

"مقاله پژوهشی"

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

خسرو عیسی زاده*

۱- گروه میکروبیولوژی، دانشکده 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 پلیمرز از سواحل دریای خزر (استان گیلان) بود. نمونه های آب و رسوبات دریای خزر به ترتیب از عمق ۵۰-۳۰ و ۲۰-۱۰ سانتی متری 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 و کروم آگار ویبریو صورت گرفت. در مجموع ۵۵ ایزوله با انجام تست‌های بیوشیمی، فنوتیپی و واکنش‌های زنجیره ای پلیمرز شناسایی شدند. از مجموع ۵۵ مورد ویبریو پاراهمولیتیکوس جدا شده، فراوانی ژن‌های *tdh* و *trh* به ترتیب ۱ مورد (۱/۸٪) و ۳ مورد (۵/۴٪) بود. این مطالعه نشان داد که ویبریو پاراهمولیتیکوس هایی که پتانسیل بیماری‌زایی دارند باید به طور مداوم 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، *trh*، *tdh*، آب‌های ساحلی، رسوبات

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 محیط‌های آبی می‌باشد. همچنین سمومی را در بیماری‌های اسهالی ترشح می‌کند. این پاتوژن از غذاهای دریایی فرآوری شده بازیابی شده است (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. ارگانسیم‌های 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 ارگانسیم‌ها 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 می‌تواند میزبان را از راه‌های مختلف آلوده کند. 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 باکتری‌ها است. با این حال، فاکتور اصلی حدت، همولیزین مستقیم پایدار در برابر حرارت (TDH) است. TDH در اکثر نمونه‌های 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 DH 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 ویبریو پاراهمولیتیکوس می‌تواند هر دو ژن را حمل کرده

تولید و نیز عدم گسترش این بیماری ها به مناطق عاری از آنها و نیز محیط های دریایی همچون سیستم های پرورش در قفس و محیط های دریایی است (موسوی و همکاران، ۱۴۰۳).

مواد و روش ها

منطقه مورد مطالعه و جمع آوری نمونه ها

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. نمونه برداری از آب دریا حدود ۲-۳ متر داخل آب دریا (طولی) و از عمق ۵۰-۳۰ سانتی متری بوسیله شیشه های استریل دهان گشاد و از رسوبات به عمق ۲۰-۱۰ سانتی متری از هفت ایستگاه با تکنیک های استریل برداشته شد (شکل ۱). نمونه ها در ظروف در بسته و داخل یخ خشک قرار داده شده و برای تجزیه و تحلیل در کوتاه ترین 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 اندازه گیری دمای آب، pH میزان شوری به ترتیب از ترمومتر جیوه ای، دستگاه pH متر دیجیتال و دستگاه شوری سنج استفاده گردید.

و به طور هم زمان آنها را بیان کند. به نظر می رسد که این ایزوله ها TDH کمتری نسبت به ایزوله های *trh* منفی تولید می کنند (Ellingsen et al., 2013). مطالعات انجام گرفته توسط Nishibuchi و Kaper در سال ۱۹۹۵ نشان داد که همه سویه های KP-positive در حقیقت دارای دو ژن *tdh* هستند. درحالی که سویه های ویبریو پاراهمولیتیکوس که همولیز ضعیفی روی واگاستوما بلاد آگار نشان می دهند و KP-Intermediate محسوب می شوند تنها فقط یک ژن *tdh* دارند. وقتی که سویه های KP-negative را بررسی می کنیم اغلب آنها منشأ محیطی دارند. ۱۶ درصد از این سویه ها دارای یک کپی از ژن *tdh* هستند، در حالی که بقیه سویه های KP-negative ژن *tdh* را نداشتند. اکثر این سویه های KP-negative نمی توانند 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 گونه های جنس ویبریو مخصوصا ویبریو پاراهمولیتیکوس و بیماری زایی آنها در سواحل دریای خزر در استان گیلان هدف از این مطالعه جداسازی و شناسایی ویبریو پاراهمولیتیکوس از آب های ساحلی دریای خزر در استان گیلان با استفاده از تست های بیوشیمیایی و بررسی حضور ژن های *tdh* و *trh* در سویه ها بود. امروزه نقش بیماری های عفونی به ویژه بیماری های اگروتیک در حفظ و بقای سرمایه های کشورها غیر قابل انکار است. در این میان ایجاد مراکز SPF و عاری بودن ماهیان پرورشی از بیماری های اختار کردنی امری ضروری در جهت حفظ افزایش



