Archive of SID

ISSN: 2538-5887; Pathobiology Research. 2020;23(3):137-142

Evaluation the Effect of Sea Cucumber (*Holothuria leucospilota*) on *invA* Gene Expression in *Salmonella infantis*

ARTICLE INFO

Article Type
Original Research

Authors
Ghasemi N.[1] *MSc,*
Falsafi S.*[1] *PhD,*
Amini K.[2] *PhD*

How to cite this article
Ghasemi N, Falsafi S, Amini K. Evaluation the Effect of Sea Cucumber (*Holothuria leucospilota*) on *invA Gene* Expression in *Salmonella infantis*. Pathobiology Research. 2020;23-(3):137-142.

[1]Department of Microbiology, Faculty of Advanced Science and Technology, Tehran Branch, Tehran Medical Science Islamic Azad University, Tehran, Iran
[2]Department of Microbiology, School of Basic Sciences, Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh, Iran

Correspondence
Address: Faculty of Advanced Science and Technology, Tehran Medical Science Islamic Azad University, Tehran, Iran. Postal Code: 1916893813
Phone: +98 (21) 22006660
Fax: +98 (21) 22006660
Sarvnaz_falsafi@yahoo.com

Article History
Received: April 20, 2020
Accepted: August 7, 2020
ePublished: September 20, 2020

ABSTRACT

Aims Salmonellosis is one of the common infectious diseases between humans and animals that is caused by the consumption of poultry meat and its products. The *invA* gene plays a critical role in the pathogenicity of *Salmonella infantis*. Marine organisms, including sea cucumbers due to their effective secondary metabolites, have been identified and studied with compounds with antioxidant, anti-cancer, antibacterial, and anti-inflammatory properties. The aim of the current study is to determine effect of sea cucumber extraction on S. *infantis invA* gene expression.

Materials & Methods Poultry meat was sampled and *S. infantis* strains containing *invA* gene were isolated. The Hexane extract was extracted from sea cucumber colon tissue and its effects on *S. infantis* and its effect on gene expression were investigated by MIC and Real-time PCR, respectively.

Findings From 450 samples, 12 *S. infantis* isolates were isolated. The PCR technique identified that all 12 isolates have *invA* virulence genes. MIC was determined 256µg/ml. The rate of change for the *invA* gene was estimated -1.21.

Conclusion Hexane extract extracted from the sea cucumber caused reduction of *invA* gene expression in *Salmonella infantis*. So, it can be used as a therapeutic supplement against *S. infantis*.

Keywords *Salmonella infantis*; Sea Cucumber; Antimicrobial Activity; Gene Expression

CITATION LINKS

[1] New bacterial species isolated from Malaysian sea cucumbers with optimized secreted ... [2] Sea cucumber, ocean bioactive ... [3] Antibacterial effect of natural extracts of Persian Gulf sea cucumber ... [4] Study of antibacterial effect of the extracts of the sea cucumber (Holothuria leucospilota) of Persian Gulf on the ... [5] Molecular characterization, spread and evolution of multidrug resistance in Salmonella enterica ... [6] Molecular basis of the interaction of Salmonella with the intestinal ... [7] Molecular detection of invA and spv virulence genes in Salmonella enteritidis ... [8] Multiplex PCR: Optimization and application in diagnostic ... [9] Deregulation of mexb gene in ciprofloxacin resistant isolates of ... [10] Variation between pathogenic serovars within Salmonella pathogenicity ... [11] Comparison of three diagnostic methods for Salmonella enterica serovars detection ... [12] Identification and assessment of Salmonella typhimurium, infantis and enteritidis ... [13] Identification of a unique Helicobacter Species by 16S rRNA gene analysis in an abdominal abscess from a patient with x-linked ... [14] Antioxidant activity of extracts of two species of sea cucumber Holothuria parva and Holothuria leucospilota from the Persian Gulf, ... [15] Investigation of antioxidant activity of nonpolar and semipolar natural compounds of the Persian Gulf Sea Cucumber (Holothuria sp.) by using Oil Stability Index (OSI) ... [16] Investigations of antibacterial activity of methanol and aqueous ex-tracts of the body wall of sea cucumber Holothuria leucospilota on some human pathogenic ... [17] Establishment of a real-time PCR-based approach for accurate quantification of ... [18] Salmonella infections in poultry flocks in the vicinity of ... [19] Characterization of genetic diversity among clinical strains of Salmonella enterica ... [20] Molecular clonality and antimicrobial resistance in Salmonella entericaserovars ... [21] Characterization of the Salmonella isolates from backyard chickens in north of Iran ... [22] Detection of Salmonella enterica serovar Infantis among serogroup C Salmonella ... [23] Identification and diagnosis of Salmonella in bovine feces using ... [24] Searching for Salmonella by InvA gene proliferation and bacterial ... [25] A comparative study in vitro of physiological activity of triterpene glycosides of marine ... [26] Antibacterial activity of Saponin extracted from the sea cucumber (Stichopus hermanni) ...

