Original Article

Iranian Journal of Medical Microbiology

Iran J Med Microbiol: Volume 8, Number 2 (07-2014)

Journal homepage: www.ijmm.ir

Study the distribution of virulence genes of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from fish, lobster and crab caught from Persian Gulf

Farhad Safarpoor Dehkordi[1], Sahar Hosseini[2], Ebrahim Rahimi[3], Manouchehr Momeni[2], Emad Yahaghi[4], Ebrahim Khodaverdi Darian[5]

1. Department of Food Hygiene, College of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran.
2. Young Researchers and Elites Club, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.
3. Food Hygiene, Colege of Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Shahrekord Branch, Shahrekord, Iran.
4. Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
5. Young Researchers and Elites Club, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran.

Article Information

Article history:
Received:2014/04/17
Accepted:2014/06/21
Available online:2014/08/20

Article Subject:
Medical Bacteriology

IJMM 1393; 8(2): P 1-7

Corresponding author at:

Dr. Farhad Safarpoor Dehkordi

Ph.D Student of Food Hygiene, College of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

Email:
Dr.Farhads@yahoo.com

Abstract

Background and Aim: Annually, many reports of occurrence of food poisoning due to the consumption of sea-foods contaminated with *Vibrio* species have been published. The present study was carried out to study the prevalence rate of *Vibrio parahaemolyticus* and *V. cholera* and evaluation of presence of virulence genes of *V. parahaemolyticus* in sea-food products caught from Persian Gulf.

Materials and Methods: In total, 200 samples of fish, lobster and crab caught from Persian Gulf collected in the summer of 2013 and were transferred to the food quality control laboratory of the Islamic Azad University of Shahrekord. Samples were cultured and the positive specimens were evaluated for presence of bacterial species and virulence genes using Polymerase Chain Reaction.

Results: In total, 34.5% of samples were contaminated with *Vibrio* species. Frequency of *V. cholera* and *V. parahaemolyticus* were 5% and 21%, respectively. 8.5 percent of samples were contaminated with other species of Vibrio. From a total of 42 positive samples of *V. parahaemolyticus*, frequency of *tdh*, *tlh* and *trh* virulence genes were 45.93%, 40.47% and 16.46%, respectively.

Conclusions: The sea-food products of Persian Gulf were infected with *V. parahaemolyticus* and *V. cholera*. Fish samples had the highest prevalence of *V. parahaemolyticus* and *V. cholera*. It seems that, places of fishing and processing and the moods of transportation and distribution of fish, lobster and crab don't have suitable hygiene in Iran.

Key Words: *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae*, Virulence genes, Sea-food products

Copyright © 2014 Iranian journal of medical microbiology. All rights reserved.

How to cite this article:

Safarpourdehkordi F, Hosseini S, Rahimi E, Momeni M, Yahaghi E, Khodaverdi Darian E. Investigate the frequency of virulence genes *Vibrio parahaemolyticus* isolated from fish, lobsters and crabs caught from Persian Gulf. Iran J Med Microbiol. 2014; 8 (2) :1-7

مقاله پژوهشی

مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران

سال ۸ – شماره ۲ – تابستان ۱۳۹۳

Journal homepage: www.ijmm.ir

بررسی فراوانی ژن های ویرولانس *ویبریو پاراهمولیتیکوس* ایزوله شده از ماهی، لابستر و خرچنگ صید شده از خلیج فارس

فرهاد صفرپور دهکردی[۱]، سحر حسینی[۲]، ابراهیم رحیمی[۳]، منوچهر مومنی[۲]، عماد یاحقی[۴]، ابراهیم خداوردی داریان[۵]

۱. گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.
۲. باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران.
۳. دانشیار بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران.
۴. دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، تهران، ایران.
۵. باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، کرج، ایران.

اطلاعات مقاله

تاریخچه مقاله

دریافت:۱۳۹۳/۰۲/۲۰

پذیرش:۱۳۹۳/۰۴/۱۵

انتشار آنلاین:۱۳۹۳/۰۶/۲۶

موضوع:

باکتری شناسی پزشکی

IJMM 1392; 8(2): P 1-7

نویسنده مسئول:

دکتر فرهاد صفرپور دهکردی

دکتری تخصصی بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.

