

## "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 پذیرش: ۱۴۰۳/۳/۱۸

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۲/۲۱

## 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 گونه‌ها 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 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، هشپیر و آستارا در طی مدت ۶ ماه (فروردین تا شهریور ۱۴۰۰) جمع‌آوری شدند. نمونه‌برداری از آب دریا حدود ۲-۳ متر داخل آب دریا (طولی) و از عمق ۵۰-۳۰ سانتی‌متری بوسیله شیشه‌های استریل دهان‌گشاد و از رسوبات به عمق ۲۰-۱۰ سانتی‌متری از هفت 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 نمونه‌های جمع‌آوری شده در محل شامل تاریخ و محل نمونه‌برداری، 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 استفاده گردید.

و به طور هم‌زمان آنها را بیان کند. به نظر می‌رسد که این ایزوله‌ها TDH کمتری نسبت به ایزوله‌های *trh* منفی تولید می‌کنند (Ellingsen et al., 2013). مطالعات انجام گرفته توسط Nishibuchi و Kaper در سال ۱۹۹۵ نشان داد که همه سویه‌های KP-positive در حقیقت دارای دو ژن *tdh* هستند. درحالی‌که سویه‌های ویبریو پاراهمولیتیکوس که همولیز ضعیفی روی واگاستوما بلاد آگار نشان می‌دهند و KP-Intermediate محسوب می‌شوند 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 سویه‌های KP-negative نمی‌توانند پروتئین TDH را تولید کنند. بعضی از نمونه‌های بالینی دارای هر دو ژن *tdh* و *trh* هستند در حالی‌که بیشتر نمونه‌های محیطی فاقد ژن‌های *tdh* یا *trh* به طور هم‌زمان هستند (Cook et al., 2002). با توجه به کمبود اطلاعات در رابطه با فراوانی گونه‌های جنس ویبریو مخصوصاً ویبریو پاراهمولیتیکوس و بیماری‌زایی آنها در سواحل 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 تست‌های بیوشیمیایی و بررسی حضور ژن‌های *tdh* و *trh* در سویه‌ها بود. امروزه نقش بیماری‌های عفونی به ویژه بیماری‌های آگروتیک در حفظ و بقای سرمایه‌های کشورها غیرقابل انکار است. در این میان ایجاد مراکز SPF و عاری بودن ماهیان پرورشی از بیماری‌های مخاطار کردنی امری ضروری در جهت حفظ افزایش



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

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 سبزی 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 ( Veetil *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 و بیروهها، مخصوصاً

### 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 سترات بایل اسکولین آگار TCBS کشت داده شدند و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ انکوبه گردیدند (Veetil *et al.*, 2014).

### 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 ژن‌های همولیزین‌ها و تعیین نوع آن با استفاده از پرایمرهای اختصاصی (جدول ۱) برای هر یک از ژنهای *tdh* و *trh* و به کارگیری 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 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 عکس برداری 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.

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 انجام گرفت. 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 محیط‌ها از نظر رشد باکتری (ایجاد کدورت) مورد بررسی قرار گرفتند (Veetil et al., 2014).

### تشخیص همولیزین‌ها TRH و TDH با استفاده از تست‌های فنوتیپی

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

### بررسی حضور ژنهای همولیزین‌ها 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 کلنی‌های کشت شبانه در محیط کشت تریپتیکاز سوی برات (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 روزها ۱۵-۸ (با میانگین  $11/5^{\circ}\text{C}$ ) ثبت شد. بیشترین ایزوله‌های این باکتری در اواسط تیر و مرداد بدست آمد، دامنه دمای نمونه‌های آب در این روزها ۲۷-۳۱ (با میانگین  $29^{\circ}\text{C}$ ) 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 ایستگاه‌های ۶ و ۳ بیشتر به چشم می خورد.