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

جداسازی و شناسایی ویبریو پاراهمولیتیکوس از نمونه های آب

در مورد نمونه های آب های ساحلی، در شرایط استریل ۱۰ میلی لیتر از نمونه با پیت 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 پیتون 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 باکتری ها 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).

و تا رقت ۳-۱۰ از آن رسوب تهیه شد. این محیط به مدت ۱۶-۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه گردید. در مرحله بعد مقداری از محتویات محیط APW را بر روی محیط TCBS کشت خطی داده و به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه گردید. سپس محیط TCBS از نظر وجود کلنی های سبز (سوکروز منفی) و کوچک و سبزآبی در آزمایشگاه مورد بررسی قرار گرفت. کلنی های 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 قرار گرفت (Veettil et al., 2014).

مشاهده میکروسکوپی و تست های بیوشیمیایی استاندارد

بعد از مشاهده میکروسکوپی و تأیید با سیل های گرم منفی خمیده در کشت های اولیه و با سیل راست در کشت های مکرر به دلیل پلی مورفیسم ویبریوها، مخصوصاً

جداسازی و شناسایی ویبریو پاراهمولیتیکوس از نمونه های رسوبات

۱ گرم از رسوب را وزن کرده و به ۹ ml آب پیتون قلیائی حاوی ۳% NaCl و pH ۸/۶: اضافه شد

جوشانده شدند و در دور ۸۰۰۰ rpm به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ گردید. لایه رویی بعنوان DNA الگو مورد استفاده قرار گرفت. بررسی حضور ژن های همولیزین ها 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 صورت گرفت. 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 می شد. 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 می شد. با توجه به اینکه فلورسانس باندهای حاصل از DNA تکثیر یافته بعد از مدت کوتاهی کمرنگ می شد، برای بررسی دقیق تر باندها از ژل عکس برداری شد (Tan et al., 2020).

تجزیه و تحلیل آماری

آنالیز داده ها با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ انجام شد. تفاوت در فراوانی ویبریو پاراهمولیتیکوس در مکان و دوره های دمایی مختلف توسط آزمون square Chi-ارزیابی شد.

در نمونه های محیطی با استفاده از یکسری از تست های بیوشیمیایی به تشخیص آنها پرداخته شد. تست های بیوشیمیایی و تأییدی استاندارد از قبیل تست اکسیداز، LDC، ODC و ADH، بعنوان تست های اصلی برای تشخیص گونه ویبریو انجام گرفت. تست های 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 کلنی های مشکوک به ویبریو پاراهمولیتیکوس و بعد از انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت این محیط ها از نظر رشد باکتری (ایجاد کدورت) مورد بررسی قرار گرفتند (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 می باشد. این تست ها شامل تولید اوره آز و ایجاد بتا همولیز در بلاد آگار و آگاتسوما بودند که به عنوان یک مارکرفنوتیپی برای شناسایی سویه های بیماری زا به کار رفتند.

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

برای آماده سازی DNA مورد نیاز جهت انجام PCR از روش جوشاندن استفاده شد. در این روش یک لوپ کامل از کلنی های کشت شبانه در محیط کشت تریپتیکاز سوی براث (3% NaCl) به ۳۰۰ µl آب دو بار تقطیر شده تلقیح شد و به مدت ۱۵ دقیقه برای لیز سلولی