تلفن: ۹۸۹۳۶۵۸۱۹۴۹۱+

پست الکترونیک:

Dr.Farhads@yahoo.com

چکیده

زمینه و اهداف: سالانه گزارشات فراوانی از وقوع مسمومیت های غذایی ناشی از مصرف غذاهای دریایی آلوده به باکتری های گونه *ویبریو*، منتشر می شود. مطالعه حاضر به منظور بررسی میزان شیوع *ویبریو پاراهمولیتیکوس* و *ویبریو کلرا* و ارزیابی حضور ژن های حدت *ویبریو پاراهمولیتیکوس* در فراورده های دریایی صید شده از خلیج فارس، انجام پذیرفت.

مواد و روش کار: در کل ۲۰۰ نمونه ماهی، لابستر و خرچنگ صید شده از خلیج فارس در تابستان سال ۱۳۹۲ جمع آوری و به آزمایشگاه کنترل کیفی مواد غذایی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد انتقال داده شد. نمونه ها کشت داده شدند و نمونه های مثبت از نظر حضور گونه های باکتریایی و ژن های حدت با استفاده از واکنش زنجیره ای پلیمراز مورد ارزیابی قرار گرفتند.

یافته‌ها: در کل ۳٤/٥٪ از نمونه ها آلوده به گونه های *ویبریو* بودند. فراوانی *ویبریو کلرا* و *ویبریو پاراهمولیتیکوس* به ترتیب ٥ و ۲۱ درصد بود. ۸/٥٪ از نمونه ها توسط سایر گونه های *ویبریو* آلوده شده بودند. از کل ٤۲ نمونه مثبت از نظر *ویبریو پاراهمولیتیکوس*، فراوانی ژن های حدت *tdh*، *tlh* و *trh* به ترتیب ٤٥/۹۳٪، ٤۰/٤۷٪ و ۱٦/٤٦٪ بود.

نتیجه‌گیری: فراورده های دریایی خلیج فارس آلوده به گونه های *ویبریو کلرا* و *ویبریو پاراهمولیتیکوس* هستند. نمونه های ماهی بیشترین میزان شیوع *ویبریو پارا همولیتیکوس* و *ویبریو کلرا* را داشتند. به نظر می رسد جایگاه های صید و عمل آوری و نحوه حمل و نقل و توزیع ماهی، خرچنگ و لابستر در ایران از بهداشت مناسبی برخوردار نیست.

کلمات کلیدی : *ویبریو پاراهمولیتیکوس*، *ویبریو کلرا*، ژن های حدت، فراورده های دریایی، خلیج فارس

کپی‌رایت ©: حق چاپ، نشر و استفاده علمی از این مقاله برای مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران محفوظ است.

مقدمه

بخش عمده ای از گونه های جنس *ویبریو* به طور معمول در محیط های آبی در مناطق گرم یا معتدل یافت شده و از آب، رسوبات، پلانکتون ها، انواع ماهیان، میگو، سخت پوستان و هم چنین صدف ها جداسازی شده اند (۲، ۱). از بین ۱۲ گونه ویبریویی که مولد بیماری غذا زاد در انسان هستند، گزارشات فراوانی اهمیت بالاتر گونه های *ویبریو کلرا* و *ویبریو پاراهمولیتیکوس* را نشان داده اند (۲، ۱).

ویبریو کلرا باکتری گرم منفی، خمیده، بی هوازی اختیاری و عامل بیماری وبا است (۲). هر ساله به خصوص در فصول گرم مواردی از بیماری در مناطق جنوبی و مرکزی ایران توسط *ویبریو*

کلرا گزارش می گردد (۲). بررسی ها نشان می دهند که آب های سطحی و غذاهای دریایی از منابع مهم باکتری *ویبریو کلرا* به شمار می روند (۲). میزان مرگ و میر ناشی از ابتلا به *ویبریو کلرا* حدود ۶۰-۳۰٪ برآورد شده است (۴،۳). *ویبریو پاراهمولیتیکوس* نیز باکتری گرم منفی، تخمیر کننده ی بی هوازی و نمک دوست است (۳). قدرت تحمل نمک بالا در این باکتری سبب شده است که جز فلور میکروبی خلیج ها و آب های شور باشد (۴، ۳). *ویبریو پاراهمولیتیکوس* مسئول بروز ۷۰-۵۰٪ از موارد گاستروانتریت و اسهال در کشور های آسیایی است (۶، ۵). *ویبریو پاراهمولیتیکوس*، پس از تهاجم به کولون، باعث ایجاد بیماری می‌شود اما *ویبریو کلرا* بدون تهاجم به روده باریک و تنها با تولید سم (انتروتوکسین)، موجب بروز اسهال می‌گردد (۶، ۵). *ویبریو پاراهمولیتیکوس* عامل عفونتهای متفاوتی در انسان می باشد و به دنبال مصرف غذاهای دریایی مثل نرمتنان، صدف‌ها، ماهیان، میگو، لابستر و خرچنگ آلوده ایجاد گاستروانتریت می نماید (۶، ۵).

