته‌شده است. به علت بروز مقاومت‌های دارویی و تشکیل بیوفیلم قوی در محیط، نیاز به استفاده از روش‌های جدید مانند پروبیوتیک‌ها برای مقابله با این باکتری احساس می‌شود. مطالعه حاضر باهدف بررسی اثر پروبیوتیک‌های اسپوردار بر بیان ژن‌های بیماری‌زای *hly*، *plc* و *inlA* در باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* انجام شد.

مواد و روش‌ها: در مطالعه حاضر از سویه‌ی *لیستریا مونوسیتوژنز* سروتایپ 4b جداشده از سقط‌جنین انسان، موجود در بانک میکروبی دانشگاه علوم پزشکی ایران و سویه‌های پروبیوتیک باسیلوس اسپور دار شامل *باسیلوس لاتروسپوروس* (PTCC 1486) و *باسیلوس مگاتریوم* (PTCC1656) استفاده شد. در ساعت‌های مختلف به روش هم کشتی پروبیوتیک‌های اسپوردار در مجاورت باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* قرار گرفتند، سپس بیان ژن‌های ویرولانس *لیستریا مونوسیتوژنز* به روش real- time PCR بررسی شد.

نتایج: بیشترین کاهش بیان تحت تأثیر پروبیوتیک اسپوردار *باسیلوس لاتروسپوروس*، مربوط به ژن *plcA*، پس از ۲۴ ساعت تیمار با ۶ برابر کاهش بود. پروبیوتیک *باسیلوس مگاتریوم* بیشترین تأثیر را بر روی ژن *hly* داشت، به‌طوری‌که در ساعت‌های ۴، ۸ و ۲۴ پس از تیمار به ترتیب ۴، ۷ و ۵ برابر بیان آن نسبت به نمونه‌ی کنترل کاهش پیدا کرد.

نتیجه‌گیری: نتایج حاصل از مطالعه حاضر نشان داد که هر دو پروبیوتیک موردبررسی دارای اثر بازدارنده بر بیان ژن‌های ویرولانس *لیستریا مونوسیتوژنز* هستند و خواص مهاری و درمانی این نوع پروبیوتیک‌ها باید موردتوجه قرار گیرد.

کلمات کلیدی: *لیستریا مونوسیتوژنز*، پروبیوتیک اسپوردار، ژن‌های *hly*، *plc* و *inlA*

مقدمه

لیستریا مونوسیتوژنز، باکتری گرم مثبت درون‌سلولی و یک پاتوژن مهم منتقله از طریق غذا است که می‌تواند باعث لیستریوزیس و عفونت‌های شدید در افراد با نقص سیستم ایمنی، کودکان، زنان باردار و افراد سالخورده شود (۱،۲). گونه‌های مختلف جنس لیستریا به دلیل مقاومت در برابر شرایط مختلف، pH، دما و غلظت‌های مختلف نمک، به‌وفور در محیط اطراف شامل خاک، آب، سبزی‌های در حال فساد و غذاها به‌خصوص غذاهای آماده مصرف یافت می‌شوند (۲). این ویژگی‌ها باعث شده که این باکتری در کشورهای پیشرفته به‌عنوان شاخص آلودگی مواد غذایی مطرح باشد. علی‌رغم شیوع پایین، ۲۸٪ از کل مرگ‌ومیرهای ناشی از مسمومیت‌های غذایی و ۴٪ از موارد بستری بیمارستانی با عفونت‌های ناشی از *لیستریامونوسیتوژنز* در ارتباط است (۱،۳). سروتایپ‌های 1/2a، 1/2b، 1/2c و 4b در بیش از ۹۰ درصد نمونه‌های غذایی و حیوانی و انسانی جدا می‌شوند، سروتایپ 4b بیشترین خطر ایجاد اپیدمی‌ها را میان

*نویسنده مسئول: **فرزانه حسینی**، گروه میکروب‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، تهران، ایران
Email: Farzaneh953@yahoo.com
https://orcid.org/ 0000-0001-9344-1507