Copyright© 2020, TMU Press. This open-access article is published under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License which permits Share (copy and redistribute the material in any medium or format) and Adapt (remix, transform, and build upon the material) under the Attribution-NonCommercial terms.

www.SID.ir

Archive of SID

بررسی اثر عصاره خیار دریایی (*Holothuria leucospilota*) بر بیان ژن *invA* در *سالمونلا اینفنتیس*

ندا قاسمی Msc
گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین، واحد تهران، دانشگاه علوم پزشکی آزاد اسلامی، تهران، ایران
سروناز فلسفی* PhD
گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین، واحد تهران، دانشگاه علوم پزشکی آزاد اسلامی، تهران، ایران
کیومرث امینی PhD
گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی، ساوه، ایران

چکیده
اهداف: سالمونلوز یکی از بیماری‌های عفونی مشترک بین انسان و دام است که از مصرف گوشت طیور و فرآورده‌های آن ایجاد می‌شود. ژن *invA* نقش بسیار مهمی در بیماری‌زایی *سالمونلا اینفنتیس* دارد. موجودات دریایی از جمله خیار دریایی به‌دلیل داشتن متابولیت‌های ثانویه موثر دارای ترکیباتی با خواص آنتی‌اکسیدانی، ضدسرطانی، ضدباکتری و ضدالتهاب شناسایی و مطالعه شده‌اند. هدف مطالعه حاضر، بررسی اثر عصاره خیار دریایی بر باکتری *سالمونلا اینفنتیس* و بیان ژن حدت *invA* در این جدایه‌ها است.
مواد و روش‌ها: نمونه‌برداری از گوشت طیور انجام شد و سویه‌های *سالمونلا اینفنتیس* واجد ژن *invA* جداسازی شدند. عصاره هگزانی از بافت روده خیار دریایی استخراج و اثر آن بر *سالمونلا اینفنتیس* در چندین غلظت با روش MIC بررسی شد. سپس تغییرات بیان ژن *invA* در این سویه‌ها با تکنیک Real-time PCR مورد بررسی قرار گرفت.
یافته‌ها: از بین ۴۵۰ نمونه، ۱۲ ایزوله باکتری *سالمونلا اینفنتیس* جداسازی شد. با تکنیک PCR هر ۱۲ ایزوله مورد نظر واجد ژن حدت *invA* بودند. میزان MIC در این ایزوله‌ها ۲۵۶میکروگرم بر میلی‌لیتر به دست آمد. میزان تغییر بیان ژن *invA* ۱/۲۱- بود.
نتیجه‌گیری: عصاره هگزانی استخراج‌شده از روده خیار دریایی با کاهش بیان ژن حدت *invA*، خاصیت آنتی‌ویرولانسی بر روی باکتری *سالمونلا اینفنتیس* دارد و می‌تواند به‌عنوان مکمل درمانی علیه این باکتری مورد استفاده قرار گیرد.
کلیدواژه‌ها: *سالمونلا اینفنتیس*، خیار دریایی، فعالیت ضدباکتریایی، بیان ژن

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۲/۰۱
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۵/۱۷
*نویسنده مسئول: Sarvnaz_falsafi@yahoo.com

مقدمه

در دهه‌های اخیر، تولیدات طبیعی دریایی، دارای جذابیت جهانی برای توسعه محصولات دارویی مختلف در سراسر جهان شده‌اند. در خلال ۵ دهه گذشته بیش از ۱۰۰۰۰ متابولیت دریایی گزارش و سازمان‌دهی شده‌اند که ۱۸% این ترکیبات فعال زیستی از منابع باکتریایی به دست می‌آیند. امروزه یکی از اهداف اصلی بیوتکنولوژی دریایی یافتن مواد منشاگرفته از موجودات دریایی با کاربردهای دارویی مانند ضدسرطان، ضدعفونت و ضدالتهابی است. خلیج فارس بستر مناسبی برای زیست بسیاری از بی‌مهره‌گان مانند خیار دریایی است. خیارهای دریایی (*Holothuria leucospilota*) گروه بزرگی از آبزیان را تشکیل می‌دهند و از نظر رده‌بندی جزء راسته خارپوستان و رده خیاران دریایی محسوب می‌شوند. تاکنون فعالیت‌های بیولوژیک خیارهای دریایی شامل خاصیت ضدسرطانی، ضدویروس، ضدانعقاد، ضدفشار خون، ضدالتهاب، ضدمیکروبی، آنتی‌اکسیدانی، ضدتصلب شرائین، ضدتومور و تسریع در بهبود زخم مشخص شده‌اند[1-3]. این خواص به‌دلیل وجود یک‌سری ترکیبات زیست‌فعال در قسمت‌های مختلف بدن خیار دریایی است که از جمله این ترکیبات گلیکوزیدهای تری‌ترپنی مانند ساپونین‌ها هستند. ساپونین‌ها یکی از فراوان‌ترین متابولیت‌های خیار دریایی هستند که بسیاری از خواص دارویی این موجود به وجود این ترکیبات نسبت داده شده است[4].

بیماری‌های منتقله از طریق مواد غذایی یکی از مهم‌ترین مشکلات سلامت عمومی است که هر سال موجب ابتلا و مرگ و میر تعداد قابل توجهی از مردم می‌شود. گونه‌های سالمونلا از مهم‌ترین آلوده‌کننده‌های مواد غذایی و گاستروانتریت در انسان به شمار می‌آیند[5, 6]. ژن *invA* نقش بسیار مهمی در بیماری‌زایی سالمونلاها دارد. این ژن از ژن‌های حدت برای سالمونلا محسوب می‌شود. بنابراین بررسی ژن حدت *invA* در *سالمونلا اینفنتیس* می‌تواند شاخص مهمی در ویرولانس این باکتری باشد[7, 8]. این ژن که تقریباً در ۹۹% سروتیپ‌های سالمونلا حضور دارد، نه‌تنها برای سالمونلا اختصاصی است، بلکه در همه انواع بیماری‌زاهای این باکتری وجود دارد[9]. این ژن پروتئین‌های غشای داخلی باکتری سالمونلا را که برای تهاجم به سلول‌های اپی‌تلیال روده میزبان لازم است کد می‌کند و همچنین در جزایر بیماری‌زایی نوع اول (SPI-I) بر روی کروموزوم این باکتری قرار دارد. ژن *invA* حاوی توالی‌های منحصربه‌فردی برای جنس سالمونلا است و به‌عنوان یک استاندارد بین‌المللی برای تعیین جنس *سالمونلا اینفنتیس* شناسایی شده است[10].

