"مقاله پژوهشی"

جداسازی و شناسایی *ویبریو پاراهمولیتیکوس* بیماری‌زا از آب‌ها و رسوبات ساحلی دریای خزر (استان گیلان، ایران) و بررسی ژن‌های ویرولانس آن

خسرو عیسی زاده[1]*

۱-گروه میکروبیولوژی، دانشکدهٔ علوم پایه، واحد لاهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی، لاهیجان، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۲/۲۱ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۳/۱۸

چکیده

هدف از این مطالعه تعیین فراوانی *ویبریو پاراهمولیتیکوس* و تشخیص سویه های بیماری‌زا و غیر بیماری‌زای این باکتری با استفاده از یک سری تست‌های بیوشیمیایی و واکنش‌های زنجیره ای پلیمراز از سواحل دریای خزر (استان گیلان) بود. نمونه های آب و رسوبات دریای خزر به ترتیب ازعمق ۵۰-۳۰ و ۲۰-۱۰ سانتی‌متری به روش استریل جمع‌آوری شدند. تاریخ نمونه برداری، محل نمونه برداری، دما، pH و میزان شوری آنها اندازه‌گیری شدند. جداسازی و شناسایی ایزوله‌های محیطی با استفاده از روش‌های استاندارد به منظور تعیین جنس و گونه با استفاده از محیط‌های اختصاصی از جمله تیوسولفات سیترات بایل سوکروز وکروم آگار ویبریو صورت‌گرفت. درمجموع ۵۵ ایزوله با انجام تست‌های بیوشیمی، فنوتیپی و واکنش‌های زنجیره ای پلیمراز شناسایی شدند. از مجموع ۵۵ مورد *ویبریو پاراهمولیتیکوس* جدا شده، فراوانی ژن های *tdh* و *trh* به ترتیب ۱مورد (۱/۸٪) و ۳ مورد (۴ / ۵ ٪) بود. این مطالعه نشان داد که *ویبریو پاراهمولیتیکوس* هایی که پتانسیل بیماری‌زایی دارند باید به طورمداوم به عنوان عوامل آلوده‌کننده آب‌های ساحلی کنترل شوند. جداسازی این گونه ها نشان دهنده هشدار بهداشتی برای افرادی است که از غذاهای دریایی خام استفاده می‌کنند یا در تماس مستقیم با آب دریای خزر در این منطقه هستند.

کلمات کلیدی: *ویبریو پاراهمولیتیکوس*، *tdh*، *trh*،آب‌های سا حلی، رسوبات

* عهده‌دار مکاتبات: Issa_kaam@yahoo.com

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2024-07-27]

مقدمه

ویبریو پاراهمولیتیکوس یک پاتوژن عامل گاستروانتریت است که از طریق مواد غذایی منتقل می‌شود و به خوبی مشخص شده که یک باکتری گرم منفی رایج در غذا، محصولات غذایی و محیط های آبی می باشد. همچنین سمومی را در بیماری‌های اسهالی ترشح می‌کند. این پاتوژن از غذاهای دریایی فرآوری شده بازیابی شده‌است (Beshiru *et al.*, 2020). ظهور باکتری‌های مقاوم به عوامل ضد میکروبی و مقاوم چند دارویی یکی دیگر از تهدیدات جدی سلامت عمومی در سراسر جهان است (Tan *et al.*, 2020). *ویبریو پاراهمولیتیکوس* می‌تواند آزادانه به صورت باکتریوپلانکتون، مرتبط با سطح غذاهای دریایی و یا به عنوان یک انگل در دستگاه گوارش ماهی زندگی کند. ارگانیسم‌های با رده‌های بالاتر مانند سخت پوستان و صدف‌های نرم‌تنان اغلب با این باکتری مرتبط هستند (Mala *et al.*, 2016; Yu *et al.*, 2016). این باکتری‌ها در آب‌های شور و شیرین، مدفوع انسان و حیوانات یافت می‌شوند. اکثر آنها ساپروفیت می‌باشند. گروهی از این ارگانیسم‌ها باعث اسهال خفیف و گروهی نیز باعث اسهال و استفراغ خیلی شدید می‌شوند. عفونت انسان به دنبال تماس مستقیم با جانوران و یا آب آلوده و یا به طور غیر مستقیم از طریق مصرف آب یا غذای آلوده شده منتقل می‌شود (هلاکو و همکاران ۱۳۸۴). این باکتری می تواند میزبان را از راه‌های مختلف آلوده‌کند. غذاهای دریایی آلوده مصرف شده باعث تماس مستقیم با دستگاه گوارش می‌شود. این باکتری همچنین می‌تواند در طول قرارگرفتن در معرض آب شور، راه خود را به یک زخم باز کند. در موارد شدید و مبتلایان به بیماری‌های همراه، باکتری به محض ورود به میزبان می‌تواند بیشتر در خون پخش شود. دارای چندین فاکتور حدت مشترک با سایر باکتری ها است. با این حال، فاکتور اصلی حدت، همولیزین مستقیم پایدار در برابر حرارت (TDH) است. TDHدر اکثر نمونه های بالینی (۸۸٪ تا ۹۶٪) وجود دارد، اما فقط در حدود ۱٪ از جمعیت‌های طبیعی ویبریو *پاراهمولیتیکوس* وجود دارد. علی‌رغم این واقعیت، TDH به عنوان یک عامل بیماری‌زای اصلی شناخته شده است. مکانیسم خاصی که توسط آن TDH باعث گاستروانتریت می‌شود، کاملاً شناخته نشده است. TDH یک سم منافذ تشکیل دهنده است و محققان فرض می‌کنند که این می‌تواند با توانایی آن در ایجاد علائم گوارشی مرتبط باشد. علاوه بر فاکتور حدت TDH از سیستم ترشحی نوع ۳ نیز مشابه سایر باکتری‌های گرم منفی استفاده می‌کند. با وجود فاکتورهای حدت آن، اکثر عفونت‌های ناشی از این باکتری فقط منجر به آنتریت خود محدود شونده می‌شود (Rezny *et al.*, 2023).