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

PCR target	F/R	Primer sequence	Tm	Fragment size
<i>tdh</i>	F:	5'-GTAAAGGTCTCTGACTTTTGGAC-3'	60.00	251 bp
	R:	5'-TGGAATAGAACCCTTCATCTTCACC-3'	60.00	
<i>trh</i>	F:	5'-TTGGCTTCGATATTTTCAGTATCT-3'	60.00	373 bp
	R:	5'-CATAACAAACATATGCCCATTTCCC-3'	60.00	

نتایج

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

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

فراوانی این باکتری از نظر منبع نمونه برداری (رسوبات و یا آب های ساحلی) و دمای آب (افزایش درجه حرارت) و مکان نمونه برداری متغیر بود. به طوری در مجموع این باکتری از ۱۸/۳ درصد نمونه ها جداسازی شد، به طوریکه که از این تعداد ۳۸ نمونه (۶۹ درصد) مربوط به رسوبات و ۱۷ نمونه (۳۱ درصد) مربوط به آب های ساحلی از نظر وجود این باکتری مثبت گزارش شدند. کمترین تعداد موارد مثبت جدا شده مربوط به نمونه های فروردین با ۲ مورد از ۵۰ نمونه کل (۰/۶ درصد) برداشته شده بود، که دامنه دمای نمونه های آب

در این روزها ۱۵-۸ (با میانگین ۱۱/۵ °C) ثبت شد. بیشترین ایزوله های این باکتری در اواسط تیر و مرداد بدست آمد، دامنه دمای نمونه های آب در این روزها ۲۷-۳۱ (با میانگین ۲۹ °C) ثبت شد.

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

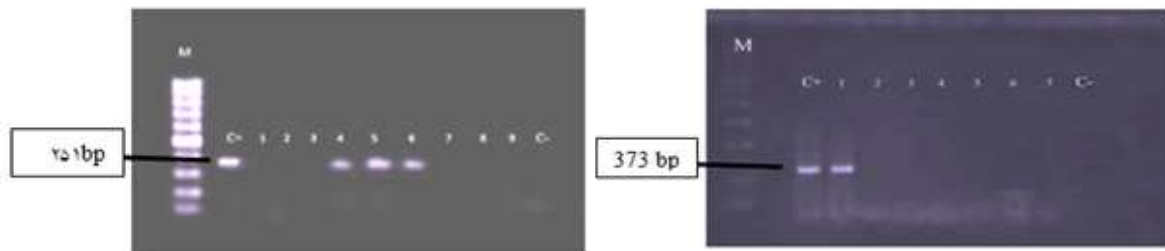
میزان pH بین ۸/۷۰ - ۷/۳۵ مشاهده شد. در مورد شوری ارتباط ضعیفی بین فراوانی ویبریو پاراهمولیتیکوسو این فاکتور محیطی مشاهده شد، این ارتباط مخصوصا در ایستگاه های ۶ و ۳ بیشتر به چشم می خورد.

به علت شیوع کم سویه های پاتوژن در نمونه ها، رابطه ی بین فراوانی این سویه ها و فاکتورهای محیطی را به طور قوی نمی توان تخمین زد و نیاز به تحقیقات و داده های بیشتری است. ولی با استفاده از آزمون های آماری پیشرفته از جمله ضریب همبستگی پیرسون، دمای ۲۷-۳۱ °C، شوری ۱۶-۲۰ ppt و pH > ۸ ارتباط معنی داری با میزان شیوع سویه های پاتوژن نشان داد. اما بین دیگر فاکتورها ارتباط معنی داری مشاهده نشد. اما بزرگترین فاکتوری که میزان شیوع ویبریو پاراهمولیتیکوس پاتوژن را تحت تاثیر قرار می داد دمای بین ۲۷-۳۱ °C بود. به

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

طوری که در سطح معنی داری ۹۵٪ ارتباط معنی داری از نظریه وجود نوع پاتوژن این باکتری و این دامنه دمایی مشاهده شد.