سروتایپ‌ها دارد (۴). این باکتری به کمک پروتئین‌های سطحی مانند اینترنالین A و B به لیگاندهای سطح سلول متصل می‌شود و ماشین اسکلت سلولی را دست‌کاری می‌کند و وارد سلول‌های متعددی در میزبان می‌شود پس از ورود به فاگوزم، باکتری به کمک لیستریولایزین O که یک توکسین ایجادکننده‌ی منفذ است و همچنین فسفولیپازهای A و B به‌سرعت از فاگوزم فرار می‌کند و درون سیتوزول تکثیر می‌یابد؛ این ویژگی به باکتری این امکان را می‌دهد که از پاسخ‌های سیستم ایمنی فرار کند (۵). به‌صورت کلی پاک‌سازی باکتری‌های درون‌سلولی چالش عمده‌ای برای سیستم ایمنی است (۶). وجود گزارش‌های زیادی از این باکتری در ایران بخصوص در فراورده‌های لبنی،گوشت، سبزی‌ها و غذاهای آماده مصرف و همچنین وجود مواردی از سقط‌جنین ناشی از این باکتری باعث ایجاد نگرانی شده است (۶،۷). همچنین به علت بروز مقاومت‌های دارویی، نیاز به استفاده از روش‌های جدید برای مقابله با این باکتری احساس می‌شود (۸). امروزه در بسیاری از کشورها تلاش‌های گسترده‌ای برای حذف این باکتری از چرخه‌ی مواد غذایی صورت گرفته است، ایجاد روش‌های مناسب شستشو و به‌کارگیری روش‌های مناسب استریلیزاسیون به‌منظور محدود کردن رشد این میکروارگانیسم در کارخانه‌های تولید مواد غذایی یک مسئله مهم است (۹) از طرفی تقاضای بالای مصرف‌کنندگان برای استفاده از غذاهای سالم که دارای کمترین میزان نگه‌دارنده‌های سنتتیک باشد، باعث شده تا استفاده از نگه‌دارنده‌های طبیعی در مواد غذایی بیشتر موردبررسی و ارزیابی قرار گیرد. در دهه گذشته شناسایی و استفاده از گونه‌های غیر بیماری‌زای باکتری‌ها و متابولیت‌های آن‌ها که بتوانند به سبب خاصیت آنتاگونیستی رشد باکتری‌های بیماری‌زا را متوقف کنند، موردتوجه قرارگرفته است (۱۰). یکی از روش‌هایی که امروزه موردتوجه قرارگرفته است، استفاده از پروبیوتیک‌ها است، پروبیوتیک‌ها دسته‌ی بزرگی از باکتری‌ها هستند که در بدن شخص سالم ساکن‌اند، آن‌ها غذاهای میکروبی و یا مکمل‌های غذایی هستند که اثرات مفیدی بر میزبان به‌وسیله‌ی توازن میکروب‌های روده‌ای دارند (۲). از طرف دیگر امروزه پروبیوتیک‌ها به‌عنوان جایگزین مناسب آنتی‌بیوتیک‌ها برای مقابله با عوامل پاتوژن در انسان و حیوان معرفی می‌شوند. این باکتری‌ها در محیط‌های غذایی خصوصاً محصولات لبنی قابل‌کشت هستند. پروبیوتیک‌های جنس باسیلوس بخش عمده‌ی پروبیوتیک‌های مورداستفاده در صنعت و مواد غذایی است. پروبیوتیک‌های تولیدکننده‌ی اسپور جنس باسیلوس به خاطر توانایی ذاتی تولید شمار زیادی از پروتئین‌های ترشحی، آنزیم‌ها، ترکیبات ضد میکروبی و ویتامین‌ها در چرخه‌ی تولید مواد غذایی بسیاری از کشورها مورداستفاده قرار می‌گیرند (۱۱). به‌طورکلی به دلیل توانایی زیاد این جنس از پروبیوتیک‌ها در تحمل شرایط سخت پروسه‌ی تولید مواد غذایی و محیط دستگاه گوارش و خواص درمانی که دارند، کاندید جالب‌توجهی برای استفاده‌های گسترده در بخش صنعت، امنیت غذایی و سلامت می‌باشند (۱۱). با توجه به اینکه در کشور ما مطالعات مختلف بر روی نمونه‌های غذایی، بالینی و دامی؛ وجود باکتری پاتوژن *لیستریا مونوسیتوژنز* را نشان داده‌اند و ازآنجایی‌که این باکتری یک باکتری منتقله از طریق مواد غذایی و بخصوص فراورده‌های لبنی است (۱۱) و با توجه به اهمیت مطالعه‌ی جنبه‌های مختلف پروبیوتیک‌های اسپوردار، مطالعه حاضر باهدف بررسی اثر پروبیوتیک‌های اسپوردار بر بیان ژن‌های بیماری‌زای hly، plc و inlA *لیستریا مونوسیتوژنز* برای بررسی خواص مهاری این نوع پروبیوتیک‌ها انجام شد.

مواد و روش‌ها

سویه‌های باکتریایی موردبررسی

در این مطالعه از سویه‌ی *لیستریا مونوسیتوژنز* سروتایپ 4b جداشده از سقط‌جنین انسان موجود در بانک میکروبی دانشگاه علوم پزشکی ایران و سویه‌های پروبیوتیک باسیلوس اسپوردار؛ شامل *باسیلوس لاترواسپوروس*[1] (PTCC 1486) و *باسیلوس مگاتریوم*[2] (PTCC1656) از مرکز علمی پژوهشی علمی صنعتی خریداری‌شده استفاده شد.

شناسایی ژن‌های hly, plc, inlA با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

ابتدا باکتری *لیستریامونوسیتوژنز* بر روی محیط کشت اختصاصی پالکام آگار (Merk، آلمان) کشت داده شد و به مدت ۴۸ ساعت در ۳۷ در جه سانتی‌گراد انکوبه گردید. سپس از کلنی‌های رشد یافته، DNA با استفاده از روش جوشاندن استخراج گردید. حضور قطعات ژنی hly، plc و inlA توسط PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی طراحی‌شده با استفاده

[1] *Bacillus laterosporus*

[2] *Bacillus megaterium*

از نرم‌افزارهای الیگو ۷ (oligo 7.60) و پرایمر ۳ (Primer *3* Web) تعیین شد (جدول ۱). مخلوط واکنش PCR (در حجم کلی ۲۵ µl) شامل ۱ µl DNA استخراج‌شده با غلظت ۱۰ µg/ml، ۱۳/۳ µl آب مقطر استریل، ۰/۷ µl هر پرایمر با غلظت ۱۰ pmol/µL و ۱۰ µL مسترمیکس ۱x (Ampliqon Co., Denmark) بود.

رسیدند. سپس ۵۰۰ میکرولیتر از محیط کشت براث حاوی باکتری برداشته شد و پس از سانتریفیوژ، رسوب هر یک از باکتری‌های موردمطالعه در ۵۰۰ میکرولیتر محیط براث تازه نوترینت حل گردید. سپس غلظت نیم مک فارلند از باکتری‌ها تهیه و به لوله‌ی حاوی ۴۰۰ میکرولیتر محیط براث افزوده شد؛ بنابراین سه لوله که حاوی باکتری *لیستریامونوسیتوژنز* و

جدول ۱- توالی نوکلئوتیدی پرایمرهای مورداستفاده در مطالعه حاضر

Genes		Primer sequence (5′------- 3′)	Product Size	Tm (°C)
hly	F	AAGCTGCTTTTGATGCTGCC	116 bp	60
	R	ATCTTTTGCGGAACCTCCGT		
plcA	F	AAATTCGGCATGCAGTTCGG	185 bp	60
	R	GCAGCATACTGACGAGGTGT		
inlA	F	AAATCCTGTGGCACCACCAA	134 bp	60
	R	TGCTGGCTGAATTCCCAGTT		
16srRNA	F	TAGTCCACGGAGACGTGCTA	163 bp	60
	R	GTCATCGAATCTGCCGGGAT		

واکنش PCR در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، ۹۵ درجه به مدت ۱ دقیقه و ۳۵ سیکل، ۶۰ درجه به مدت ۱ دقیقه و ۷۲ درجه به مدت ۲۵ ثانیه و مرحله نهایی در مدت‌زمان ۵ دقیقه در ۷۲ درجه انجام شد.