اگرچه مکانیسمی که *ویبریو پاراهمولیتیکوس* باعث بیماری روده می‌شود به طور کامل شناخته نشده است، دو عامل حدت معمولاً با ایزوله‌های بالینی مرتبط هستند: ژن‌های کد کننده همولیزین مستقیم حرارتی (TDH، *tdh*) و همولیزین مربوط به *trh*. از بین این دو، *trh* کمتر از *tdh* مشاهده می‌شود. چندین گونه از *tdh* شناسایی شده‌است که همه آنها حدود ۹۸٪ یکسان هستند. در مورد *trh*، تنها دو نوع ژن توصیف شده است که به صورت *trh1* و *trh2* نشان داده می‌شوند. اینها تقریباً ۸۴٪ در توالی یکسان هستند. تفاوت بین *trh* و *tdh* بیشتر است و تنها حدود ۶۸٪ شباهت را نشان می‌دهد. در حالی که

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2024-07-27]

ویبریو پاراهمولیتیکوس می‌تواند هر دو ژن را حمل کرده و به طور هم‌زمان آنها را بیان کند. به نظر می رسد که این ایزوله ها TDH کمتری نسبت به ایزوله های *trh* منفی تولید می‌کنند (Ellingsen *et al*., 2013). مطالعات انجام گرفته توسط Nishibuchi و Kaper نشان داد که همه سویه های KP-positive در حقیقت دارای دو ژن *tdh* هستند. در حالی که سویه‌های *ویبریو پاراهمولیتیکوس* که همولیز ضعیفی روی واگاستوما بلاد آگار نشان می‌دهند و KP-Intermediate محسوب می شوند تنها فقط یک ژن *tdh* دارند. وقتی که سویه‌های KP-negative را بررسی می‌کنیم اغلب آنها منشأ محیطی دارند. ۱۶ درصد از این سویه‌ها دارای یک کپی از ژن *tdh* هستند، در حالی که بقیه سویه‌های KP-negative ژن *tdh* را نداشتند. اکثر این سویه های KP-negative نمی‌توانند پروتئین TDH را تولید کنند. بعضی از نمونه های بالینی دارای هر دو ژن *tdh* و*trh* هستند در حالیکه بیشتر نمونه های محیطی فاقد ژن های *tdh* یا *trh* به طور همزمان هستند (Cook *et al*., 2002). با توجه به کمبود اطلاعات در رابطه با فراوانی گونه‌های جنس *ویبریو* مخصوصا *ویبریو پاراهمولیتیکوس* و بیماری‌زایی آنها درسواحل دریای خزر در استان گیلان هدف از این مطالعه جداسازی و شناسایی *ویبریو پاراهمولیتیکوس* از آبهای ساحلی دریای خزر در استان گیلان با استفاده از تست های بیوشیمیایی و بررسی حضور ژن های *tdh* و *trh* در سویه‌ها بود. امروزه نقش بیماری‌های عفونی به ویژه بیماری‌های اگروتیک درحفظ و بقای سرمایه‌های کشورها غیرقابل انکار است. در این میان ایجاد مراکز SPF و عاری بودن ماهیان پرورشی از بیماری‌های اخطار کردنی امری ضروری در جهت حفظ افزایش تولید و نیز عدم گسترش این بیماری‌ها به مناطق عاری از آنها و نیز محیط‌های دریایی همچون سیستم‌های پرورش در قفس و محیط‌های دریایی است (موسوی و همکاران، ۱۴۰۳).

مواد و روش‌ها

منطقه مورد مطالعه و جمع‌آوری نمونه‌ها

جهت انجام این پژوهش تعداد ۳۰۰ نمونه (۱۵۰ نمونه آب و ۱۵۰ نمونه از رسوبات دریا) در مناطق چابکسر، رودسر، چمخاله، کیاشهر، بندر انزلی، هشتپر و آستارا در طی مدت ۶ ماه (فروردین تا شهریور ۱۴۰۰) جمع آوری شدند. نمونه‌برداری از آب دریا حدود ۳-۲ متر داخل آب دریا (طولی) و از عمق ۵۰-۳۰ سانتی‌متری بوسیله شیشه‌های استریل دهان گشاد و از رسوبات به عمق ۲۰-۱۰ سانتی متری ازهفت ایستگاه با تکنیک‌های استریل برداشته شد (شکل ۱). نمونه‌ها در ظروف در بسته و داخل یخ خشک قرار داده شده و برای تجزیه و تحلیل در کوتاه‌ترین زمان به آزمایشگاه منتقل شدند.

مشخصات نمونه های جمع آوری شده در محل شامل تاریخ و محل نمونه برداری، دما، pH و میزان شوری ثبت گردیدند. برای اندازه‌گیری دمای آب، pH، میزان شوری به ترتیب از ترمومتر جیوه‌ای ، دستگاه pH متر دیجیتال و دستگاه شوری سنج استفاده‌گردید.

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2024-07-27]

شکل ۱: ایستگاه های نمونه برداری در سواحل دریای خزر در استان گیلان

جداسازی و شناسایی *ویبریو پاراهمولیتیکوس* از نمونه های آب

در مورد نمونه‌های آب‌های ساحلی، در شرایط استریل ۱۰ میلی‌لیتر از نمونه با پیپت پاستور به لوله آزمایش منتقل شد و به مدت ۱۰ دقیقه با 3500 rpm سانتریفیوژ شدند. سپس محلول رویی دور ریخته شد و یک میلی لیتر از قسمت باقی مانده به ۹ میلی لیتر محیط آب پپتون قلیائی (APW) حاوی ۳٪ کلرید سدیم که pH آن را به ۸/۶ رسانده شده بود، اضافه شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از محیط APW که بعد از این مدت کدر شده و باکتری‌ها در آنها رشد کرده بود، بر روی محیط کشت تیوسولفات سیترات بایل اسکولین آگار TCBS کشت داده شدند و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ انکوبه گردیدند (Veettil *et al*., 2014).