شناسایی مارکرهای فنوتیپی و ژنوتیپی *tdh* و *trh*



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٪

جدول ۲: 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

جدول ۳: فراوانی *V. parahaemolyticus* های پاتوژن با استفاده از واکنش های زنجیره پلیمرز

منبع	<i>tdh</i>		<i>trh</i>		جمع
	تعداد	درصد	تعداد	درصد	
آب	-	-	-	-	-
رسوب	۱	۱/۸	۳	۵/۴	۷/۳
جمع	۱	۱/۸	۳	۵/۴	۷/۳

بحث

مطالعه حاضر میزان شیوع ویبریو پاراهمولیتیکوس پاتوژن و غیرپاتوژن را در نمونه های محیطی رسوبات و آب های ساحلی دریای خزر در استان مشخص کرد. کنترل مناسب کیفیت آب برای حفظ غلظت پارامترهای محیطی آب در محدوده بهینه می تواند سرعت رشد ماهی را افزایش دهد، بر میزان استفاده از رژیم غذایی اثرگذار باشد و باعث کاهش وقوع بیماری های ماهی در مقیاس بزرگ شود. کیفیت ضعیف آب می تواند 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 نمونه های آب به مراتب کمتر از رسوبات بود. روی هم رفته، ویبریو پاراهمولیتیکوس در نمونه های 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 ۱۵ °C درجه بود، بسیار پایین بود و با افزایش دما فراوانی آن افزایش

پیدا کرد. زمانی که دمای آب به بالای ۲۷ °C رسید اکثر نمونه ها مثبت بودند، وقتی که دما ۴ درجه بیشتر شد، تعداد نمونه های 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 ۱۵ °C می رسد، در آب منتشر می شود. به طوری که در این تحقیق حداکثر آن در مرداد بود، که دما در این روزها بین ۲۷-۳۱ °C متغیر بود. در این پژوهش فراوانی ویبریو پاراهمولیتیکوس پاتوژن از نظر مکان نمونه برداری تاثیر معنی داری نداشت، اما در بعضی تحقیقات میزان شیوع آن از نظر مکان نمونه برداری معنی داری بود. اگر چه سویه های ویبریو پاراهمولیتیکوس می توانند در رسوبات باقی بمانند، اما در زمستان تعداد نمونه های کمی می توان جدا کرد. مطالعات مختلف نشان داده اند 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 می باشد (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 و همکاران 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 نمونه‌های 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 مطالعه‌ای توسط سلطانی و همکاران در سال ۱۳۷۹ به منظور مطالعه علل احتمالی باکتریایی (ویبریوها) تلفات در کارگاه‌های میگو حله بوشهر انجام شد، ویبریو پاراهمولیتیکوس در ۴۸ نمونه ۲۹/۲۰٪ مشاهده شد. تست‌های فنوتیپی در این تحقیق برای TDH و TRH به ترتیب 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 ۵۵/۰، ۲۰، ۲/۵ و ۳/۲ درصد ثبت شده است. البته به نظر می‌رسد در ایتالیا این فراوانی غیر معمول است و در مورد فعالیت اوره‌آزی 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 پلیمرز به طور جداگانه برای ژنهای trh و tdh انجام شد. ژنهای فوق در هیچ یک از نمونه‌ها به طور هم‌زمان وجود نداشت. همچنین در مطالعه انجام شده در مالزی ۱۵ و ۷٪ نمونه‌های کشت محیطی و میگوهای فریز شده دارای ژن‌های همولیزین tdh و trh بودند. در مطالعه دیگر در مالزی وجود این

ژن‌ها ۱۷٪ گزارش شده است (Sujeewa et al., 2009).

طی مطالعه‌ای که به وسیله Siddique و همکاران در سال ۲۰۲۱ در بنگلادش انجام گرفت وجود tlh (ژن اختصاصی گونه) جدایه‌های ویبریو پاراهمولیتیکوس را تایید کرد. حضور ۱۲ ژن‌های مرتبط با بیماری‌زایی با آنالیز PCR شناسایی شدند. اکثر ایزوله‌ها از نظر ژن-های آزمایش شده منفی بودند. با این حال، ۵۲۶٪ (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 ژن‌های tlh و trh به عنوان گونه ویبریو پاراهمولیتیکوس با استفاده از پرایمر مخصوص گونه و سیستم VITEK 2 تشخیص داده شدند. از بین جدایه‌های trh مثبت، ۶ (۳۵٪)، ۶ (۳۵٪)، ۴ (۲۴٪) و ۱ (۶٪) به ترتیب از رسوبات، روئی، تیلایا و نمونه‌های 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 از سایت (۱)، ۹۶ نمونه از سایت (۲) و ۲۴ نمونه از سایت (۳)] آنالیز شد که در آن ۶۰۲ درصد (۲۱۶/۱۳۰) نمونه مثبت بود (Siddique et al., 2021).