سوش های *ویبریو پاراهمولیتیکوس* که از بیماران مبتلا به گاستروآنتریت و اسهال حاد جداسازی شده اند معمولا تولید کننده فاکتور های همولیزین مستقیم مقاوم به حرارت (*tdh*) یا همولیزین وابسته به *tdh* (*trh*) و یا هر دو ژن، بودند (۵-۳). فاکتور بیماری زای دیگر ژن *trh* باکتری است که معمولا به عنوان اوره آز برای باکتری فعالیت می کند (۵-۳). فاکتور *tdh* یک توکسین آمیلوییدی است با دو فعالیت اختلال در زنجیره چربی ها سلول میزبان و دیگری لغو سمیت ناشی از سیستم ایمنی در سلول های باکتری (۵-۳). این فاکتور همچنین نقشی بالقوه در جذب یون آهن بر ای سلول باکتری دارد (۷، ۶). فاکتور *trh* یکی دیگر از همولیزین های باکتری است که با فعال کردن کانال های تراوا نسبت به یون کلر، فعالیتی مشابه فاکتور *tdh* دارد (۸). هرچند ارتباط بین حضور فاکتور های *tdh* و *trh* با پاتوژنیسیته *ویبریو پاراهمولیتیکوس* مورد پذیرش قرار گرفته است اما سوش های زیادی از *ویبریو پاراهمولیتیکوس* از نمونه های بالینی جدا شده اند که هیچ کدام از فاکتور های *tdh* و *trh* را نداشتند (۸-۶). بنابراین بررسی حضور این فاکتور ها برای اثبات بیماری زا بودن یا نبودن سوش های *ویبریو پاراهمولیتیکوس* جدا شده از غذاهای دریایی یا موارد بالینی به نظر ضروری می باشد.

از آنجایی که تا کنون هیچ بررسی ای به منظور تعیین کیفیت میکروبی فراورده های دریایی صید شده از خلیج فارس نپرداخته بود لذا بررسی حاضر را به منظور جداسازی *ویبریو پاراهمولیتیکوس* و *ویبریو کلرا* از نمونه های ماهی، لابستر و خرچنگ صید شده از خلیج فارس و همچنین ارزیابی فراوانی ژن های حدت *tdh*، *trh* و *tlh* ایزوله های *ویبریو پاراهمولیتیکوس*، انجام دادیم.

مواد و روش‌ها

جمع آوری نمونه ها و جداسازی ویبریو

برای انجام بررسی حاضر در کل ۲۰۰ نمونه فراورده دریایی صید شده از سواحل خلیج فارس شامل ۱۰۰ نمونه ماهی، ۶۰ نمونه لابستر و ۴۰ نمونه خرچنگ، با رعایت شرایط کامل بهداشتی از مراکز فروش ماهی و میگو بوشهر در تابستان سال ۱۳۹۲، خریداری شد. تمام نمونه ها یک روز قبل از نمونه گیری صید شده بودند. نمونه ها پس از جمع آوری در عرض ۱۲-۱۰ ساعت در ۴ دمای درجه سلسیوس به مرکز تحقیقات کنترل کیفی و میکروبی مواد غذایی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، انتقال یافتند.

تمام نمونه ها بلافاصله پس از ارسال به آزمایشگاه و آماده سازی، مورد آزمایش میکروبی قرار گرفتند. به این منظور در شرایط آسپتیک با کمک اسکالپل سترون، ۲۵ گرم از گوشت ناحیه شکمی نمونه های ماهی، لابستر و خرچنگ به شکل جداگانه جداسازی و پس از هموژنیزاسیون در محیط Trypticase Soy Broth (TSB) حاوی ۳٪ نمک (pH= ۸/۳) (مرک، آلمان)، برای ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سلسیوس گرم خانه گذاری شدند. در ادامه یک لوپ از محلول گرم خانه گذاری شده به شکل سطحی روی محیط تیوسولفات-سیترات- بایل سوکروز آگار (مرک، آلمان) کشت و برای ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سلسیوس گرم خانه گذاری شدند. پس از طی شدن دوره گرم خانه گذاری، پرگنه های رشد یافته در محیط TCBSA از نظر پرگنه های ویبریو مورد بررسی قرار گرفتند. پر گنه های ویبریو در سطح این محیط به رنگ زرد-خاکستری با تلألو آبی رنگ، نمایان می شوند. *ویبریو پاراهمولیتیکوس* به صورت پرگنه های سبز یا آبی با ضخامت ۳-۲ میلی متر ظاهر می شود. سپس کل پرگنه های های رشد یافته توسط تست های بیوشیمیایی مورد ارزیابی قرار گرفتند. به این منظور ۳-۱ کلنی رشد یافته بر محیط اختصاصی جهت خالص