جداسازی و شناسایی *ویبریو پاراهمولیتیکوس* از نمونه های رسوبات

۱ گرم از رسوب را وزن کرده و به ml ۹ آب پپتون قلیایی حاوی NaCl 3% و pH: ۸/۶ اضافه شد و تا رقت ۳-۱۰ از آن رسوب تهیه شد. این محیط به مدت ۲۴ـ۱۶ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. در مرحله بعد مقداری از محتویات محیط APW را برروی محیط TCBS کشت خطی داده و به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. سپس محیط TCBS از نظر وجود کلنی‌های سبز (سوکروز منفی) و کوچک و سبزآبی در آزمایشگاه مورد بررسی قرارگرفت. کلنی‌های سبز مذکور به صورت خالص بر روی محیط TCBS آگار دیگر کشت داده می شد.کلنی با مشخصات بالا به محیط Chrom Agar برده شدند و بعد از مدت ۲۴ ساعت انکوباسیون این محیط از نظر وجود کلنی های بنفش مورد بررسی قرارگرفت (Veettil *et al*., 2014).

مشاهده میکروسکوپی و تست‌های بیوشیمیایی استاندارد

بعد از مشاهده میکروسکوپی و تأیید با سیل‌های گرم منفی خمیده در کشت‌های اولیه و باسیل راست در کشت‌های مکرر به دلیل پلی‌مورفیسم ویبریوها، مخصوصاً

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2024-07-27]

در نمونه‌های محیطی با استفاده از یکسری از تست‌های بیوشیمیایی به تشخیص آنها پرداخته شد. تست‌های بیوشیمیایی و تأییدی استاندارد از قبیل تست اکسیداز، LDC، ODC و ADH، بعنوان تست‌های اصلی برای تشخیص گونه *ویبریو* انجام‌گرفت. تست‌های دیگر شامل تست مقاومت به کلرید سدیم، برای انجام این تست از محیط NB حاوی ۰٪ ، ۳٪ ، ۶٪ ، ۸٪ و ۱۰٪ کلرید سدیم استفاده شد. بعد از تلقیح کلنی‌های مشکوک به *ویبریو پاراهمولیتیکوس* و بعد از انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت این محیط ها از نظر رشد باکتری (ایجاد کدورت) مورد بررسی‌قرارگرفتند (Veettil *et al*., 2014).

تشخیص همولیزین ها TDH و TRH با استفاده از تست های فنوتیپی

این یک روش فنوتیپی برای بررسی حضور همولیزین ها می‌باشد. این تست ها شامل تولید اوره آز و ایجاد بتا همولیز دربلاد آگار واگاتسوما بودند که به عنوان یک مارکرفنوتیپی برای شناسایی سویه‌های بیماری‌زا به کار رفتند.

بررسی حضور ژنهای همولیزین ها با استفاده از واکنشهای زنجیره ای پلیمراز(PCR)

برای آماده سازی DNA مورد نیاز جهت انجام PCR از روش جوشاندن استفاده‌شد. در این روش یک لوپ کامل از کلنی‌های کشت شبانه در محیط کشت تریپتیکاز سوی براث (NaCl 3%) به۳۰۰ µl آب دو بار تقطیر شده تلقیح شد و به مدت ۱۵ دقیقه برای لیزسلولی جوشانده شدند و در دور ۸۰۰۰ rpm به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ گردید. لایه رویی بعنوان DNA الگو مورد استفاده قرارگرفت. بررسی حضور ژن‌های همولیزین‌ها و تعیین نوع آن با استفاده از پرایمرهای اختصاصی(جدول ۱) برای هر یک از ژنهای *tdh* و *trh* و به کار گیری آنزیم Taq polymerase در حجم نهایی ۲۵ ماکرولیتر صورت‌گرفت. افزودن آنزیم Taq DNA Polymerase در آخرین مرحله انجام گرفت. بلافاصله پس از اضافه کردن آن به مخلوط واکنش، به دلیل حساسیت آن نسبت به دما ویال حاوی آن به فریزر منتقل می‌شد. پس از آماده شدن مخلوط واکنش PCR، ویال حاوی آن به دستگاه Thermocycler با برنامه ذکر شده در جدول زیر منتقل شد. پس از انجام PCR، برای ردیابی DNA تکثیر شده و جهت جداسازی قطعات DNA الکتروفورز ژل آگارز ۲٪ انجام شد. مشاهده باندهای DNA بوسیله دستگاه ژل داک (UV-tec) و در طول موج ۲۶۰nm انجام می‌شد. با توجه به اینکه فلورسانس باندهای حاصل از DNA تکثیر یافته بعد از مدت کوتاهی کمرنگ می‌شد، برای بررسی دقیق تر باندها از ژل عکس‌برداری شد (Tan *et al*., 2020).

تجزیه و تحلیل آماری

آنالیز داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ انجام شد. تفاوت در فراوانی *ویبریو پاراهمولیتیکوس* در مکان و دوره‌های دمایی مختلف توسط آزمون square Chi- ارزیابی شد.

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2024-07-27]

جدول ۱: پرایمرهای استفاده شده برای تکثیر ژنهای *tdh*، *trh* (Tan *et al*., 2020).