انجام هم کشت ی[3] باسیلوس‌ها با باکتری *لیستریامونوسیتوژنز*

برای بررسی تأثیر سویه‌های پروبیوتیک اسپوردار موردمطالعه بر روی رشد *لیستریا مونوسیتوژنز* از روش هم کشتی استفاده شد. ابتدا باکتری *لیستریامونوسیتوژنز* بر روی محیط کشت BHI آگار و سپس BHI براث کشت داده شد، همچنین ویال حاوی باکتری‌های پروبیوتیک لیوفلیزه *باسیلوس لاتروسپوروس* و *باسیلوس مگاتریوم* در محیط نوترینت براث طبق پروتکل همراه ویال‌ها کشت داده شدند. سپس از کشت ۲۴ ساعته هر باکتری مقدار ۱ میلی‌لیتر از آن‌ها به ۹ میلی‌لیتر محیط نوترینت براث اضافه و در انکوباتور شیکردار ۳۷ درجه قرار داده شدند، پس از حدود ۳ ساعت باکتری‌ها به فاز لگاریتمی (OD برابر با ۰/۲)

باسیلوس لاتروسپوروس، باکتری *لیستریامونوسیتوژنز* و *باسیلوس مگاتریوم* و لوله شاهد که فقط حاوی باکتری *لیستریامونوسیتوژنز* بود، درون انکوباتور ۳۷ درجه قرار داده شد و در ساعت‌های صفر، ۲، ۴، ۸ و ۲۴ ساعت، برای بررسی بیان ژن‌های hly, plc, inlA موردبررسی قرار گرفت. برای این منظور؛ مقادیر مشخصی به‌صورت رقت سریالی در محیط کشت اختصاصی باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* یعنی محیط کشت پالکام آگار (*PALCAM agar*) تلقیح شد.

بررسی تأثیر پروبیوتیک‌های موردمطالعه بر روی بیان ژن‌های ویرولانس لیستریامونوسیتوژنز

برای بررسی اثر پروبیوتیک‌های اسپور دار بر روی بیان ژن‌های بیماری‌زای باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز*، پس از تیمار باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* با پروبیوتیک‌های اسپوردار *باسیلوس لاتروسپوروس* و *باسیلوس مگاتریوم* در ساعت‌های صفر،۲، ۴، ۸ و ۲۴ ساعت به کمک کیت استخراج RNA (ROCHE, Germany) و طبق پروتکل شرکت سازنده RNAی کل جداسازی

[3] Co-culture

شد؛ و سپس سنتز cDNA با استفاده از کیت تاکارا انجام شد. از پرایمرهای ذکرشده در جدول ۱ برای تکثیر ژن‌های hly، plc و inlA استفاده شد. ژن 16SrRNA به‌عنوان کنترل داخلی استفاده شد. Real Time PCR در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه، ۳۵ سیکل در ۹۵ درجه به مدت ۱۵ ثانیه و ۶۰ درجه به مدت ۱ دقیقه انجام گردید.

تحلیل آماری

داده‌های به‌دست‌آمده با استفاده از آزمون آماری Student's t-tests مورد آنالیز قرار گرفتند و P<۰/۰۵ معنادار در نظر گرفته شد.

نتایج

برای تأیید حضور ژن‌های موردمطالعه در باکتری *لیستریامونوسیتوژنز* تکنیک واکنش زنجیره‌ای پلیمراز انجام شد، سویه‌ی موردمطالعه واجد تمام ژن‌های موردبررسی، یعنی hly، plc و inlA بود (شکل ۱).

بود که کاهش ۶ برابری را نشان داد همچنین در این زمان ژن hly نیز ۵ برابر کاهش پیدا کرد، کمترین کاهش بیان مربوط به ژن دخیل در اتصال باکتری *لیستریامونوسیتوژنز* یعنی ژن inlA بوده به‌طوری‌که در ساعت‌های ۲ و ۴ میزان ۱ برابر کاهش پیدا کرد ولی پس از ۲۴ ساعت این مقدار به ۳ برابر کاهش رسید. بیان هر سه ژن plcA، hly و inlA در ساعت ۲، در مقایسه با شاهد، به میزان ۱ برابر کاهش پیدا کرد. در ساعت ۴ ژن plcA، با ۳ برابر کاهش، بیشترین کاهش بیان را نشان داد. در ساعت ۸، میزان بیان ژن‌های plcA، hly به یک‌میزان یعنی ۴ برابر کاهش پیدا کرد، درحالی‌که ژن inlA، ۲ برابر کاهش بیان نشان داد. همچنین در مورد تأثیر پروبیوتیک مگاتریوم در همین زمان‌ها نتایج تقریباً مشابهی به دست آمد (نمودار ۱)، با این تفاوت که این پروبیوتیک بیشترین تأثیر را بر روی ژن کد کننده‌ی توکسین لیستریولایزین O یعنی ژن hly داشت، به‌طوری‌که در ساعت‌های ۴، ۸ و ۲۴ پس از تیمار به ترتیب ۴، ۷ و ۵ برابر بیان آن نسبت به نمونه‌ی کنترل کاهش پیدا کرد، این تغییرات بیان برای ژن