هدف مطالعه حاضر، بررسی تاثیر عصاره خیار دریایی خلیج فارس بر بیان ژن *invA* در ایزوله‌های *سالمونلا اینفنتیس* جداشده از گوشت طیور به روش Real-time PCR است.

مواد و روش‌ها

این مطالعه توصیفی- مقطعی طی بازه زمانی ۶ماهه، بر روی ۴۵۰ نمونه از گوشت طیور تهیه‌شده از کشتارگاه‌های مناطق مختلف شهر کرمان، انجام شد. تمامی نمونه‌ها در شرایط استریل و با استفاده از محیط راپاپورت‌واسیلیادیس به آزمایشگاه میکروب‌شناسی منتقل شدند.

به‌منظور جداسازی عامل باکتری، پس از همگن‌کردن ۲۵گرم گوشت مرغ و انتقال به محیط تریپیک‌سوی‌براث حاوی ۶% عصاره مخمر (TSYEB) حجم محیط به ۲۲۵میلی‌لیتر رسانده و به مدت

www.SID.ir

Archive of SID

یک شبانه‌روز در دمای ۳۷°C گرمخانه‌گذاری شد. سپس یک‌میلی‌لیتر از محیط مذکور به ۱۰میلی‌لیتر تتراتیونات‌براث تلقیح و طبق شرایط بالا انکوبه شد. بدین منظور حدود ۱۰-۵میکرولیتر محیط تریپتیک‌سوی‌براث (TSB) حاوی عصاره مخمر و نمونه بر روی محیط XLD و کروم‌آگارسالمونلا کشت داده شد و کلنی‌های رشدیافته با استفاده از تست‌های روزمره و استاندارد بیوشیمیایی و میکروبیولوژی مانند TSI، اوره، سیمون‌سیترات و MR-VP تایید شدند[11]. عمل سروتایپینگ برای تایید آزمایشات بیوشیمیایی و تعیین گروه سرمی طبق دستورالعمل شرکت سازنده آنتی‌سرم (Difco؛ ایالات متحده) انجام شد.

DNA جدایه‌ها با استفاده از کیت استخراج (پیشگامان انتقال ژن؛ ایران) و طبق دستورالعمل این کیت استخراج شد. به‌منظور بررسی حضور و تکثیر قطعه ژن (*invA*) در *سالمونلا اینفنتیس* از جدایه‌های سالمونلا، آزمون PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ذکرشده در جدول ۱ انجام شد. واکنش PCR با برنامه حرارتی ۹۵°C به مدت ۳ دقیقه، ۳۵ سیکل تکراری ۹۵°C به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۶°C به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲°C یک دقیقه و در نهایت ۷۲°C به مدت ۵ دقیقه انجام شد. مشاهده باند ۲۸۵جفت بازی نشان‌دهنده مثبت‌بودن آزمون PCR است.

جدول ۱) ترادف نوکلئوتیدی پرایمرهای مورد استفاده برای شناسایی ژن‌های *invA* [12] و *16S rRNA* [13]

ژن هدف	طول قطعه (جفت باز)	توالی پرایمر
invA	۲۸۴	F: 5'-GTGAAATTATCGCCACGTTCGGGCAA-3' R: 5'-TCATCGCACCGTCAAAGGAACC-3'
16S rRNA	۱۵۳۴	F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' R: 5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3'

به‌منظور نمونه‌برداری خیار دریایی، برای اطمینان از صحت نوع گونه، از یک تکه از بافت روده نمونه‌ای به ضخامت یک‌میلی‌متر و مساحت یک‌سانتی‌متر به وسیله تیغ جراحی جدا و در یک لوله آزمایش حاوی ۳میلی‌لیتر مایع سفیدکننده قرار داده شد. پس از ۲۰ دقیقه رسوب سفیدرنگی در انتهای لوله جمع شد. پس از انتقال به آزمایشگاه به‌سرعت قسمت‌های مربوط به روده به قطعات کوچک ۲-۱سانتی‌متری برش زده و در فریزر ۲۰°C- نگهداری شدند[14].

خیار دریایی پس از خروج از فریزر و انجمادزدایی پاکسازی شد. به این ترتیب که از مخرج به سمت دهان برش داده شد و تخلیه حفره شکمی صورت گرفت. در نهایت روده به قطعات کوچک خرد شد[4].

به‌منظور تهیه عصاره هگزانی خیار دریایی، نمونه‌ها در حرارت ۴۵°C به مدت ۴۸ ساعت کاملاً خشک شدند. نمونه‌ها خرد، خشک و سپس به وسیله هاون به‌طور کامل پودر شدند. پودر آماده‌شده با حلال هگزان به مدت ۶ ساعت سوکسله شد. عصاره استخراج‌شده توسط دستگاه روتاری مدل R206D (هیدولف؛ آلمان) در دمای کمتر از ۴۰°C و در دور ۱۴۵ تغلیظ شد و تبخیر کامل حلال صورت گرفت. سپس عصاره حاصل از بخش روده خیار دریایی برای انجام تست ضدباکتری به آزمایشگاه میکروب‌شناسی منتقل شد[4, 14].