PCR target	F/R	Primer sequence	Tm	Fragment size
tdh	F:	5′-GTAAAGGTCTCTGACTTTTGGAC-3′	60.00	251 bp
	R:	5′-TGGAATAGAACCTTCATCTTCACC-3′	60.00	
trh	F:	5′-TTGGCTTCGATATTTTCAGTATCT-3′	60.00	373 bp
	R:	5′-CATAACAAACATATGCCCATTTCCC-3′	60.00	

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2024-07-27]

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2024-07-27]

نتایج

در این مطالعه بعد از جداسازی و شناسایی باکتری ها با استفاده از محیط های اختصاصی از جمله TCBS و CAV و تست‌های بیوشیمیایی، ۵۵ مورد *ویبریو پاراهمولیتیکو* شناسایی شد (جداول ۲ و ۳).

همه پارامتر های محیطی(دمای آب، شوری و pH) تغییرات موقتی در طول ۶ ماه مطالعه نشان دادند. دمای آب در طول زمان مطالعه بین ۳۱ °C –۸ (با میانگین °C ۱۹/۵) متغیر بود ، شوری در مرداد بالاترین مقدار بود و به حدود ppt ۲۰ رسید اما کمترین مقدار آن در فروردین ماه وحدود ppt ۴ بود. pH نمونه ها ۸/۷۰ – ۷/۳۵ (با میانگین۸/۰۲) ثبت شد.

فراوانی این باکتری از نظر منبع نمونه برداری (رسوبات و یا آب‌های ساحلی) و دمای آب (افزایش درجه حرارت) و مکان نمونه برداری متغیر بود. به طوری در مجموع این باکتری از ۱۸/۳ درصد نمونه‌ها جداسازی شد، به طوریکه که از این تعداد ۳۸ نمونه (۶۹ درصد) مربوط به رسوبات و ۱۷ نمونه (۳۱ درصد) مربوط به آب‌های ساحلی از نظر وجود این باکتری مثبت گزارش شدند. کمترین تعداد موارد مثبت جدا شده مربوط به نمونه‌های فروردین با ۲ مورد از ۵۰ نمونه کل (۰/۶ درصد) برداشته شده بود، که دامنه دمای نمونه‌های آب در این روزها ۱۵–۸ (با میانگین °C ۱۱/۵) ثبت شد. بیشترین ایزوله‌های این باکتری در اواسط تیر و مرداد بدست آمد، دامنه دمای نمونه های آب در این روزها ۳۱– ۲۷ (با میانگین °C ۲۹) ثبت شد.

از مجموع این ۵۵ مورد جدا شده بعداز انجام تست های فنوتیپی و ژنوتیپی مشخص شد که ۹۲/۷ درصد غیر پاتوژن هستند و ۷/ ۳ درصد پاتوژن هستند.

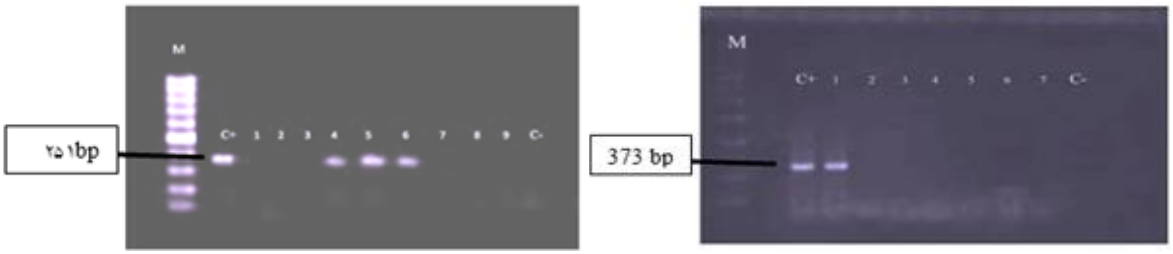
میزان pH بین ۸/۷۰ –۷/۳۵ مشاهده شد. در مورد شوری ارتبا ط ضعیفی بین فراوانی *ویبریو پاراهمولیتیکوسو* این فاکتور محیطی مشاهده شد، این ارتباط مخصوصا در ایستگاه‌های ۶ و۳ بیشتر به چشم می خورد.

به علت شیوع کم سویه های پاتوژن در نمونه ها، رابطه ی بین فراوانی این سویه ها و فاکتورهای محیطی را به طور قوی نمی‌توان تخمین زد و نیاز به تحقیقات و داده های بیشتری است ولی به هر حال با استفاده از آزمون های آماری پیشرفته از جمله ضریب همبستگی پیرسون، دمای °C ۳۱–۲۷، شوری ppt ۱۶–۲۰ و pH> ۸ ارتباط معنی‌داری با میزان شیوع سویه‌های پاتوژن نشان داد. اما بین دیگر فاکتورها ارتباط معنی‌داری مشاهده نشد. اما بزرگترین فاکتوری که میزان شیوع *ویبریو پاراهمولیتیکوس* پاتوژن را تحت تاثیر قرار می‌داد دمای بین °C ۳۱–۲۷ بود. به طوری که در سطح معنی داری ٪۹۵ ارتبا ط معنی‌داری از نظروجود نوع پاتوژن این باکتری واین دامنه دمایی مشاهده شد.

شناسایی مارکر های فنوتیپی و ژنوتیپی *tdh* و *trh*

از مجموع ۵۵ سویه *ویبریو پاراهمولیتیکوس* که مورد آزمایش تست‌های ژنوتیپی و فنوتیپی برای تولید اوره آز و ایجاد بتا همولیز قرارگرفتند، ۴ سویه (۷/۲ درصد) دارای این مشخصات بودند که تمام این نمونه‌ها از رسوبات جدا شده بودند و هیچ ایزوله ای مربوط به نمونه های آب نبود (اشکال ۲ و ۳).