سازی روی محیط آگار مغذی به آب گوشت قلب و مغز منتقل شد و برای ۶-۴ ساعت در ۳۷ درجه سلسیوس گرم خانه گذاری شد تا کدورتی بیشتر یا برابر OD =۰/۵ در ۶۲۰ نانومتر به دست آید. سپس نمونه ها با استفاده از روش های بیوشیمیایی از جمله تست سیترات، مقاومت به نمک، اوره آز، تست VP، تخمیر قندهای سلوبیوز، سالیسین، گلوکز، ساکارز، آرابینوز، مانیتول، اورنیتین، آرژینین و تست ONPG، مورد بررسی قرار گرفتند.

استخراج DNA و واکنش های زنجیره ای پلیمراز (PCR)

DNA ژنومی با استفاده از کیت استخراج DNA شرکت فرمنتاز لیتوانی و با توجه به دستورالعمل شرکت سازنده، از پر گنه های تیپیک رشد کرده که به مدت یک شب در محیط کشت آب پپتونه قلیایی (مرک، آلمان) در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرم خانه گذاری شده بودند، استخراج شد. تمامی نمونه های DNA تا زمان انجام آزمون PCR، در فریزر ۲۰- سلسیوس نگه-داری شدند. در این بررسی هر یک از نمونه های DNA استخراج شده از نظر حضور گونه‌های *ویبریو کلرا* و *ویبریو پاراهمولیتیکوس* با استفاده ازتست PCR (۹) مورد ارزیابی قرار گرفتند. جفت پرایمر 5'-AAGACCTCAACTGGCGGTA-3' و 5'-GAAGTGTTAGTGATCGCCAGAGT-3' (۲۴۸ جف باز) (اختصاصی ژن *flaE* *ویبریو پاراهمولیتیکوس*) و جفت پرایمر 5'-GCAGCTGATCAAAACGTTGAGT-3' و 5'-ATTATCGATCGTGCCACTCAC-3' (۸۹۷ جفت باز) (اختصاصی ژن *sodB* *ویبریو کلرا*) در واکنش PCR مورد استفاده قرار گرفتند (۱۰). به منظور انجام تمام واکنش های زنجیره ای پلیمراز از دستگاه مسترسایکلر گرادیانت ساخت شرکت اپندورف آلمان در قالب برنامه های PCR استفاده شد.

نمونه هایی که از نظر باکتری *ویبریو پاراهمولیتیکوس* مثبت بودند، با استفاده از یک واکنش PCR دیگر از نظر حضور ژن های حدت *tdh*، *trh* و *tlh* مورد ارزیابی قرار گرفتند (۱۰). به منظور ردیابی ژن های *tdh*، *tlh* و *trh* به ترتیب از جفت پرایمر های 5'-GTAAAGGTCTCTGACTTTTGGAC-3' و 5'-TGGAATAGAACCTTCATCTTCACC-3' (۲۶۹ جف باز)، 5'-AAAGCGGATTATGCAGAAGCACTG-3' و 5'-GCTACTTTCTAGCATTTTCTCTGC-3' (۴۵۰ جفت باز) و جفت پرایمر 5'- TTGGCTTCGATATTTTCAGTATCT-3' و 5'- CATAACAAACATATGCCCATTTCCG-3' (۵۰۰ جف باز)، در قالب یک واکنش PCR چند تایی استفاده شد. حجم هر یک از واکنش های PCR و فرایند های دمایی مورد نیاز در جدول ۱ نشان داده شده اند.

جدول ۱ حجم و فرایند های دمایی مورد استفاده در واکنش های زنجیره ای پلیمراز.