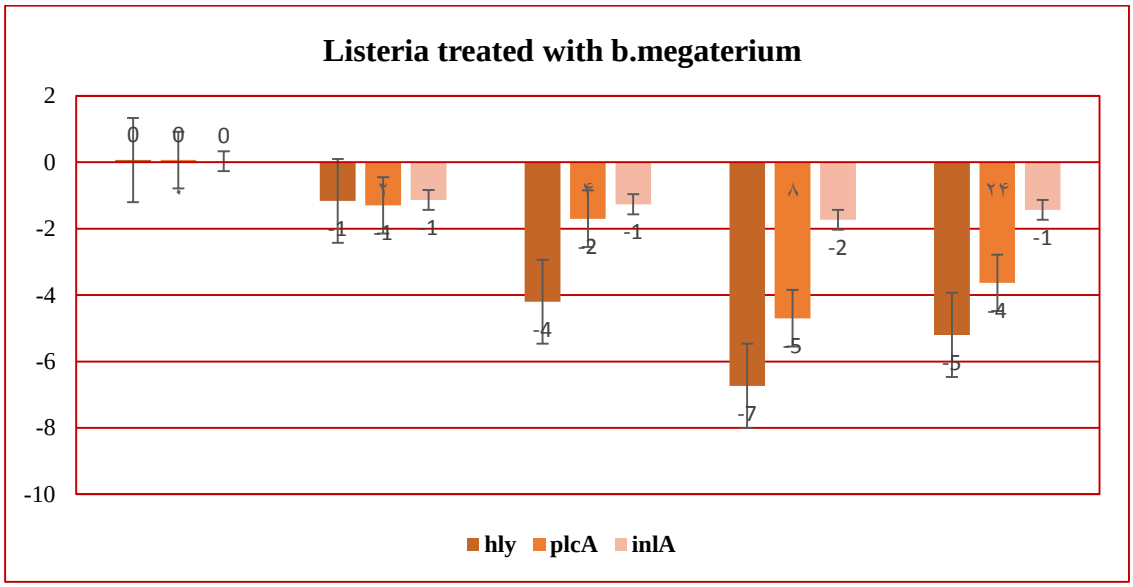


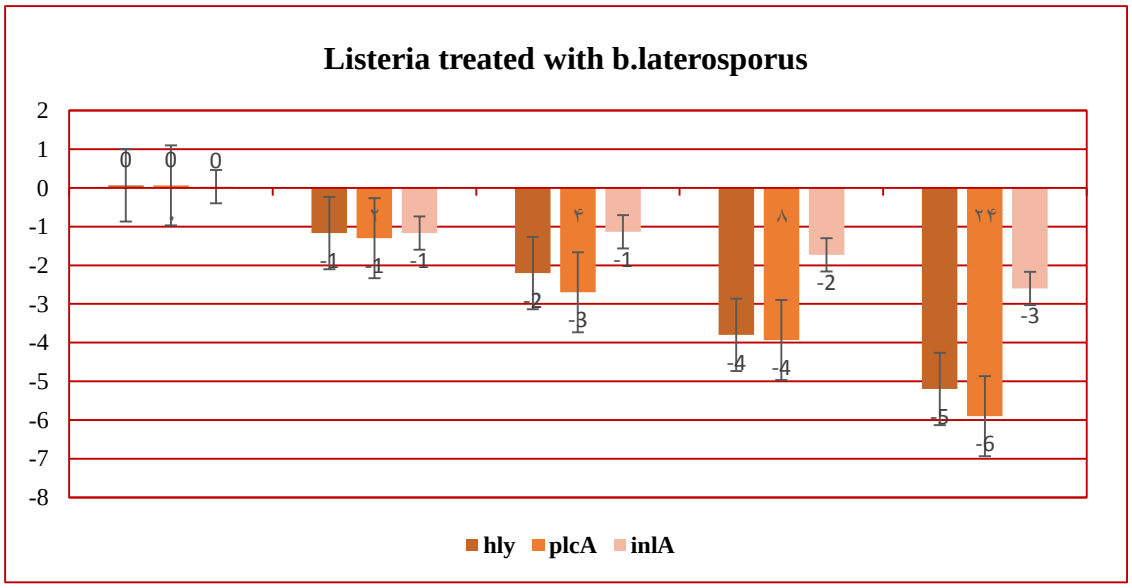
شکل ۱– الکتروفورز محصولات ژن‌های plcA، hly و inlA و 16SrRNA باکتری *لیستریامونوسیتوژنز* در حضور مارکر 50bp

نتایج حاصل از بررسی بیان ژن‌های ویرولانس باکتری *لیستریامونوسیوژنز* تیمار شده با پروبیوتیک‌های اسپوردار

نتایج تغییرات بیان ژن نشان داد که پروبیوتیک اسپوردار *باسیلوس لاتروسپوروس* در ساعت‌های ۲، ۴، ۸ و ۲۴ باعث کاهش بیان ژن‌های موردمطالعه می‌شود (P ≤۰/۰۱) (نمودار ۱)، بیشترین کاهش بیان مربوط به ژن plcA پس از ۲۴ ساعت تیمار

plcA در زمان‌های فوق ۲، ۵ و ۴ برابر کاهش را نشان داد. میزان کاهش بیان برای ژن inlA در ساعت‌های ۴، ۸ و ۲۴ به ترتیب ۱، ۲ و ۱ برابر بود. همچنین میزان تغییر بیان برای هر سه ژن مذکور در ساعت ۲، ۱ برابر بود (P ≤۰/۰۱). به‌طورکلی دوسویه پروبیوتیک اسپوردار موردمطالعه روی بیان ژن‌های ویرولانس تأثیر منفی داشتند و باعث کاهش بیان آن‌ها شدند، ولی ژن‌های hly و plcA بیشتر تحت تأثیر قرار گرفتند.





نمودار ۱- تغییرات بیان ژن‌های موردمطالعه در ساعت‌های مختلف تحت تیمار با پروبیوتیک‌های *باسیلوس لاتروسپوروس* و *باسیلوس مگاتریوم*، نتایج به کمک ژن کنترل داخلی 16srRNA نرمالایز شده است ($P \leq ۰/۰۱$).