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2024-07-27]



M = MARKER C+= positive control C- = negative control

شکل ۲: محصول PCR ژن *tdh* در ژل آگارز ۲٪

شکل ۳: محصول PCR ژن *trh* در ژل آگارز ۲٪

جدول۲: فراوانی *V. parahaemolyticus* های پاتوژن با استفاده از تستهای فنوتیپی

منبع	کاناگاوا/KP		اوره آز/ URE		جمع	
	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد
آب	–	–	–	–	–	–
رسوب	۱	۱/۸	۳	۵/۴	۴	۷/۳
جمع	۱	۱/۸	۳	۵/۴	۴	۷/۳

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2024-07-27]

جدول۳: فراوانی *V. parahaemolyticus* های پاتوژن با استفاده از واکنش های زنجیره پلیمراز

منبع	*tdh*		*trh*		جمع	
	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد
آب	–	–	–	–	–	–
رسوب	۱	۱/۸	۳	۵/۴	۴	۷/۳
جمع	۱	۱/۸	۳	۵/۴	۴	۷/۳

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2024-07-27]

بحث

مطالعه حاضر میزان شیوع *ویبریو پاراهمولیتیکوس* پاتوژن و غیرپاتوژن را درنمونه‌های محیطی رسوبات وآب های ساحلی دریای خزر در استان مشخص کرد. کنترل مناسب کیفیت آب برای حفظ غلظت پارامترهای محیطی آب در محدوده بهینه می‌تواند سرعت رشد ماهی را افزایش دهد، بر میزان استفاده از رژیم غذایی اثرگذار باشد و باعث کاهش وقوع بیماری‌های ماهی در مقیاس بزرگ شود. کیفیت ضعیف آب می‌تواند منجر به سود کم، کیفیت محصول کم و خطرات بالقوه سلامت انسان شود (طهماسبی و همکاران، ۱۴۰۲).

جداسازی این باکتری از نمونه های آب و رسوبات دریای خزر در استان گیلان در روزهای اول بهار غیرمعمول بود و میزان شیوع آن مخصوصا در نمونه‌های آب به مراتب کمتراز رسوبات بود. روی هم رفته، *ویبریو پاراهمولیتیکوس* در نمونه‌های آب و رسوبات از فروردین تا شهریور وجود داشت. اما میزان فراوانی آن در بهار و تابستان بسیار متفاوت بود. فراوانی باکتری تا زمانی که دمای آب حدود زیر^{o}C ۱۵ درجه بود، بسیار پایین بود و با افزایش دما فراوانی آن افزایش پیدا کرد. زمانی که دمای آب به بالای ^{o}C ۲۷رسید اکثر نمونه ها مثبت بودند، وقتی که دما ۴ درجه بیشتر شد، تعداد نمونه‌های مثبت به طور قابل توجهی افزایش یافت. این نتیجه مطابق سایر تحقیقات انجام گرفته، نشان دهنده این است که این باکتری در طول زمستان در رسوبات باقی می ماند و در اواخر بهار یا اوایل تابستان وقتی که دما به بالای ^{o}C ۱۵ می‌رسد، در آب منتشر می شود. به طوری که دراین تحقیق حداکثر آن در مرداد بود، که دما در این روزها بین^{o}C ۳۱-۲۷ متغیر بود. در این پژوهش فراوانی *ویبریو پاراهمولیتیکوس* پاتوژن از نظر مکان نمونه برداری تاثیر معنی‌داری نداشت، اما در بعضی تحقیقات میزان شیوع آن از نظر مکان نمونه برداری معنی‌داری بود. اگر چه سویه های *ویبریو پاراهمولیتیکوس* می‌توانند در رسوبات باقی بمانند، اما در زمستان تعداد نمونه‌های کمی می‌توان جدا کرد. مطالعات مختلف نشان داده‌اند که میزان جدا سازی *ویبریو پاراهمولیتیکوس* با توزیع فصلی و جغرافیایی به طور قابل توجهی در ارتباط بوده و وابسته به دما در مناطق در حال رشد صدف می‌باشد (Mahmud *et al.*, 2006). در مطالعه ای که توسط هلاکو و همکاران در سال ۱۳۸۴ در آبهای ساحلی دریای خزر انجام شد، از ۱۰۰ مورد ویبریو، ۳۲ مورد (۳۲٪) *ویبریو پاراهمولیتیکوس* جدا شده است (هلاکو و همکاران، ۱۳۸۴). در مطالعه دیگری که توسط آخوندزاده وهمکاران در سال ۱۳۸۴ انجام شده است، فراوانی آن در نمونه‌های میگوی دریایی جدا شده از خلیج فارس، ۱۲٪ تخمین زده شد. لازم به ذکر است که در این مطالعه که بر روی نمونه های محیطی جدا شده از استخر پرورش میگو در جنوب کشور، فراوانی این باکتری ۴۲/۸٪ به ثبت رسیده است، که یک نمونه آن در واگاتسوما بلاد آگار پدیده کاناواگا را نشان داد. همچنین در مطالعه ای توسط سلطانی و همکاران در سال ۱۳۷۶ به منظور مطالعه علل احتمالی باکتریایی (ویبریوها) تلفات در کارگاه‌های میگو حله بوشهر انجام شد، *ویبریو پاراهمولیتیکوس* در ۴۸ نمونه ۲۹/۲۰٪ مشاهده شد (سلطانی وهمکاران، ۱۳۷۶). تست‌های فنوتیپی در این تحقیق برای TDH و TRH به ترتیب

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2024-07-27]

۱/۸ و ۵/۴ درصد تخمین زده شد و در کشورهای دیگر از جمله برزیل، هنگ کنگ، ایتالیا و ایالات متحده آمریکا به ترتیب ۰/۵۵، ۲/۵ ،۲۰ و ۳/۲ درصد ثبت شده است. البته به نظر می‌رسد در ایتالیا این فراوانی غیر معمول است ودر مورد فعالیت اوره آزی در این تحقیقات اطلاعاتی در دسترس نیست. مطالعات مولکولی در این تحقیق ۱ (۱٪/۸) نمونه *tdh*+ و ۳ (۵/۴٪) نمونه *trh*+ نشان داد. در این تحقیق که واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمراز به طور جداگانه برای ژنهای *tdh* و*trh* *انجام* شد. ژنهای فوق در هیچ یک از نمونه ها به طور هم‌زمان وجود نداشت. همچنین در مطالعه انجام شده در مالزی ۱۵ و۷ ٪ نمونه‌های کشت محیطی و میگوهای فریز شده دارای ژن های همولیزین *tdh* و *trh* بودند. در مطالعه دیگر در مالزی وجود این ژن ها ۱۷٪ گزارش شده‌است (Sujeewa *et al.*, 2009).