ژن های هدف	برنامه PCR	حجم واکنش (۵۰ میکرولیتر)
ویبریو کلرا و ویبریو پاراهمولیتیکوس	1 cycle: 93 ^{0C} ---------- 15 min. 35 cycle: 92 ^{0C} ---------- 40 s 57 ^{0C} ---------- 60 s 72 ^{0C} ---------- 90 s 1 cycle: 72 ^{0C} ---------- 8 min	5 µL PCR buffer 10X 2 mM $Mgcl_2$ 200 µM dNTP (Fermentas) 1 µM of each primers F & R 1 U Taq DNA polymerase (Fermentas) 2.5 µL DNA template
tdh، *tlh* و *trh*	1 cycle: 95 ^{0C} ---------- 2 min. 30 cycle: 94 ^{0C} ---------- 1 min 58 ^{0C} ---------- 1 min 72 ^{0C} ---------- 1 min 1 cycle: 72 ^{0C} ---------- 8 min	5 µL PCR buffer 10X 2.5 mM $Mgcl_2$ 300 µM dNTP (Fermentas) 0.4 µM of each primers F & R 2 U Taq DNA polymerase (Fermentas) 3 µL DNA template

الکتروفورز محصولات PCR

در نهایت محصولات PCR با استفاده از ژل آگارز ۱/۵ درصد رنگ آمیزی شده با اتیدیوم بروماید، الکتروفورز شدند. برای این منظور، ۱۵ میکرولیتر از محصول PCR را با ۲ میکرولیتر رنگ نشانگر Loading buffer مخلوط و به داخل چاهک ژل منتقل گردید. الکتروفورز نمونه ها در ولتاژ ثابت ۹۰ ولت به مدت ۳۰

دقیقه انجام گرفت و در نهایت محصول الکتروفورز توسط دستگاه قرائت کننده ژل مورد بررسی قرار گرفت.

تجزیه و تحلیل آماری داده ها

داده های حاصل از این مطالعه با استفاده از نرم افزار آماری SPSS (شماره ۱۶) و آزمون های آماری مربع کای و فیشر تجزیه و تحلیل گردید و اختلافات آماری بین حضور گونه های ویبریو و فراوانی انواع فاکتورهای حدت در بین سوش های *ویبریو پاراهمولیتیکوس* با ضریب اطمینان ۹۵٪ (*P*value <0.05) مورد بررسی قرار گرفتند.

یافته‌ها

کل ۲۰۰ نمونه فراورده دریایی صید شده از خلیج فارس پس از کشت در محیط اختصاصی گونه های ویبریو، با استفاده از تکنیک PCR مورد ارزیابی مولکولی قرار گرفتند. فراوانی گونه های ویبریو جداسازی شده از ماهی، لابستر و خرچنگ در جدول ۲ نشان داده شده است. نتایج بررسی حاضر نشان داد که ۳۴/۵ ٪ از فراورده های دریایی صید شده از خلیج فارس در روش کشت باکتریایی آلوده به گونه های ویبریو بودند (شکل ۱). روش PCR نیز نتایج کشت باکتریایی را تایید کرد. نمونه های خرچنگ بیشترین فراوانی گونه های ویبریو را داشتند. با این وجود بررسی های آماری هیچ گونه اختلاف معناداری را برای میزان شیوع گونه های ویبریو بین فراورده های دریایی صید شده نشان ندادند. تست های تکمیلی بیوشیمیایی نشان دادند که فراوانی *ویبریو کلرا* و *ویبریو پاراهمولیتیکوس* در نمونه های بررسی شده به ترتیب ۵٪ و ۲۱٪ بود. نتایج مشابه همچنین توسط روش PCR گزارش گردید. *ویبریو پاراهمولیتیکوس* بیشترین فراوانی را در فراورده های دریایی صید شده از خلیج فارس داشت (۲۱٪). اختلاف آماری معنادار در حد $P < 0.05$ بین میزان شیوع *ویبریو پاراهمولیتیکوس* و *ویبریو کلرا* در فراورده های دریایی صید شده از خلیج فارس مشاهده شد. نمونه های ماهی صید شده بیشترین فراوانی *ویبریو پاراهمولیتیکوس* را داشتند (۲۲٪) اما فراوانی *ویبریو کلرا* در تمام انواع نمونه های صید شده یکسان و برابر با ۵٪ بود. در کل ۸/۵٪ از نمونه های صید شده آلوده به سایر گونه های *ویبریو* بودند.

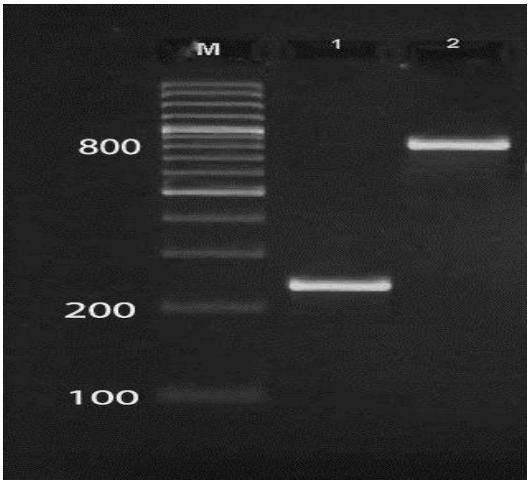
جدول ۲: فراوانی گونه های ویبریو جداسازی شده از نمونه های ماهی، لابستر و میگو صید شده از خلیج فارس.