برای تعیین حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) از روش میکرودیلوشن استفاده شد. ۲۰۴۸میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصاره خیار دریایی در حلال دی‌متیل‌سولفوکسید (DMSO) به‌صورت سوسپانسیون در آورده و به‌عنوان غلظت اولیه به کار برده شد [4, 15]. سپس رقت‌سازی تا چاهک دهم انجام شد. در همه چاهک‌ها (به جز چاهک اول) ۵۰میکرولیتر محیط مولرهینتون‌براث ریخته شد. در چاهک اول ۱۰۰میکرولیتر عصاره با غلظت ۲۰۴۸میکروگرم بر میلی‌لیتر ریخته شد و ۵۰میکرولیتر از چاهک اول در چاهک بعدی ریخته و به همین ترتیب رقت‌سازی تا چاهک دهم انجام شد. در انتها ۵۰میکرولیتر سوسپانسیون باکتریایی (*invA* تاییدشده با روش PCR) با کدورت ۰/۵مک‌فارلند به چاهک‌ها اضافه شد. در نهایت میکروپلیت‌ها در انکوباتور با دمای ۳۷°C به مدت ۱۸ ساعت قرار داده شدند. کدورت چاهک‌ها در طول موج ۳۶۰نانومتر خوانده و آخرین غلظتی که رشدی در آن مشاهده نشد به‌عنوان MIC در نظر گرفته شد[4, 16].

در بررسی اثرات عصاره خیار دریایی در بیان ژن *invA*، نمونه‌های *سالمونلا اینفنتیس* با عصاره خیار دریایی تیمار شدند و برای استخراج RNA از چاهک Sub MIC استفاده شد. استخراج RNA از نمونه تیمار حاوی عصاره خیار دریایی، باکتری *سالمونلا اینفنتیس* واجد ژن *invA* و محیط کشت تریپتیک‌سوی‌براث و غیرتیمار حاوی باکتری *سالمونلا اینفنتیس* واجد ژن *invA* و محیط کشت TSB، با استفاده از کیت استخراج RNA (Bio Basic؛ ایالات متحده) طبق دستورالعمل انجام شد[16]. سنتز cDNA با استفاده از کیت ویوانتیس (Vivantis؛ مالزی) انجام شد. برای تکثیر ژن‌های *invA* و ژن خانگی *16S rRNA* (عنوان کنترل داخلی) از پرایمرهای ذکرشده در جدول ۲ استفاده شد. واکنش Real-time PCR با برنامه حرارتی ۹۵°C به مدت ۱۰ دقیقه، ۳۵ سیکل تکراری ۹۵°C به مدت ۱۵ ثانیه، ۵۵°C و زمان ۳۰ ثانیه و ۷۲°C به مدت ۳۰ ثانیه انجام شد.

به‌منظور مقایسه داده‌ها از آزمون آنالیز تی‌استیودنت استفاده شد و سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ (p<۰/۰۵) به‌عنوان اختلاف معنی‌دار از نظر آماری در نظر گرفته شد.

جدول ۲) ترادف نوکلئوتیدی پرایمرهای مورد استفاده برای شناسایی ژن‌های *invA* و *16S rRNA* در Real-Time PCR [17]

ژن هدف	طول قطعه (جفت باز)	توالی پرایمر
invA	۲۸۸	F: 5'-GATTCTGGTACTAATGGTGATGATC-3' R: 5'-GCCAGGCTATCGCCAATAAC-3'
16S rRNA	۱۷۸	F: 5'-CGGGGAGGAAGGTGTTGTG-3' R: 5'-GAGCCCGGGGATTTCACATC-3'

یافته‌ها

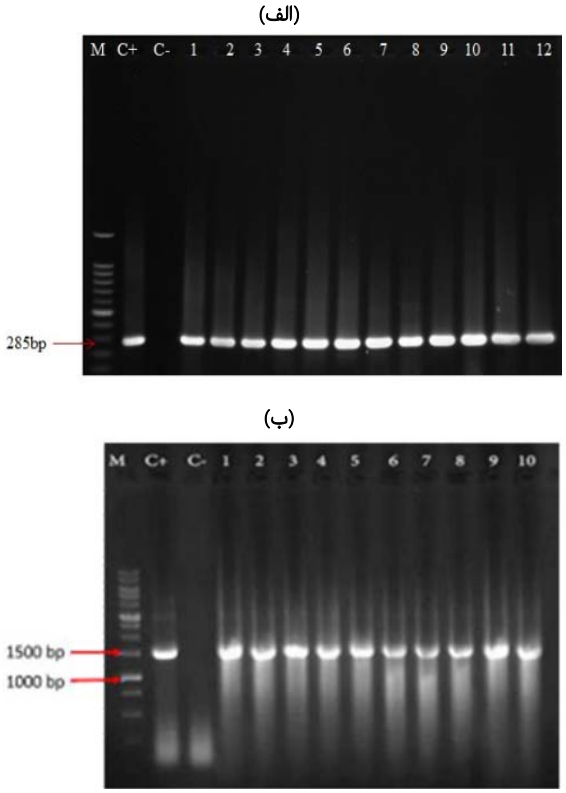
از بین ۴۵۰ نمونه، ۱۲ باکتری *سالمونلا اینفنتیس* به دست آمد. در بررسی انجام‌شده حاصل از سروتایپینگ، *سالمونلا اینفنتیس* در

www.SID.ir

Archive of SID

گروه سالمونلاهای گروه C قرار گرفت.