طی مطالعه ای که به وسیله Siddique و همکاران در سال ۲۰۲۱ در بنگلادش انجام‌گرفت وجود *tlh* (ژن اختصاصی گونه) جدایه‌های *ویبریو پاراهمولیتیکوس* را تایید کرد. حضور ۱۲ ژن‌های مرتبط با بیماریزایی با آنالیز PCR شناسایی شدند. اکثر ایزوله ها از نظر ژن-های آزمایش شده منفی بودند. با این حال، ۵.۲۶٪ (۳۲۳/۱۷) ایزوله‌ها برای ژن *trh* که به عنوان یک ژن اصلی موثر در ایجاد بیماری بوده مثبت بودند، که با نتایج این تحقیق هم‌خوانی داشت. تمامی ۱۷ ایزوله دارای ژن های *tlh* و *trh* به عنوان گونه *ویبریو پاراهمولیتیکوس* با استفاده از پرایمر مخصوص گونه و سیستم VITEK 2 تشخیص داده شدند. از بین جدایه های *trh* مثبت، ۶ (۳۵٪)، ۶ (۳۵٪)، ۴ (۲۴٪) و ۱ (۶٪) به ترتیب از رسوبات، روئی، تیلاپیا و نمونه های آب بودند که تا حدی با این تحقیق هم‌خوانی داشت. هیچ ایزوله *trh* مثبتی در نمونه‌های میگو یافت نشد. در مجموع ۲۱۶ نمونه از ۳ سایت مختلف [۹۶ نمونه ازسایت (۱)، ۹۶ نمونه از سایت (۲) و ۲۴ نمونه از سایت (۳)] آنالیز شد که در آن ۶۰.۲ درصد (۲۱۶/۱۳۰) نمونه مثبت بود (Siddique *et al.*, 2021).

در فرانسه سویه های *tdh*+ هرگز شناسایی نشده‌اند اما شیوع نمونه های *trh*+ در حدود بین ۱۰-۳٪ گزارش شده است (Nishibuchi and Kaper, 1995). همچنین بعضی از تحقیقات گزارش کرده‌اند که فراوانی *tdh* در نمونه‌های محیطی و غذاهای دریایی در محدوده ی ۶-۰٪ متغیر است. در تحقیقات انجام گرفته در غذاهای دریای میزان بیشتری از نمونه های *tdh* مثبت گزارش شده است در Alabana ۱۲٪/۸ صدف‌های خوراکی برای *tdh* مثبت بودند (Honda and Iida, 1993). حضور بشدت پایین آلودگی نمونه های محیطی *ویبریو پاراهمولیتیکوس* پاتوژن در مقایسه با سویه‌های کلینیکی (که تقریبا همه دارای ژنهای بیماری‌زایی *tdh* و *trh* هستند) یک مشخصه ثابت در بسیاری از مطالعات انجام گرفته در نواحی مختلف جهان است. نتایج بدست آمده در این مطالعه نشان داد که حضور *ویبریو پاراهمولیتیکوس* در آب‌های ساحلی دریای خزر در استان گیلان نسبت به تحقیقات انجام شده در دیگرکشورها و در فصل ها و دما های مشابه کمتر است، که می تواند به علت شوری کمتر آن باشد. با افزایش دما وبه دنبال آن شوری، فراوانی این باکتری افزایش پیدا می‌کرد. در بعضی از سواحل بدلیل ورود آب از رودخانه ها میزان شوری کم شده و به همین دلیل تعداد این باکتری در مناطقی مثل ایستگاه های ۳ و۶ کمتر بود. درخرداد تبخیر آب نسبت به ماه‌های تیر و

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2024-07-27]