به علت شیوع کم سویه های پاتوژن در نمونه‌ها، 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  $27-^{\circ}\text{C}$ ، ۳۱، شوری ppt ۱۶-۲۰ و  $\text{pH} > 8$  ارتباط معنی داری با میزان شیوع سویه‌های 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  $27-31^{\circ}\text{C}$  بود. به

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  $31^{\circ}\text{C}$  - ۸ (با میانگین  $19/5^{\circ}\text{C}$ ) 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 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 طوری که 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

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	
آب	-	-	-	-	-
رسوب	۱	۱/۸	۳	۵/۴	۴
جمع	۱	۱/۸	۳	۵/۴	۴

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	۴
جمع	۱	۱/۸	۳	۵/۴	۴

## بحث

مطالعه حاضر میزان شیوع ویبریو پاراهمولیتیکوس پاتوژن و غیرپاتوژن را در نمونه‌های محیطی رسوبات و آب‌های 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 نمونه‌های آب و رسوبات دریای خزر در استان گیلان در روزهای اول بهار غیرمعمول بود و میزان شیوع آن مخصوصاً در نمونه‌های آب به مراتب کمتر از 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  $15^{\circ}\text{C}$  درجه بود، بسیار پایین بود و با افزایش دما فراوانی آن افزایش

پیدا کرد. زمانی که دمای آب به بالای  $27^{\circ}\text{C}$  رسید اکثر نمونه‌ها 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 می‌ماند و در اواخر بهار یا اوایل تابستان وقتی که دما به بالای  $15^{\circ}\text{C}$  می‌رسد، در آب منتشر می‌شود. به طوری که در این تحقیق حداکثر آن در مرداد بود، که دما در این روزها بین  $27-31^{\circ}\text{C}$  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 سویه‌های 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 مطالعه‌ای که توسط هلاکو و همکاران در سال ۱۳۸۴ در آبهای ساحلی دریای خزر

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

طی مطالعه ای که به وسیله Siddique و همکاران در سال ۲۰۲۱ در بنگلادش انجام گرفت وجود *tlh* (ژن اختصاصی گونه) جدایه های ویبریو پاراهمولیتیکوس را تایید کرد. حضور ۱۲ ژن های 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) ایزوله ها 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، تیلایپا و نمونه های آب بودند که تا حدی با این تحقیق همخوانی داشت. هیچ ایزوله *trh* مثبتی در نمونه های 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 ۶۰.۲ درصد (۲۱۶/۱۳۰) نمونه مثبت بود (Siddique et al., 2021).

در فرانسه سویه های *tdh+* هرگز شناسایی نشده اند اما شیوع نمونه های *trh+* در حدود بین ۱۰-۳٪ گزارش شده است (Nishibuchi and Kaper, 1995). همچنین بعضی از تحقیقات گزارش کرده اند که فراوانی *tdh* در نمونه های محیطی و غذاهای دریایی در محدوده ۰-۶٪ متغیر است. در تحقیقات انجام گرفته در غذاهای دریایی میزان بیشتری از نمونه های *tdh* مثبت گزارش شده است در Alabana ۱۲٪/۸ صدف-

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 نمونه های 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 ۱۳۷۹ به منظور مطالعه علل احتمالی باکتریایی (ویبریوها) تلفات در کارگاه های میگو حله بوشهر انجام شد، ویبریو پاراهمولیتیکوس در ۴۸ نمونه ۲۹/۲۰٪ مشاهده شد. تست های 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 ۰/۵۵، ۲/۵، ۲۰ و ۳/۲ درصد ثبت شده است. البته به نظر می رسد در ایتالیا این فراوانی غیر معمول است و در 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 واکنش های زنجیره ای پلیمرز به طور جداگانه برای ژنهای *trh* و *tdh* انجام شد. ژنهای فوق در هیچ یک از نمونه ها به طور هم زمان وجود نداشت. همچنین در مطالعه انجام شده در مالزی ۱۵ و ۷٪ نمونه های کشت محیطی و میگوهای فریز شده دارای ژن های همولیزین *tdh* و *trh* بودند. در مطالعه دیگر در مالزی وجود این

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 می‌کند. 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 *TRH* و *TDH* 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

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 *trh* و *tdh* 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 پیش بینی 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 ویرولانسی اختصاصی از قبیل *trh* و *tdh* می‌تواند به شناسایی سویه‌های پاتوژن ویبریو پاراهمولیتیکوس کمک کند.

### 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

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. Veetil. P., Kutty, 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., 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.

# 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.<sup>1\*</sup>

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](mailto:issa_kaam@yahoo.com)