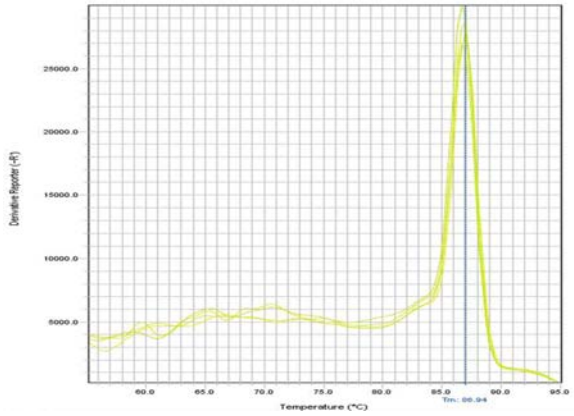
واکنش PCR بر روی ایزوله‌های *سالمونلا اینفنتیس* برای شناسایی ژن کدکننده ***invA***، با استفاده از پرایمرهای اختصاصی انجام شد. همچنین سویه *سالمونلا اینفنتیس* تولیدکننده ژن‌های مورد نظر به‌عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد. ایزوله‌های *سالمونلا اینفنتیس* به‌دست‌آمده همگی (۱۰۰%) واجد ژن ***invA*** بودند (شکل ۱).



شکل ۱) الف) نتیجه آزمایش PCR بر روی جدایه‌های ***invA*** مثبت از نمونه ۱ تا ۱۲، به ترتیب از چپ به راست M (Ladder): DNA، C+: کنترل مثبت، C-: کنترل منفی؛ ب) نتیجه آزمایش PCR بر روی جدایه‌های ***16S rRNA*** مثبت از نمونه ۱ تا ۱۰، به ترتیب از چپ به راست M (Ladder): DNA، C+: کنترل مثبت، C-: کنترل منفی

میزان غلظت MIC برای عصاره هگزانی، ۲۵۶میکروگرم بر میلی‌لیتر تعیین و باعث مهار رشد باکتری شد. از غلظت Sub MIC (۱۲۸میکروگرم بر میلی‌لیتر) نیز برای بررسی میزان بیان ژن ***invA*** استفاده شد.

میزان رونویسی mRNA ژن ***invA*** بعد از تیمار با عصاره خیار دریایی با استفاده از پرایمرهای ذکرشده در جدول ۲ سنجیده شد. نتایج مربوط به منحنی ذوب ژن ***invA*** در نمودار ۱ آورده شده است. میزان رونویسی ژن ***invA*** در باکتری تیمارشده در مقایسه با باکتری غیرتیمار کاهش معنی‌داری داشته است. میزان تغییر بیان برای ژن ***invA*** برابر ۱/۲۱- به دست آمد و بیانگر این است که این ژن در گروه تیمارشده نسبت به گروه غیرتیمارشده ۱/۲۱ برابر کاهش یافته است. می‌توان گفت عصاره خیار دریایی با تغییر بیان ژن مورد نظر می‌تواند اثرات آنتی‌ویرولانس داشته باشد و قدرت بیماری‌زایی باکتری را کاهش دهد.



نمودار ۱) منحنی ذوب ژن هدف ***invA*** در سویه *سالمونلا اینفنتیس* تیمارشده با عصاره هگزانی خیار دریایی

بحث و نتیجه‌گیری

باکتری سالمونلا یکی از شایع‌ترین باکتری‌های قابل انتقال از حیوانات به انسان است. عفونت سالمونلا در انسان به‌صورت گاستروانتریت، تب روده‌ای و سپتی‌سمی بروز می‌کند. اخیراً ظهور سویه‌های جدید واجد ژن‌های حدت و مقاومت چندگانه آنتی‌بیوتیکی سبب بروز مشکلاتی در درمان عفونت‌های حاصل از این باکتری‌ها شده است. با توجه به افزایش فراوانی سالمونلاهای گروه C در گله‌های طیور ایران و اهمیت عفونت این گروه به‌ویژه *سالمونلا اینفنتیس* در انسان، ارزیابی فراوانی این سروار و نیز الگوی مقاومت دارویی آن حایز اهمیت است[18].

در ایران شیوع این سروار در سال‌های اخیر در حال افزایش است. چنانچه در مطالعه *رنجبر* و همکاران روی سالمونلاهای گروه C جداشده از موارد انسانی مشخص شده است که از ۲۶ جدایه، ۱۹ جدایه (۷۳%) جزء سروار *سالمونلا اینفنتیس* بودند[19]. *رحمانی* و همکاران از سال ۲۰۰۷ تا سال ۲۰۱۱، ۳۶ نمونه سالمونلا از جوجه‌های گوشتی سه منطقه در شمال ایران جمع‌آوری کرد که ۷۵% جدایه‌ها *سالمونلا اینفنتیس* و ۲۵% *سالمونلا انتریتیدیس* بودند[20]. *عمادی* و همکاران در مطالعه‌ای در شمال ایران از ۱۱۲۵ نمونه جداشده سالمونلا از ماکیان بومی ۵۵/۵% *سالمونلا انتریتیدیس*، ۲۲/۲% *سالمونلا تیفی‌موریوم*، ۱۴/۸% *سالمونلا هادار* و ۷/۴% *سالمونلا اینفنتیس* جدا کردند[21]. در مطالعه *پیغمبری* و همکاران، ۷۹% سالمونلاهای گروه C جداشده از طیور گوشتی با روش مولکولی و به‌کارگیری پرایمر اختصاصی، به‌عنوان سروار *سالمونلا اینفنتیس* شناسایی شد. وقوع بالای *سالمونلا اینفنتیس* در طیور برخی مناطق را می‌توان به شرایط بومی منطقه مرتبط دانست و به‌ویژه اینکه احتمالاً این سروار سالمونلا به‌خوبی با شرایط فیزیولوژیک به‌خصوص دمای بالای بدن طیور تطابق یافته است[22].