بحث

لیستریا منوسیتوژنز یک باکتری پاتوژن منتقله از مواد غذایی است که به‌طور گسترده‌ای در محیط‌زیست حضور دارد. این باکتری عامل بیماری لیستریوزیس است که یک بیماری کشنده مخصوصاً در بیماران و گروه‌های حساس جامعه است (۱). وجود گزارش‌های زیادی از این باکتری در ایران بخصوص در فراورده‌های لبنی، گوشت، سبزی‌ها و غذاهای آماده مصرف و همچنین وجود مواردی از سقط‌جنین ناشی از این باکتری باعث ایجاد نگرانی شده است (۱۶-۱۲). تا چند سال پیش به نظر می‌رسید که *لیستریا مونوسیتوژنز* نسبت به بیشتر آنتی‌بیوتیک‌های مورداستفاده جهت درمان لیستریوزیس، حساس مانده است باوجوداین در سال‌های اخیر، سویه‌های مقاوم باکتری نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف گزارش‌شده است (۱۹-۱۷). با بروز مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی تلاش در جهت یافتن آنتی‌بیوتیک‌های جدید برای حذف باکتری‌های مقاوم افزایش‌یافته است. به‌طورکلی امروزه مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی به‌عنوان یکی از بزرگ‌ترین مشکلات در مدیریت عفونت‌های

باکتریایی مطرح می‌باشند (۲۰). اگرچه تلاش‌های فراوانی بر روی پیدایش و شناسایی آنتی‌بیوتیک‌های جدید صورت گرفته است، اما شناسایی روش‌های جدید برای مهار میکروب‌های بیماری‌زا مهم بوده و در کنترل عفونت نقش برجسته‌ای را بازی می‌کند. یکی از این روش‌ها استفاده از پروبیوتیک‌ها است. علت علاقه‌ی محققین و شرکت‌های تولیدکننده‌ی تجاری به پروبیوتیک‌ها، در دسترس بودن آن‌ها، سازگاری و ارزان بودن آن‌ها است (۲۱). گروه عمده‌ی پروبیوتیک‌هایی که در سال‌های اخیر، به‌عنوان مکمل غذایی و تقویت‌کننده مصرف روزانه دارند، *لاکتوباسیلوس*‌ها هستند که به علت پایداری و تمایل زیاد به مواد غذایی، مورداستفاده قرار می‌گیرند. نقش حفاظتی باکتری‌های لاکتیک اسید به علت تولید اسیدهای ارگانیک، ترکیبات ضد میکروبی مانند هیدروژن پراکسید، دی استیل، استالدئید و باکتریوسین است (۲۱). همچنین امروزه پروبیوتیک‌های اسپوردار نیز موردتوجه ویژه‌ای قرار گرفتند، تحقیقات نشان داده که پروبیوتیک‌های اسپوردار ظرفیت بالایی در تولید مواد ضد میکروبی و ویتامین‌ها دارند، همچنین به علت ماندگاری و دوام بالای اسپور آن‌ها در طی پروسه‌های فراوری مواد غذایی توجه زیادی را به خود جلب کرده‌اند. در این مطالعه از دو پروبیوتیک اسپوردار *باسیلوس لاتروسپوروس* و *باسیلوس مگاتریوم* برای بررسی اثرات مهاری بر روی پاتوژن مهم غذایی یعنی باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* استفاده شد.

نتایج تغییرات بیان ژن در این مطالعه نشان داد که پروبیوتیک اسپوردار لاتروسپوروس در ساعت‌های ۲، ۴، ۸ و ۲۴ باعث کاهش بیان ژن‌های موردمطالعه می‌شود، بیشترین کاهش بیان مربوط به ژن plcA پس از ۲۴ ساعت تیمار بود که کاهش ۶ برابری را نشان داد. همچنین در این زمان ژن hly نیز ۵ برابر کاهش پیدا کرد، کمترین کاهش بیان مربوط به ژن دخیل در اتصال باکتری *لیستریامونوسیتوژنز* یعنی ژن inlA بود به‌طوری‌که در ساعت‌های ۲ و ۴ میزان ۱ برابر کاهش پیدا کرد ولی پس از ۲۴ ساعت این مقدار به ۳ برابر کاهش رسید. همچنین در مورد تأثیر پروبیوتیک مگاتریوم در همین زمان‌ها نتایج تقریباً مشابهی به دست آمد با این تفاوت که این پروبیوتیک بیشترین تأثیر را بر روی ژن کد کننده‌ی توکسین لیستریولایزن O یعنی ژن hly داشت، به‌طوری‌که در ساعت‌های ۴ و ۸ پس از تیمار به ترتیب ۴ و ۷ برابر بیان آن نسبت به نمونه‌ی کنترل کاهش پیدا کرد، این تغییرات بیان برای ژن plcA در زمان‌های فوق ۲ و ۵ برابر کاهش را نشان داد. به‌طورکلی دوسویه پروبیوتیک اسپوردار موردمطالعه روی بیان ژن‌های ویرولانس تأثیر منفی داشتند، ولی بیشتر ژن‌های hly و plcA تحت تأثیر قرار گرفتند، این در حالی است که در این مطالعه از غلظت‌های یکسان پروبیوتیک‌ها و پاتوژن استفاده شد.