در فرانسه سویه‌های $tdh+$ هرگز شناسایی نشده‌اند اما شیوع نمونه‌های $trh+$ 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 ۶-۰٪ متغیر است. در تحقیقات انجام گرفته در غذاهای دریایی میزان بیشتری از نمونه‌های tdh مثبت گزارش شده است در Alabana ۱۲٪/۸ صدف-

های خوراکی برای *tdh* مثبت بودند (Honda and Iida, 1993). حضور بشدت پایین آلودگی نمونه های محیطی ویبریو پاراهمولیتیکوس پاتوژن در مقایسه با سویه های کلینیکی (که تقریباً 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 دیگر کشورها و در فصل‌ها و دماهای مشابه کمتر است، که می‌تواند به علت شوری کمتر آن باشد. با افزایش دما و به دنبال آن شوری، فراوانی این باکتری افزایش پیدا می‌کرد. در بعضی از سواحل بدلیل ورود آب از رودخانه‌ها میزان شوری کم شده و به همین دلیل تعداد این باکتری در مناطقی مثل ایستگاه‌های ۳ و ۶ کمتر بود. درخرداد تبخیر آب نسبت به ماه‌های تیر و مرداد کمتر است و به همین دلیل میزان شوری کمتر می‌باشد. ولی در فصل تابستان به علت تبخیر زیاد، شوری نیز چند درجه بالاتر می‌رود. 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. اخیراً 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، آلودگی‌های

مدفوعی، فصل و غیره 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 مطالعه‌ای 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 سویه‌های پاتوژن و غیر 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 رابطه‌ای 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 *tdh* و *trh* در این تحقیق در ۱۰۰٪ موارد، ژنوتیپ و فنوتیپ تشخیص داده شدند. پس با توجه به نتایج حاصل از تست‌های فنوتیپی درآوره آگار و واگاتسوما بلاد آگار ثابت کردیم که تولید اوره‌آز و پدیده کاناگاو می‌تواند به عنوان یک مارکر فنوتیپی ژن *tdh* و *trh* باشد اما در تعدادی از تحقیقات با وجود ژنوتیپ *TDH* و *TRH* فنوتیپ آن شناسایی نشده است، که دلایل 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

سپاسگزاری

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

منابع

۱. آخوندزاده بستی، الف.، ابراهیم زاده موسوی، ح.، میثاقی، ع.، سلطانی، م.، اسماعیلی، ح.، ۱۳۸۶. بررسی گونه‌های ویبریو در میگوهای پرورشی (*Paeneus indicus*) و دریایی (*Paeneus semisulcatus*) صید شده در استان بوشهر. مجله تحقیقات دامپزشکی، ۶۲ (۵)، ۳۱۰-۳۰۷.
۲. سلطانی، م.، کاکولکی، ش.، آوخ کیسمی، م.، ۱۳۷۹. جداسازی و شناسایی گونه‌های غالب ویبریو در میگوهای پرورشی تعدادی از کارگاه‌های پرورش میگوی حله بوشهر. مجله تحقیقات دامپزشکی، ۵۵ (۲)، ۳۲-۲۹.
۳. طهماسبی، م.ح.، مسعودیان، م.، نیکزاد، ف.، ۱۴۰۲. بررسی کیفیت آبهای زیرزمینی مصرفی در پرورش ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در دشت مازندران. نشریه توسعه آبرزی پروری، ۱۷ (۴)، ۳۷-۲۵.
۴. موسوی، س.س.، ذریه زهرا، س.م.ج.، عزیززاده، م.، ۱۴۰۳. حمل و نقل و جابه‌جایی مسئولانه و نقش آن در انتقال عوامل بیماری‌زا و بروز بیماری‌های عفونی در مزارع تکثیر و پرورش سردآبی ایران. نشریه توسعه آبرزی پروری، ۱۸ (۱)، ۸۸-۶۹.
۵. هلاکو، ا.، مظفری، ن.ا.، فروهش تهرانی، ه.، ۱۳۸۴. انتشار گونه‌های ویبریو در آب‌های دریای