www.SID.ir

Archive of SID

در این مطالعه نمونه‌برداری از کشتارگاه‌های مناطق مختلف شهر کرمان انجام و بر روی ۴۵۰ نمونه از گوشت طیور کار شد. بعد از جداسازی سویه‌های *سالمونلا اینفنتیس* مشخص شد که از بین ۴۵۰ نمونه، ۱۲ مورد *سالمونلا اینفنتیس* بودند.

ژن حدت ***invA***، پروتئین‌های غشای داخلی باکتری سالمونلا را که برای تهاجم به سلول‌های اپی‌تلیال روده میزبان لازم هستند، کد می‌کند[23]. این ژن که تقریباً در ۹۹% سروتیپ‌های سالمونلا حضور دارد، نه‌تنها برای سالمونلاها اختصاصی است بلکه در تمام سالمونلاهای بیماری‌زا وجود دارد[24]. این ژن به‌عنوان یک استاندارد بین‌المللی در تشخیص جنس سالمونلا شناسایی شده است[7]. اخیراً ظهور سویه‌های واجد ژن حدت موجب ظهور و بروز مقاومت آنتی‌بیوتیکی و سبب بروز مشکلاتی در درمان عفونت حاصل از این باکتری در انسان‌ها و حیوانات شده است[23]. در مطالعه حاضر، هر ۱۲ سویه (۱۰۰%) واجد ژن حدت ***invA*** هستند.

در مطالعه‌ای دیگر، اثر عصاره‌های مختلف خیار دریایی آرتا و اسکابرا، در برابر ۷ گونه باکتری مورد بررسی قرار داده شد. نتایج این بررسی مشخص کرد که عصاره متانولی و چربی هیچ اثر بازدارنگی نداشتند ولی عصاره یک بافر نمکی فسفات، بر رشد باکتری‌ها اثر ضدباکتری را نشان داد[25]. در پژوهش دیگری با بررسی اثر عصاره متانولی- استونی استخراج‌شده از دیواره بدن خیار دریایی گونه *پاروی منسیس* از جزیره سانتا کاتالینای کالیفرنیا روی باکتری‌های *اشریشیا کلی* و *باسیلوس سابتیلیس* به روش انتشار دیسک، مشخص شد که این عصاره دارای اثر ضدباکتری است[16].

در مطالعه *فرجامی* و همکاران مشخص شد که عصاره هگزانی روده در غلظت‌های ۲/۵، ۵ و ۱۰میلی‌گرم در میلی‌لیتر از رشد باکتری جلوگیری کرد[4].

در مطالعه‌ای که توسط *جمالی* و همکاران روی عصاره‌های استخراج‌شده از خیار دریایی گونه *لوکواسپیلوتا* نسبت به باکتری *اشریشیا کلی* انجام شد، نتایج به‌دست‌آمده نشان داد که عصاره‌های متانولی، هگزانی و کلروفرمی در غلظت‌های ۰/۷۸ تا ۱۰۰میلی‌گرم در میلی‌لیتر، اثر باکتریواستاتیک نسبت به این باکتری دارند. در پژوهش دیگری که روی عصاره‌های خیار دریایی گونه *لوکواسپیلوتا*، از جزیره لارک انجام شد عصاره‌های کلروفرمی در غلظت‌های ۵ و ۱۰میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اثر ضدباکتری روی باکتری *اشریشیا کلی* نشان دادند و عصاره هگزانی استخراج‌شده در غلظت ۱۰میلی‌گرم بر میلی‌لیتر منجر به مرگ باکتری شد. عامل تفاوت نتایج محققین در بررسی خواص بیولوژیک مانند اثرات ضدباکتری مورد آزمایش در این پژوهش علمی، به‌علت وجود متابولیت‌های ثانویه‌ای است که در شرایط مختلف اکولوژی سنتز می‌شوند. درواقع متابولیت‌های ثانویه سلاح‌های شیمیایی هستند که آبزیان مانند خیارهای دریایی برای ادامه حیات از آنها استفاده می‌کنند[3].