نوع نمونه	تعداد نمونه اخذ شده	فراوانی گونه های ویبریو (٪)			
		گونه های ویبریو	*ویبریو کلرا*	*ویبریو پاراهمولیتیکوس*	سایر گونه ها
ماهی	۱۰۰	۳۴ (۳۴)	۵ (۵)	۲۲ (۲۲)	۷ (۷)
لابستر	۶۰	۲۰ (۳۳/۳۳)	۳ (۵)	۱۳ (۲۱/۶۶)	۴ (۶/۶۶)
خرچنگ	۴۰	۱۵ (۳۷/۵)	۲ (۵)	۷ (۱۷/۵)	۶ (۱۵)
کل	**۲۰۰**	**۶۹ (۳۴/۵)**	**۱۰ (۵)**	**۴۲ (۲۱)**	**۱۷ (۸/۵)**

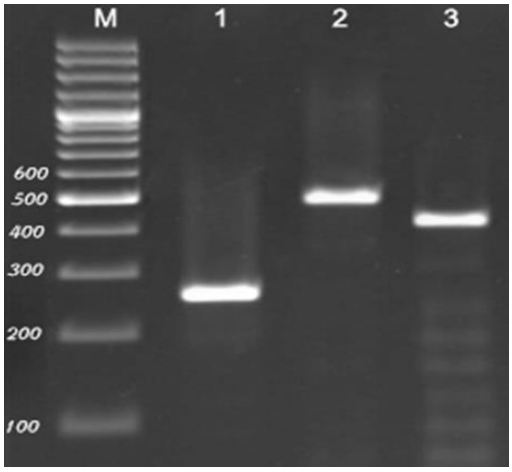
جدایه های *ویبریو پاراهمولیتیکوس* با استفاده از تکنیک PCR از نظر حضور ژن های حدت *tdh*، *trh* و *tlh* مورد ارزیابی قرار گرفتند. فراوانی هر یک از ژن های حدت *ویبریو پاراهمولیتیکوس* در جدول ۳ نشان داده شده است. از کل ۴۲ سوش *ویبریو پاراهمولیتیکوس* ردیابی شده در فراورده های دریایی صید شده از خلیج فارس، فراوانی ژن های حدت *tdh*، *trh* و به ترتیب ۴۵/۹۳٪، ۴۰/۴۷٪ و ۱۶/۴۶٪ بود (شکل ۲). اختلاف معنادار آماری ($P < 0.05$) بین میزان شیوع ژن *tdh* و *trh* مشاهده شد. ژن های بررسی شده بیشترین فراوانی را در *ویبریو پاراهمولیتیکوس* های جداسازی شده از نمونه های ماهی داشتند. در بررسی حاضر به منظور تایید تشخیص، محصولات PCR بدست آمده از هرکدام از نمونه های مثبت از نظر حضور باکتری ها و ژن های حدت، توالی یابی شدند (شرکت فزا پژوه، ایران). سپس توالی های بدست آمده با استفاده از تکنیک BLAST (Basic Logical Alignment Search Tool) مورد ارزیابی قرار گرفتند و با توالی های ثبت شده در بانک ژنی، مقایسه شد. توالی های بدست آمده از نمونه های بررسی حاضر با موارد ثبت شده در بانک ژنی مشابهت داشتند.

جدول ۳: فراوانی ژن های حدت ویبریو پاراهمولیتیکوس جداسازی شده از نمونه های ماهی، لابستر و خرچنگ صید شده از خلیج فارس

نوع نمونه (تعداد)	فراوانی *ویبریو پاراهمولیتیکوس* (٪)	فراوانی ژن های حدت *ویبریو پاراهمولیتیکوس* (٪)		
		tdh	*tlh*	*trh*
ماهی (۱۰۰)	(۲۲) ۲۲	(۴۵/۵۴) ۱۲	(۴۵/۴۵) ۱۰	(۱۸/۱۸) ۴
لابستر (۶۰)	(۲۱/۶۶) ۱۳	(۳۸/۴۶) ۵	(۳۸/۴۶) ۵	(۱۵/۳۸) ۲
خرچنگ (۴۰)	(۱۷/۵) ۷	(۲۵/۵۷) ۲	(۲۵/۵۷) ۲	(۱۴/۲۸) ۱
کل (۲۰۰)	**(۲۱) ۴۲**	**(۴۵/۲۳) ۱۹**	**(۴۰/۴۷) ۱۷**	**(۱۶/۶۶) ۷**