مرداد کمتر است و به همین دلیل میزان شوری کمتر می باشد. ولی در ماه‌های تابستان به علت تبخیر زیاد، شوری نیز چند درجه بالاتر می رود. تراکم این ارگانیسم در محیط‌های دریایی به فاکتورهایی مثل دمای آب، میزان شوری و میزان کلی فرم‌های مدفوعی موجود در آب بستگی دارد (Cordova *et al*., 2002). افزایش درجه حرارت باعث تنوع بیشتر گونه‌های *ویبریو* می‌شود. وقتی که دما و شوری افزایش می‌یابد، شرایط برای غلبه بعضی از گونه‌های *ویبریو* از قبیل *ویبریو پاراهمولیتیکوس* بهتر می‌شود. اخیرا افزایش تعداد مزارع پرورش میگو و ماهی باعث افزایش نگرانی درباره کیفیت آب و سلامت ماهی‌ها و میگوها شده است. فراوانی گونه‌های *ویبریو* که پتانسیل بیماری‌زایی دارند، با فاکتورهای محیطی از قبیل شوری، دمای آب، آلودگی های مدفوعی، فصل وغیره ارتباط داده شده‌اند. تعداد زیادی از محققان علاقه مند به تشخیص این عوامل و یا ارتباط فاکتورهای موثر در میزان شیوع *ویبریو پاراهمولیتیکوس* پاتوژن در نمونه‌های محیطی شده‌اند، اما هنوز هیچ مطالعه ای در ایران صورت نگرفته است. در ایران خطر ناشی از *ویبریو پاراهمولیتیکوس* به طور قابل ملاحظه‌ای کم است، پس شناسایی میکروارگانیسم و نظارت بر فراوانی سو یه‌های پاتوژن وغیر پاتوژن برای شبکه نظارت بر بیماریهای عفونی و بهداشت خیلی مهم نیست. شناسایی این سویه‌ها در نمونه‌های محیطی و غذاهای دریایی می‌تواند صنعت صادرات جانوران دریایی را تحت تاثیر قرار بدهد. برخلاف *V. cholerae* عفونت‌های ایجاد شده توسط *ویبریو پاراهمولیتیکوس* رابطه ای با شرایط اقتصادی اجتماعی، تغییرات آب و هوایی، کیفیت منابع آبی و رعایت بهداشت عمومی ندارد. مطالعات انجام گرفته در ویتنام نشان داد که ریسک فاکتور *ویبریو پاراهمولیتیکوس* مربوط به موقعیت اجتماعی اقتصادی بالای بیماری بوده است، به طوری که این گروه توانسته‌اند غذاهای دریایی را فراهم کنند. در مورد ***trh*** و ***tdh*** در این تحقیق در ۱۰۰٪ موارد، ژنوتیپ و فنوتیپ تشخیص داده شدند. پس با توجه به نتایج حاصل از تست‌های فنوتیپی دراوره آگار و واگاتسوما بلاد آگار ثابت کردیم که تولید اوره‌آز و پدیده کاناگاوا می‌تواند به عنوان یک مارکر فنوتیپی ژن ***trh*** و ***tdh*** باشد اما در تعدادی از تحقیقات با وجود ژنوتیپ TRH و TDH فنوتیپ آن شناسایی نشده است، که دلائل مختلفی می‌تواند داشته باشد و باید سایر فاکتورهای احتمالی بررسی شود. همچنین وجود سویه‌های پاتوژن در ۱۰۰ درصد موارد در رسوبات نشان دهنده این است که چسبندگی به نظر می‌رسد یک فاکتور مهم در وجود این ژنها در باکتری باشد. هر چند با توجه به تعداد موارد کم سویه‌های پاتوژن در نمونه‌های محیطی نمی‌توان رابطه قوی بین فراوانی این پاتوژن‌ها و رسوبات و یا سایر فاکتورهای محیطی پیدا کرد و نیاز به جمع آوری اطلاعات بیشتر و جامع تر از سرتاسر دنیا و بررسی آماری آنها دارد.

نتیجه گیری

شناسایی ژن‌های *بیماری‌زایی* ***tdh*** و ***trh*** در رسوبات و آب‌های ساحلی دریای خزر پیشنهاد کننده احتمال خطر برای سلامتی افرادی است که غذاهای دریایی خام، نیمه پخته یا فرآوری شده نامناسب مصرف می‌کنند، یا به طورمستقیم در تماس با آب دریا یا مواد غذایی آلوده هستند. با شناسایی فاکتورهای محیطی موثر و بررسی رابطه این فاکتورهای محیطی و

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2024-07-27]

فاکتورهای احتمالی دیگر در میزان شیوع سویه‌های پاتوژن و غیرپاتوژن و نظارت مداوم بر پارامترهای محیطی موثر در رشد این میکروارگانیسم مخصوصا درماه‌های گرم سال می‌توان به شناسایی این باکتری در غذاهای دریایی و در آب های ساحلی به منظور پیش بینی و تخمین خطر به موقع برای مصرف این غذاها وتماس مستقیم با آب های آلوده (مخصوصا در مناطق شنا) کمک کرد. با توجه به اینکه در غذاهای دریایی هم سویه‌های پاتوژن و هم غیر پاتوژن *ویبریو پاراهمولیتیکوس* وجود دارند، کاربرد PCR برای ژن های ویرولانس اختصاصی از قبیل *trh* و *tdh* می‌تواند به شناسایی سویه‌های پاتوژن *ویبریو پاراهمولیتیکوس* کمک کند.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از مساعدت همه کسانی که در مراحل اجرایی این پروژه من را یاری نمودند، سپاسگزاری می‌نمایم.

منابع

۱. آخوندزاده بستی ، ح .، ابراهیم زاده موسوی، ح.، ابراهیم زاده موسوی، ع.، ۱۳۸۶. بررسی گونه‌های *ویبریو* در میگوهای پرورشی (*Paeneus indicus*) و دریایی (*Paeneus semisulcatus*) صید شده در استان بوشهر. مجله تحقیقات دامپزشکی، ۶۲(۵)، ۳۱۰ـ۳۰۷.

۲. طهماسبی، م. ح.، مسعودیان، م.، نیکزاد، ف.، ۱۴۰۲. بررسی کیفیت آبهای زیرزمینی مصرفی در پرورش ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در دشت مازندران. نشریه توسعه آبزی پروری، ۱۷(۴)، ۳۷-۲۵.

۳. موسوی، س. س.، ذریه زهرا، س. م. ج.، عزیززاده، م.، ۱۴۰۳. حمل و نقل و جابه جایی مسئولانه و نقش آن در انتقال عوامل بیماری‌زا و بروز بیماری-های عفونی در مزارع تکثیر و پرورش سردآبی ایران. نشریه توسعه آبزی پروری، ۱۸(۱) ، ۸۸-۶۹.

۴. هلاکو، ا.، مظفری، ن. ا.، فروهش تهرانی، ه.، ۱۳۸۴. انتشار گونه های *ویبریو* در آب‌های دریای خزر. مجله دانشکده علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی گناباد ، ۱۱ (۳)، ۱۶-۲۰.