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 جمع‌آوری اطلاعات بیشتر و جامع‌تر از سرتاسر دنیا و بررسی آماری آنها دارد.

نتیجه‌گیری

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 طور مستقیم در تماس با آب دریا یا مواد غذایی آلوده هستند. با شناسایی فاکتورهای محیطی موثر و بررسی رابطه این فاکتورهای محیطی و فاکتورهای احتمالی دیگر در میزان شیوع سویه‌های پاتوژن و غیرپاتوژن و نظارت مداوم بر پارامترهای محیطی موثر در رشد این میکروارگانیسم مخصوصا در ماه‌های گرم سال می‌توان به شناسایی این باکتری در غذاهای دریایی و در آب‌های ساحلی به منظور پیش‌بینی و تخمین خطر به موقع برای مصرف این غذاها و تماس مستقیم با آب‌های 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 ژن‌های ویروالانس اختصاصی از قبیل *trh* و *tdh* می‌تواند به شناسایی سویه‌های پاتوژن ویبریو پاراهمولیتیکوس کمک کند.

13. 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.
14. 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/>.
15. 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.
16. 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.
17. 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.
18. Veettil. P., Kuty, R., 2014. Incidence of multidrug resistant *Vibrio parahaemolyticus* isolated from Ponnani, South India. *Iranian Journal of Medical Microbiology*, 6(2), 60-67.
19. 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.
- خزر. مجله دانشکده علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی گناباد، ۱۱ (۳)، ۲۰-۱۶.
6. Beshiru, A., Okareh, O. T., Okoh, A. I., Igbinsosa, 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.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. Honda, T., 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.
11. 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.
12. Mala, W., Alam, M., Angkititrakul, S., Wongwajana, S., Lulitanond, V., Huttayanont, 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.

Isolation and identification of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* from waters and coastal sediments of Caspian Sea (Gilan province, Iran) and investigation of its virulence genes

Issazadeh, K.^{1*}

1- Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Lahijan Branch, Islamic Azad University, Lahijan, Iran.

Received: 11 March 2024

Accepted: 7 June 2024

Abstract

The purpose of this study was to determine the frequency of *Vibrio parahaemolyticus* and to identify pathogenic and non-pathogenic strains of this bacterium using a series of biochemical tests and polymerase chain reactions from the shores of the Caspian Sea (Gilan Province). The water and sediment samples of the Caspian Sea were collected from the depth of 30-50 and 10-20 cm respectively by aseptic method. Sampling date, sampling location, temperature, pH and salinity were measured. Isolation and identification of environmental isolates was done using standard methods in order to determine the genus and species using specific media such as thiosulfate citrate bile sucrose and *Vibrio* chrome agar. A total of 55 isolates were identified by biochemical, phenotypic and polymerase chain reaction tests. From the total of 55 cases of *Vibrio parahemolyticus* isolated, the frequency of *tdh* and *trh* genes was 1 case (1.8%) and 3 cases (5.4%) respectively. This study showed that *Vibrio parahaemolyticus*, which have pathogenic potential, should be continuously monitored as agents of contamination of coastal waters. The isolation of these species indicates a health warning for people who use raw seafood or are in direct contact with the waters of the Caspian Sea are in this area.

Keywords: *Vibrio parahaemolyticus*, *tdh*, *trh*, Coastal waters, Sediments, Caspian Sea

* Corresponding Author: issa_kaam@yahoo.com