شکل ۱ واکنش زنجیره ای پلیمراز جهت ردیابی همزمان *ویبریو کلرا* و *ویبریو پاراهمولیتیکوس* در نمونه های ماهی، خرچنگ و لابستر صید شده از خلیج فارس. M: مارکر ۱۰۰ جفت بازی، ۱: نمونه مثبت برای ویبریو کلرا و ۲: نمونه مثبت برای *ویبریو پاراهمولیتیکوس*.



شکل ۲: واکنش زنجیره ای پلیمراز جهت ردیابی همزمان ژن های حدت trh، tlh و tdh *ویبریو پاراهمولیتیکوس* در نمونه های ماهی، خرچنگ و لابستر صید شده از خلیج فارس. M: مارکر ۱۰۰ جفت بازی، ۱: نمونه مثبت برای ژن tdh و ۲: نمونه مثبت برای ژن trh و ۳: نمونه مثبت برای ژن tlh.

بحث

آمار بالای صید فراورده های دریایی از خلیج فارس و همچنین آمار مصرف روزافزون این فراورده ها توسط خانواده های ایرانی سبب می شوند تا اهمیت بهداشتی این فراورده ها بیش از پیش مورد توجه قرار گیرد. بنابراین بررسی حاضر که به منظور مطالعه شیوع *ویبریو پاراهمولیتیکوس* و ژن های حدت *trh*، *tlh* و *tdh* انجام پذیرفت، از جنبه بهداشت عمومی اهمیت بسیار بالایی دارد. بررسی حاضر نشان داد که نمونه های ماهی، لابستر و خرچنگ صید شده از خلیج فارس بار آلودگی میکروبی نسبتا بالایی از نظر باکتری های گونه *ویبریو* و خصوصا *ویبریو پاراهمولیتیکوس* داشتند. بنابراین مصرف این فراورده های دریایی به شکل خام می تواند مشکل آفرین باشد. نتایج مشابه در بررسی های فراوان دیگری نیز گزارش شده است (۱۵-۱۱). در بررسی حاضر *ویبریو پاراهمولیتیکوس* بیشترین میزان شیوع را در نمونه های صید شده داشت (۲۱٪). با این وجود ۵٪ و ۸/۵٪ از نمونه های صید شده به ترتیب آلوده به *ویبریو کلرا* و سایر گونه های *ویبریو* بودند. به احتمال زیاد دلیل بالا بودن میزان شیوع *ویبریو پاراهمولیتیکوس* در نمونه های بررسی شده، قدرت بالاتر این گونه در تحمل نمک آب خلیج فارس بوده است. از طرفی بررسی های پیشین نشان داده اند که برخی از گونه های *ویبریو* در مناطق جغرافیایی خاصی به شکل آندمیک حضور دارند (۱۵-۱۱). *ویبریو پاراهمولیتیکوس* در مطالعات انجام گرفته در ایران به عنوان فلور میکروبی غالب آب های خلیج فارس گزارش شده است (۱۲، ۱۳، ۱۶، ۱۷).

در این زمینه بررسی های متفاوتی از سایر نقاط جهان از جمله انگلیس، پرتقال، فرانسه و یونان انجام پذیرفته است (۱۸). میزان شیوع *ویبریو پاراهمولیتیکوس* در نمونه های ماهی صید شده از پرتقال و یونان به ترتیب ۳۵٪ و ۱۴٪ گزارش شد.

اما هیچ گونه نمونه مثبتی از نظر حضور *ویبریو پاراهمولیتیکوس* در نمونه های ماهی صید شده از انگلیس و فرانسه یافت نشد. نتایج بررسی های ذکر شده در انگلیس، پرتقال، فرانسه و یونان نشان می دهد که هر گونه *ویبریو* در یک منطقه خاص فراوانی بیشتری دارد. میزان شیوع *ویبریو پاراهمولیتیکوس* در مطالعات انجام پذیرفته در ایران شامل بررسی های Shirazi و همکاران (تهران) (**۱۶**) و Jalali jafari و همکاران (اصفهان) (**۱۷**) به ترتیب ۱۰-۵ درصد و ۳/۹٪ گزارش شده است که از نتایج بررسی حاضر به مراتب کمتر است. بررسی انجام پذیرفته در کشور ایتالیا (**۱۴**) میزان شیوع بسیار بالاتری را برای گونه های *ویبریو* و خصوصا *ویبریو پاراهمولیتیکوس*، گزارش کرده است (۳۲/۶٪). احتمالا شیوع فصلی این باکتری و نوع نمونه ها مورد بررسی دلیل اصلی این اختلاف در میزان شیوع در ایران و ایتالیا بوده اند.