5. Beshiru, A., Okareh, O. T., Okoh, A. I. & Igbinosa, E. O., 2020. Detection of antibiotic resistance and virulence genes of Vibrio strains isolated from ready-to-eat shrimps in Delta and Edo States Nigeria.Journal of Applied Microbiology, 129(1), 17-36.
6. Cook, D. W., Bowers, J. C., DePaola, A., 2002. Density of total and pathogenic (*tdh*+) *Vibrio parahaemolyticus in* Atlantic and Gulf Coast molluscan shellfish at harvest. Journal of Food Protection, 65(12), 1873-80.
7. Cordova, J. L., Astorga, J., Silva, W., Riquelme, C., 2002. Characterization by PCR of Vibrio parahaemolyticus isolates collected during the 1997-1998 Chilean outbreaks. Biological Research, 35, 433-440.
8. Ellingsen, B., Anette, Olsen, S., Jaran, Granum, E., Per, Liv M., Rorvik, Narjol González-Escalona. N., 2013. Genetic characterization of trh positive Vibrio spp. isolated from Norway,,Frontiers in Cellular and Infection Microbiology 25(3), 1-9.

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2024-07-27]

9. Honda, T., and Iida., T., 1993. The pathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus* and the role of the thermostable direct haemolysin and related haemolysins. Reviews and Research in Medical Microbiology. 4(2), 106–113.
10. Igbinosa, E. O., Beshiru, A., Igbinosa, I. H., Ogofure, A. G. , Uwhuba, K. E., 2021. Prevalence and characterization of food-borne *Vibrio parahaemolyticus* from African salad in southern Nigeria, Frontiers in Microbiology.8(12), 632266.
11. Izutsu, K., Kurokawa ,K., Tashiro, K., Kuhara, S., Hayashi ,T., Honda, T., 2008 . Comparative genomic analysis using microarray demonstrates a strong correlation between the presence of the 80-kilobase pathogenicity island and pathogenicity in Kanagawa phenomenon-positive *Vibrio parahaemolyticus* strains. Infection and Immunity,76(3), 1016-23.
12. Igbinosa, E. O., Beshiru, A., Igbinosa, I. H., Ogofure, A. G. , Uwhuba, K. E., 2021. Prevalence and characterization of food-borne *Vibrio parahaemolyticus* from African salad in southern Nigeria, Frontiers in Microbiology. 8(12), 632266.
13. Izutsu, K., Kurokawa ,K., Tashiro, K., Kuhara, S., Hayashi ,T., Honda, T., 2008 . Comparative genomic analysis using microarray demonstrates a strong correlation between the presence of the 80-kilobase pathogenicity island and pathogenicity in Kanagawa phenomenon-positive *Vibrio parahaemolyticus* strains. Infection and Immunity,76(3), 1016-23.
14. Lozano-Leon, A., Torres, J., Osorio, C. R., Martinez-Urtaza., J., 2003. Identification of *tdh*-positive *Vibrio parahaemolyticus* from an outbreak associated with raw oyster consumption in Spain. FEMS Microbiology Letters. 226, 281-284.
15. Mahmud, Z. H., Kassu A., Mohammad A., Yamato M., Bhuiyan N. A., Nair G. B., et al., 2006. Isolation and molecular characterization of toxigenic *Vibrio parahaemolyticus* from the Kii Channel, Japan. Microbiological Research, 161, 25–37.
16. Mala, W., Alam M., Angkititrakul S., Wongwajana S., Lulitanond V., Huttayananont S., Kaewkes W., Faksri K., Chomvarin C., 2016. Serogroup, virulence, and molecular traits of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from clinical and cockle sources in northeastern Thailand, Infection, Genetics and Evolution, 39, 212–218.
17. Nishibuchi, M., Kaper., J. B., 1995. Thermostable direct hemolysin gene of *Vibrio parahaemolyticus*: a virulence gene acquired by a marine bacterium. Infection and Immunity, 64, 2093-2099.
18. Rezny, B.R., Evans, D.S. *Vibrio parahaemolyticus* Infection. [Updated 2023 Jun 26]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan-. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459164/.
19. Siddique, A.B., Moniruzzaman, M.,Ali, S., Dewan .M.D.N., Islam, M.R.,Islam M.D.S, Amin M.B., Mondal D.,Parvez, A.K. , Mahmud, Z.H. 2021. Characterization of Pathogenic Vibrio parahaemolyticus Isolated From Fish Aquaculture of the Southwest Coastal Area of Bangladesh. Frontiers in Microbiology. :635539.doi: 10.3389/fmicb.2021.635539.
20. Sujeewa, W., Norrakiah, A. S. and Laina M., 2009. Prevalence of toxic genes of Vibrio parahaemolyticus in shrimps (Penaeus monodon) and culture environment. International Food Research Journal, 16, 89-95.
21. Tan, C.W., Rukayadi, Y., Hasan, H., Thung, T.Y., Lee, E., Rollon, W.D., Hara, H., Kayali, A.Y., Nishibuchi, M., Radu, S., 2020. Prevalence and antibiotic resistance patterns of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from different types of seafood in Selangor, Malaysia. Saudi Journal of Biological Sciences, 27(6), 1602-1608.
22. Veettil. P., Kutty, R., 2014. Incidence of multidrug resistant *Vibrio parahaemolyticus* isolated from Ponnani, South India. Iranian Journal of Medical Microbiology, 6(2), 60-67.
23. Wong, H. C., Liu, S. H., Ku, L. W., Lee, I. Y., Wang, T. K., Lee, Y. S., Lee. C. L.,

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2024-07-27]

Kuo, L. P., Shih, D.Y. C., 2000. Characterization of *Vibrio parahaemolyticus* isolates obtained from foodborne illness outbreaks during 1992 through 1995 in Taiwan. Journal of Food Protection, 63, 900-906.

24. Yamamoto, T., Yokot, T., 1989. Adherence targets of *Vibrio parahaemolyticus* in human small intestines. Infection and Immunity, 57, 2410-2419.
25. Yu, Q., Niu, M., Yu, M., Liu, Y., Wang, D., Shi, X., 2016. Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from retail shellfish in Shanghai. Food Control, 60, 263–268.

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2024-07-27]