در پژوهشی، *سالاری* و همکاران به بررسی فعالیت ضدباکتریایی ساپونین استخراج‌شده از خیار دریایی گونه *استیکوپوس هرمانی* جمع‌آوری‌شده از خلیج فارس، در برابر برخی باکتری‌های گرم مثبت و منفی پرداختند. از نظر میزان MIC، باکتری گرم منفی *سودوموناس آئروژینوزا* دارای بیشترین مقاومت نسبت به ساپونین استروئیدی و ساپونین گلیکوزیدی- استروئیدی به ترتیب با MIC برابر با ۵۰۰ و ۴۰۰میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. ساپونین‌های استروئیدی و گلیکوزیدی- استروئیدی بر باکتری گرم منفی *سودوموناس آئروژینوزا* هیچ فعالیت باکتریوسیدی نشان ندادند و در بین باکتری‌های گرم مثبت نیز بیشترین اثر کشندگی مربوط به ساپونین گلیکوزیدی- استروئیدی در *استافیلوکوکوس آئروس* با MBC برابر با ۵۰۰میکروگرم بر میلی‌لیتر بود[26].

در مطالعه حاضر، تاثیر تیمار عصاره هگزانی، خیار دریایی بندر لنگه خلیج فارس، بر روی باکتری *سالمونلا اینفنتیس* واجد ژن ***invA*** مورد بررسی قرار گرفت. ابتدا میزان MIC عصاره خیار دریایی به روش میکرودیلوشن علیه سویه‌های *سالمونلا اینفنتیس* که واجد ژن ***invA*** هستند، ۲۵۶میکروگرم بر میلی‌لیتر به دست آمد. سپس در غلظت Sub MIC عصاره خیار دریایی، تغییرات بیان ژن ***invA*** به روش Real-time PCR، ۱/۲۱- به دست آمد که بیانگر این است که این ژن در گروه تیمارشده نسبت به گروه غیرتیمار ۱/۲۱ برابر کاهش یافته است. این در حالی است که تاثیری بر بیان ژن خانگی ***16S rRNA*** مشاهده نشد.

تاکنون مطالعه‌ای که اثر عصاره خیار دریایی بر بیان ژن ***invA*** را در *سالمونلا اینفنتیس* مورد بررسی قرار بدهد، گزارش نشده است.

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که عصاره هگزانی استخراج‌شده از خیار دریایی در بندر لنگه، دارای اثرات آنتی‌ویرولانسی معنی‌داری بر روی ژن ***invA*** مربوط به باکتری *سالمونلا اینفنتیس* جداشده از گوشت طیور دارد و مکانیزم اثر آن به احتمال فراوان براساس تاثیر بر روی پروموتر ژن ***invA*** این باکتری است. با توجه به تاثیر مهاری عصاره خیار دریایی علیه ژن حدت در *سالمونلا اینفنتیس* احتمالاً بتوان از این عصاره به‌عنوان مکمل درمانی علیه این باکتری استفاده کرد و این نظریه نیاز به بررسی بیشتری دارد. از سوی دیگر با MIC برابر ۲۵۶میکروگرم بر میلی‌لیتر می‌توان گفت که این عصاره استخراج‌شده می‌تواند علیه باکتری *سالمونلا اینفنتیس* اثر ضدباکتریایی داشته باشد. کاربرد بالینی آن، مستلزم مطالعات و تحقیقات بیشتری در زمینه مکانیزم عمل این عصاره‌ها به‌ویژه در زمینه بازدارندگی عوامل میکروبی و بروز اشکال مقاوم باکتریایی است.

تشکر و قدردانی: بدین وسیله از تمامی افرادی که در انجام این مطالعه همکاری داشته‌اند سپاسگزاری می‌شود.

تاییدیه اخلاقی: موردی توسط نویسندگان ذکر نشده است.

تعارض منافع: هیچ‌گونه تعارض منافعی وجود ندارد.

www.SID.ir

Archive of SID

سهم نویسندگان: ندا قاسمی (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر اصلی/نگارنده بحث (۴۰%)؛ سروناز فلسفی (نویسنده دوم)، روش‌شناس/تحلیلگر آماری (۳۵%)؛ کیومرث امینی (نویسنده سوم)، تحلیلگر آماری/نگارنده بحث (۲۵%)

منابع مالی: موردی توسط نویسندگان ذکر نشده است.