نتایج برخی مطالعات بامطالعه حاضر هم سو بود و لاکتوباسیل باعث کاهش میزان رونویسی ژن hlyA شد. در مطالعه صورت گرفته توسط Deng و همکاران در سال ۲۰۲۰، لاکتوباسیل‌های رژیم غذایی به‌طور قابل‌توجهی مانع تکثیر *لیستریا مونوسیتوژنز* در دستگاه گوارش و حمله آن به سایر اندام‌های حیاتی در مرغ گوشتی شدند. ۷ روز پس از تجویز، لاکتوباسیل‌های رژیم غذایی باعث کاهش مشخصات mRNA فاکتورهای حدت *لیستریا مونوسیتوژنز* ازجمله اتولایزین آمیداز (Ami)، فلاژلین (FlaA)، لیستریولیزین O (HlyA)، اینترنالین A (InlA) و اینترنالین B (InlB)در مخاط روده مرغ گوشتی شدند (P<۰/۰۵) (۲۲). لیستریولیزین O رمزگذاری شده توسط ژن hlyA یک سم ایجادکننده منفذ است که توسط باکتری تولید می‌شود تا غشای واکوئل را مختل کرده و باعث ورود باکتری به سیتوزول شود (۲۳). برخلاف نتایج حاصل از مطالعه حاضر، در مطالعه Dong و همکاران، لاکتوباسیلوس پلانتاروم CICC6257، هیچ تأثیری بر میزان بیان ژن hly نداشت (۲۴). بنابراین، برای تأیید اثر سویه‌های لاکتوباسیل بر حذف *لیستریا مونوسیتوژنز*، مطالعات بیشتری لازم است.

یکی از مهم‌ترین مکانیسم پروبیوتیک‌ها تولید باکتریوسین‌ها است که شناخته‌شده‌ترین باکتریوسین دارای فعالیت ضد لیستریایی باکتریوسین نایسین است، این باکتریوسین تا به امروز تنها باکتریوسین مورد تأیید FDA است به‌طوری‌که برای مبارزه با لیستریا در بیشتر کشورها در صنعت مواد غذایی استفاده می‌شود. به‌خوبی اثبات‌شده است که لاکتوباسیل‌های پروبیوتیک با بهینه‌سازی میکرو فلور روده، مهار برخی عوامل بیماری‌زا، در سلامتی میزبان نقش دارند. برای مثال؛ فعالیت ضد باکتریایی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس علیه *لیستریا مونوسیتوژنز* در پنیر گزارش‌شده است (۲۵). همچنین فعالیت ضد لیستریایی لاکتوباسیلوس پلانتاروم از طریق تولید باکتریوسین و خاصیت چسبندگی در شرایط آزمایشگاهی و در موش نشان داده‌شده است (۲۶).

در مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۰ توسط Ruiz و همکاران بر روی اثر نایسین بر روی رشد باکتری لیستریا در غذاهای آماده‌ی مصرف (Ready to use) نشان دادند که حتی غلظت‌های ۰/۴ و ۰/۵ درصد از نایسین باعث کاهش رشد باکتری به میزان log ۴ می‌شود، ازاین‌رو آن‌ها پیشنهاد کردند که نایسین طی مراحل فرآوری به مواد غذایی اضافه شود (۲۷). نتایج این مطالعه با نتایج مطالعه‌ی حاضر هم‌خوانی دارد، چراکه در مطالعه‌ی حاضر نیز با استفاده از پروبیوتیک‌های اسپورزا کاهش بیان ژن‌های دخیل در بیماری‌زایی باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* به اثبات رسیده است. اینترنالین‌ها ازجمله InlA و InlB توسط *لیستریا مونوسیتوژنز* برای اتصال به کادهرین و فاگوسیتوز سلول‌های میزبان مورداستفاده قرار می‌گیرند و ممکن است در مراحل مختلف عفونت، به‌ویژه هدف قرار دادن ارگان‌های خاص، ایفای نقش کنند (۲۸). اولین مرحله برای عفونت‌زایی *لیستریا مونوسیتوژنز* عبور از سد روده است. در مطالعه حاضر، پروفایل ژنی InlA تحت تیمار لاکتوباسیل کاهش یافت و این بدان معنی است که پروبیوتیک‌ها می‌توانند ظرفیت حمله پاتوژن را کاهش دهند؛ که مشابه نتیجه حاصل از مطالعه Deng و همکاران بود (۲۲).

در مطالعات متعدد نقش ژن‌های hly، plc و inlA بر روی توانایی بیماری‌زایی باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* به اثبات رسیده است. ازجمله در مطالعه‌ی انجام‌شده توسط Temoin و همکاران در سال ۲۰۰۸ نشان داده شد که برخی از باکتری‌های لیستریا مونوسیتوژنز که پتانسیل بیماری‌زایی کمتری از خود نشان می‌دادند در ژن‌های plc و inlA دچار موتاسیون‌های ثابتی شده بودند (۲۹). Riberio و همکاران در سال ۲۰۱۶ به بررسی و استخراج باکتریوسین تولیدشده از سویه لاکتوکوکوس لاکتیس ایزوله شده از نوعی پنیر خالص پرداختند. نتایج آن‌ها در محیط کشت و در پنیر نشان داد که این‌گونه یک بیوکنترل در مقابل لیستریا است. باکتریوسین تولیدی یک بازدارنده قوی در مقابل پاتوژن‌های غذایی محسوب می‌شود. آن‌ها گزارش کردند که این سویه چسبندگی لیستریا را به سلول‌های روده‌ای کاهش می‌دهد و خود در رقابت با لیستریا جایگزین آن می‌شود (۳۰). به‌طورکلی مطالعات زیادی روی باکتری‌های لاکتیک اسید انجام‌شده (۳۳-۳۱) و به‌طور گسترده در صنعت مواد غذایی و پزشکی و درمانی از آن‌ها استفاده می‌شود، اما مطالعات روی باسیلوس‌های اسپوردار کمتر انجام‌شده است، ولی تحقیقات اخیر نشان داده است که توانایی و ظرفیت بالایی در تولید مواد و متابولیت‌های مفید و ضد میکروبی دارند.

نتیجه‌گیری

با توجه به یافته‌های مطالعه‌ی حاضر می‌توان نتیجه‌گیری نمود که پروبیوتیک‌های اسپوردار مانند باکتری‌های *باسیلوس مگاتریوم* و *باسیلوس لاتروسپوروس* با توجه به ظرفیت بالای متابولیتی آن‌ها قادر هستند که در آینده نزدیک مانند لاکتوباسیلوس‌ها جهت کاربردها و مصارف بالینی، دارویی و غذایی مورد سرمایه گزاری قرار گیرند. در مطالعه‌ی حاضر تأثیر چشمگیر این باکتری‌ها بر بیان ژن‌های بیماری‌زایی باکتری *لیستریامونوسیتوژنز* به‌عنوان یکی از مهم‌ترین باکتری‌های پاتوژن غذایی و محیطی به اثبات رسید. درهرحال برای تأیید نهایی این باکتری‌ها جهت مصارف صنعتی و پزشکی نیاز به شناسایی مکانیسم دقیق متابولیسم آن‌ها، بررسی ژنومی سویه‌های پروبیوتیک اسپوردار ازنظر وجود ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی و همچنین شناخت بهتر شرایط اسپور زایی آن‌ها در درون بدن و یا محیط است. نتایج مطالعه‌ی حاضر نویدبخش آینده‌ای است که در آن تکثیر و بیماری‌زایی باکتری *لیستریامونوسیتوژنز* هر چه‌بهتر توسط باکتری‌های *باسیلوس مگاتریوم* و *باسیلوس لاتروسپوروس* کنترل و مدیریت گردد.

تشکر و قدردانی

این مقاله با کد ثبت ۱۵۷۳۰۵۴۱۱۹۱۰۲۰، از پایان‌نامه دوره دکتر تخصصی میکروب‌شناسی مصوب و دفاع شده در دانشگاه علوم پزشکی آزاد اسلامی واحد تهران شمال استخراج‌شده است. نویسندگان بر خود لازم می‌دانند مراتب تشکر صمیمانه خود را از کارکنان بخش میکروب‌شناسی دانشگاه علوم پزشکی بابت کمک در انجام و ارتقای کیفی این پژوهش، اعلام کنند.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ‌گونه تعارض منافعی را اعلام نکرده‌اند.

References

1. Shivaee A, Shahbazi S, Gholami A, Masjedian Jazi F. Investigating the prevalence of resistance genes in Listeria monocytogenes isolated from food and clinical samples. Medical Science Journal of Islamic Azad Univesity-Tehran Medical Branch. 2019;29(4):322-8.
2. Buchanan RL, Gorris LG, Hayman MM, Jackson TC, Whiting RC. A review of Listeria monocytogenes: an update on outbreaks, virulence, dose-response, ecology, and risk assessments. Food control. 2017;75:1-13.
3. Pombinho R, Vieira A, Camejo A, Archambaud C, Cossart P, Sousa S, et al. Virulence gene repression promotes Listeria monocytogenes systemic infection. Gut Microbes. 2020:1-14.
4. Ryser ET, Marth EH. Listeria, listeriosis, and food safety: CRC press; 2007.
5. Osman KM, Kappell AD, Fox EM, Orabi A, Samir A. Prevalence, Pathogenicity, Virulence, Antibiotic Resistance, and Phylogenetic Analysis of Biofilm-Producing Listeria monocytogenes Isolated from Different Ecological Niches in Egypt: Food, Humans, Animals, and Environment. Pathogens. 2020;9(1):5.
6. Bierne H, Sabet C, Personnic N, Cossart P. Internalins: a complex family of leucine-rich repeat-containing proteins in Listeria monocytogenes. Microbes and Infection. 2007;9(10):1156-66.
7. Camejo A, Carvalho F, Reis O, Leitão E, Sousa S, Cabanes D. The arsenal of virulence factors deployed by Listeria monocytogenes to promote its cell infection cycle. Virulence. 2011;2(5):379-94.
8. Ramaswamy V, Cresence VM, Rejitha JS, Lekshmi MU, Dharsana K, Prasad SP, et al. Listeria-review of epidemiology and pathogenesis. Journal of Microbiology Immunology and Infection. 2007;40(1):4.
9. Radoshevich L, Cossart P. Listeria monocytogenes: towards a complete picture of its physiology and pathogenesis. Nature Reviews Microbiology. 2018;16(1):32-46.
10. Hall M, Grundström C, Begum A, Lindberg MJ, Sauer UH, Almqvist F, et al. Structural basis for glutathione-mediated activation of the virulence regulatory protein PrfA in Listeria. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2016;113(51):14733-8.
11. Mansouri-Najand L, Kianpour M, Sami M, Jajarmi M, editors. Prevalence of Listeria monocytogenes in raw milk in Kerman, Iran. Veterinary Research Forum; 2015: Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran.
12. Coelho C, Brown L, Maryam M, Burnet MC, Kyle JE, Heyman HM, et al. Listeria monocytogenes virulence factors are secreted in biologically active Extracellular Vesicles. bioRxiv. 2017:210906.
13. Abdollahzadeh E, Ojagh SM, Hosseini H, Ghaemi EA, Irajian G, Heidarlo MN. Antimicrobial resistance of Listeria monocytogenes isolated from seafood and humans in Iran. Microbial pathogenesis. 2016;100:70-4.
14. Hamidiyan N, Salehi-Abargouei A, Rezaei Z, Dehghani-Tafti R, Akrami-Mohajeri F. The prevalence of Listeria spp. food contamination in Iran: A systematic review and meta-analysis. Food research international. 2018;107:437-50.
15. Akrami-Mohajeri F, Derakhshan Z, Ferrante M, Hamidiyan N, Soleymani M, Conti GO, et al. The prevalence and antimicrobial resistance of Listeria spp in raw milk and traditional dairy products delivered in Yazd, central Iran (2016). Food and chemical toxicology. 2018;114:141-4.
16. Mansouri-Najand L, Hamzeh Aliabad S, Fatemi N. Molecular Identification of Listeria monocytogenes in Raw Hamburgers from Kerman, South-East of Iran. Journal of food quality and hazards control. 2017;4(4):109-12.
17. Komora N, Bruschi C, Magalhães R, Ferreira V, Teixeira P. Survival of Listeria monocytogenes with different antibiotic resistance patterns to food-associated stresses. International journal of food microbiology. 2017;245:79-87.
18. Shi W, Qingping W, Jumei Z, Moutong C, Zéan Y. Prevalence, antibiotic resistance and genetic diversity of Listeria monocytogenes isolated from retail ready-to-eat foods in China. Food Control. 2015;47:340-7.
19. Osman KM, Samir A, Abo-Shama UH, Mohamed EH, Orabi A, Zolnikov T. Determination of virulence and antibiotic resistance pattern of biofilm producing Listeria species isolated from retail raw milk. BMC microbiology. 2016;16(1):263.