منابع

1- Farouk AE, Ghouse FA, Ridzwan BH. New bacterial species isolated from Malaysian sea cucumbers with optimized secreted antibacterial activity. Am J Biochem Biotechnol. 2007;3(2):60-5.
2- Ebrahimi H, Mohebi G, Vaziri Zadeh A, Nabipour I, Nafisi Bahabadi M. Sea cucumber, ocean bioactive compounds. South Med. 2015;18(3):664-79. [Persian]
3- Jamali S, Emtiazjoo M, Timori Toolabi L, Zeinali S, Kipour S, Sardari S, et al. Antibacterial effect of natural extracts of Persian Gulf sea cucumber Holoturia. SP on three strains of Escherichia coli. Pathobiol Res. 2009;12(2):37-49. [Persian]
4- Farjami B, Nematollahi MA, Noradi Y, Irajian G, Nazemi M. Study of antibacterial effect of the extracts of the sea cucumber (Holothuria leucospilota) of Persian Gulf on the Escherichia coli. Iran J Med Microbiol. 2014;8(1):27-33. [Persian]
5- Cloeckaert A, Schwarz S. Molecular characterization, spread and evolution of multidrug resistance in Salmonella enterica Typhimurium DT104. Vet Res. 2001;32(3-4):301-10.
6- Darwin KH, Miller VL. Molecular basis of the interaction of Salmonella with the intestinal mucosa. Clin Microbiol Rev. 1999;12(3):405-28.
7- Amini K, Zahraei Salehi T, Nikbakht G, Ranjbar R, Amini J, Ashrafganjooei SB. Molecular detection of invA and spv virulence genes in Salmonella enteritidis isolated from human and animals in Iran. Afr J Microbiol Res. 2010;4(21):2202-10.
8- Elnifro EM, Ashshi AM, Cooper RJ, Klapper PE. Multiplex PCR: Optimization and application in diagnostic virology. Clin Microbiol Rev. 2000;13(4):559-70.
9- Ahmadi Roudbaraki Z, Ranji N, Soltani Tehrani B. Deregulation of mexb gene in ciprofloxacin resistant isolates of pseudomonas aeruginosa treated with silibinin-encapsulated in nanoparticles. J Babol Univ Med Sci. 2017;19(11):42-9. [Persian]
10- Amavisit P, Lightfoot D, Browning GF, Markham PF. Variation between pathogenic serovars within Salmonella pathogenicity islands. J Bacteriol. 2003;185(12):3624-35.
11- Corrêa IM, Pereira LQ, Silva IG, Altarugio R, Smaniotto BD, Silva TM, et al. Comparison of three diagnostic methods for Salmonella enterica serovars detection in chicken rinse. Pesquisa Veterinária Brasileira. 2018;38(7):1300-6.
12- Moghadam A, Nazarian Sh, Amani J. Identification and assessment of Salmonella typhimurium, infantis and enteritidis serotypes in clinical samples from medical centers of Kerman province. Iran J Med Microbiol. 2017;11(2):1-8. [Persian]
13- Han SR, Schindel C, Genitsariotis R, Märker-Hermann E, Bhakdi S, Maeurer MJ. Identification of a unique Helicobacter Species by 16S rRNA gene analysis in an abdominal abscess from a patient with x-linked hypogammaglobulinemia. J Clin Microbiol. 2000;38(7):2740-2.
14- Pishehvarzad F, Yousefzadi M, Kamrani E, Moini Zanjani T, Ali Ahmadi A. Antioxidant activity of extracts of two species of sea cucumber Holothuria parva and Holothuria leucospilota from the Persian Gulf, Iran. J Aquat Ecol. 2014;4(1):34-29. [Persian]
15- Esmaeili A, Shahnaghi N, Roustaeian A, Ashja Ardalan A, Bahmaei M. Investigation of antioxidant activity of nonpolar and semipolar natural compounds of the Persian Gulf Sea Cucumber (Holothuria sp.) by using Oil Stability Index (OSI) method. Iran Sci Fish J. 2009;18(1):13-20. [Persian]
16- Nazemi M, Moradi Y, Gozari M, Legzaee F, Karimpour M. Investigations of antibacterial activity of methanol and aqueous ex-tracts of the body wall of sea cucumber Holothuria leucospilota on some human pathogenic bacteria. Avicenna J Clin Med. 2016;23(1):75-82. [Persian]
17- Fey A, Eichler S, Flavier S, Christen R, Höfle MG, Guzmán CA. Establishment of a real-time PCR-based approach for accurate quantification of bacterial RNA targets in water, using Salmonella as a model organism. Appl Environ Microbiol. 2004;70(6):3618-23.
18- Morshed R, Peighambari SM. Salmonella infections in poultry flocks in the vicinity of Tehran. Int J Vet Res. 2010;4(4):273-6.
19- Ranjbar R, Sarshar M, Sadeghifard N. Characterization of genetic diversity among clinical strains of Salmonella enterica serovar infantis by ribotyping method. J Adv Med Biomed Res. 2012;20(81):75-84. [Persian]
20- Rahmani M, Peighambari SM, Svendsen CA, Cavaco LM, Agersø Y, Hendriksen RS. Molecular clonality and antimicrobial resistance in Salmonella entericaserovars Enteritidis and Infantis from broilers in three Northern regions of Iran. BMC Vet Res. 2013;9(1):66.
21- Emadi Chashni SH, Hasanzadeh M, Bozorg Mehrifard MH, Mirzaei S. Characterization of the Salmonella isolates from backyard chickens in north of Iran, by serotyping, multiplex PCR and antibiotic resistance analysis. Arch Razi Inst. 2009;64(2):77-83. [Persian]
22- Peighambari SM, Sorahi Nobar M, Morshed R. Detection of Salmonella enterica serovar Infantis among serogroup C Salmonella isolates from poultry using PCR and determination of drug resistance patterns. Sci Res Iran Vet J. 2015;11(2):53-60. [Persian]
23- Zahraie Salehi MT, Mahzoonieh MR, Vatankhah J. Identification and diagnosis of Salmonella in bovine feces using polymerase chain reaction (PCR). J Vet Res Univ Tehran. 2006;61(3):243-7. [Persian]
24- Ali Gholi R, Ahmadi M, Alizadeh F, Sina R. Searching for Salmonella by InvA gene proliferation and bacterial culture in uromiexic fecal stools. Iran J Vet Med Shahid Chamran Univ Ahvaz. 2011;7(3):50-6. [Persian]
25- Kuznetsova TA, Anisimov MM, Popov AM, Baranova SI, Afiyatullov S, Kapustina II, et al. A comparative study in vitro of physiological activity of triterpene glycosides of marine invertebrates of echinoderm type. Comp Biochem Physiol C Comp pharmacol. 1982;73(1):41-3.
26- Salari Z, Souinezad I, Nazemi M, Yousefzadi M. Antibacterial activity of Saponin extracted from the sea cucumber (Stichopus hermanni) collected from the Persian Gulf. Iran Fish Sci Res Inst. 2018;27(1):59-69. [Persian]

www.SID.ir