20. Brown ED, Wright GD. Antibacterial drug discovery in the resistance era. Nature. 2016;529(7586):336.
21. Oelschlaeger TA. Mechanisms of probiotic actions–a review. International Journal of Medical Microbiology. 2010;300(1):57-62.
22. Deng Q, Shi H, Luo Y, Zhao H, Liu N. Effect of Dietary Lactobacilli Mixture on Listeria Monocytogenes Infection and Virulence Property in Broilers. Poultry Science. 2020.
23. Kunishige R, Kano F, Murata M. The cell resealing technique for manipulating, visualizing, and elucidating molecular functions in living cells. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects. 2020;1864(2):129329.
24. Dong Q, Zhang W, Guo L, Niu H, Liu Q, Wang X. Influence of Lactobacillus plantarum individually and in combination with low O2-MAP on the pathogenic potential of Listeria monocytogenes in cabbage. Food Control. 2020;107:106765.
25. Ehsani A, Rezaeiyan A, Hashemi M, Aminzare M, Jannat B, Afshari A. Antibacterial activity and sensory properties of Heracleum persicum essential oil, nisin, and Lactobacillus acidophilus against Listeria monocytogenes in cheese. Veterinary world. 2019;12(1):90.
26. Van Zyl W, Deane S, Dicks L. Bacteriocin production and adhesion properties as mechanisms for the anti-listerial activity of Lactobacillus plantarum 423 and Enterococcus mundtii ST4SA. Beneficial Microbes. 2019;10(3):329-49.
27. Ruiz A, Williams S, Djeri N, Hinton Jr A, Rodrick G. Nisin affects the growth of Listeria monocytogenes on ready-to-eat turkey ham stored at four degrees Celsius for sixty-three days. Poultry science. 2010;89(2):353-8.
28. Phelps CC, Vadia S, Arnett E, Tan Y, Zhang X, Pathak-Sharma S, et al. Relative roles of listeriolysin O, InlA, and InlB in Listeria monocytogenes uptake by host cells. Infection and immunity. 2018;86(10):e00555-18.
29. Temoin S, Roche S, Grépinet O, Fardini Y, Velge P. Multiple point mutations in virulence genes explain the low virulence of Listeria monocytogenes field strains. Microbiology. 2008;154(3):939-48.
30. Ribeiro SC, O'Connor PM, Ross RP, Stanton C, Silva CC. An anti-listerial Lactococcus lactis strain isolated from Azorean Pico cheese produces lacticin 481. International dairy journal. 2016;63:18-28.
31. Kumar S, Devi S, Sood SK, Kapila S, Narayan KS, Shandilya S. Antibiotic resistance and virulence genes in nisin-resistant Enterococcus faecalis isolated from raw buffalo milk modulate the innate functions of rat macrophages. Journal of applied microbiology. 2019;127(3):897-910.
32. Orihuel A, Terán L, Renaut J, Vignolo GM, De Almeida AM, Saavedra ML, et al. Differential proteomic analysis of lactic acid bacteria—Escherichia coli O157: H7 interaction and its contribution to bioprotection strategies in meat. Frontiers in microbiology. 2018;9:1083.
33. Jeon H-L, Lee N-K, Yang S-J, Kim W-S, Paik H-D. Probiotic characterization of Bacillus subtilis P223 isolated from kimchi. Food Science and Biotechnology. 2017;26(6):1641-8.

Original Article

Investigation the Effect of Spore-Forming Probiotics on the Expression of Virulence genes hly, plc, inlA of L. Monocytogenes

Rajabi S[1], Darban D[2], Rafie Tabatabaei R[1], Hosseini F[1*]

1. Department of Microbiology, Tehran North Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
2. Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Iran University of Medical Science, Tehran, Iran

Received: 21 Sep 2020 Accepted: 29 Dec 2020

Abstract

Background & Objective: *Listeria monocytogenes* is known as a foodborne pathogen that causes disease in humans. Also, due to the emergence of drug resistance and the formation of biofilms in the environment, there is a need to use new methods such as probiotics to combat this bacterium. This study aimed to investigate the effect of spore-forming probiotics on *hly*, *plc*, *inl*A virulence genes of *Listeria monocytogenes*.

Materials & Methods*:* In this study, *L. monocytogenes* serotype 4b strain isolated from human abortion was obtained from Microbial Bank of Iran University of Medical Sciences. *Bacillus laterosporus* (PTCC 1486) and *Bacillus megaterium* PTCC1656) were used as probiotic strains. Spore-forming probiotics were co-cultured with *L. monocytogenes* at different time points. The expression level of virulence genes of *L. monocytogenes* was assessed by real-time PCR.

Results: The greatest decrease in expression under the influence of *Bacillus latrosporus* was related to *plc*A gene after 24 hours of treatment with 6 folds. *Bacillus megatrium* had the greatest effect on *hly* gene, so that at 4, 8 and 24 hours after treatment, its expression decreased by 4, 7 and 5 fold, respectively.

Conclusion: The results of the present study showed that both probiotics had an inhibitory effect on the expression of *Listeria monocytogenes* virulence genes and the inhibitory and therapeutic properties of these probiotics should be considered.

Keywords: *Listeria monocytogenes,* Spore-forming probiotic, *hly ,plc,inlA* genes

***Corresponding Author: Hosseini Farzaneh,** Department of Microbiology, Tehran North Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
Email: Farzaneh953@yahoo.com
0000-0001-9344-1507 https://orcid.org/