در کل ۵٪ از نمونه در بررسی ما آلوده به *ویبریو کلرا* بودند که بسیار قبال توجه است. Hill و همکاران (**۷**) وقوع شدیدی از باکتری *ویبریو کلرا* را در نمونه های آب و غذاهای دریایی در آمریکا نشان دادند. نام بردگان فراوانی بالای ژن *ctxA* را در *ویبریو کلرا* های جداسازی شده از نمونه های فراورده های غذ ایی، عامل اصلی بروز بیماری دانستند. بررسی دیگری در تایلند (**۱۹**) نشان داد که میزان شیوع گونه های *ویبریو کلرا* و *ویبریو پاراهمولیتیکوس* در غذاهای دریایی به ترتیب ۱۰۰٪ و ۸۰٪ بوده است که به مراتب از نتایج بررسی ما بیشتر است. مطالعه پیشین در حیدرآباد (**۲۰**) نشان داد که از کل ۳۵ نمونه ماهی، ۳۵ نمونه خرچنگ و ۳۵ نمونه میگو جمع آوری شده، میزان شیوع *ویبریو کلرا* به ترتیب ۴۵/۷۱٪، ۵۷/۱۴٪و ۱۷/۱۴٪ بوده است که بسیار قابل توجه است.

مقایسه نتایج بررسی های مختلف نشان دهنده اختلاف فاحشی در فراوانی آلودگی به گونه های مختلف *ویبریو* در فرآورده های دریایی است که این مسأله را می توان به نوع نمونه ها، فصل نمونه گیری، شرایط اکولوژیک، آلودگی محیطی، تفاوت گونه ای و هم چنین تفاوت چشمگیر در کیفیت شرایط بهداشتی از زمان صید تا عرضه نسبت داد.

علاوه بر آلودگی اولیه نمونه های ماهی، لابستر و خرچنگ صید شده از خلیج فارس، آلودگی های ثانوبه نیز می توانند نقش مهمی در افزایش میزان شیوع گونه های *ویبریو* در این فراورده ها داشته باشند. احتمالا سکوهای صید و عمل آوری و همچنین مراکز فروش و توزیع فراورده های دریایی و خصوصا ماهی در بندر بوشهر از بهداشت مناسبی برخوردار نیستند. دست های آلوده کارکنان مراکز یاد شده، عدم رعایت بهداشت فردی و تماس فراورده های دریایی صید شده با سطوح آلوده احتمالا از موارد اصلی آلودگی های ثانویه به حساب می آیند. یکی دیگر از دلایل اصلی آلودگی نمونه ها به گونه های *ویبریو* احتمالا مصرف آب آلوده برای شست و شوی این فراورده های قبل از فروش بوده است. از طرفی به احتمال زیاد فرایند برودتی مناسبی بر روی این فراورده ها انجام نپذیرفته است.

بررسی حاضر نشان داد که اکثر سویه های *ویبریو پاراهمولیتیکوس* جداسازی شده از نمونه های ماهی، لابستر و خرچنگ دارای ژن های حدت *tdh* (۴/۲۳٪)، *tlh* (۴۰/۴۷٪) و *trh* (۱۶/۶۶٪) بودند. حضور این ژن ها تایید کننده توانایی بالای بیماری زایی باکتری است. نتایج مشابه توسط Yang و همکاران (**۲۱**) و Mahmud و همکاران (**۲۲**)، گزارش شده است. Mahmud و همکاران (**۲۲**) ۶۰۰۰ سویه *ویبریو پاراهمولیتیکوس* را از آب دریا و جلبک های دریایی جدا کردند که ۱۸ نمونه از آن ها حامل ژن سمی یا توکسیژنیک بودند. Ottaviani و همکاران (**۱۴**) مطالعه ای را بر روی غذاهای دریایی صید شده از دریای آدریاتیک، انجام دادند. نتایج بررسی آن ها نشان می دهد که از ۱۴۴ گونه *ویبریو پاراهمولیتیکوس*، ۳۵ سویه (۲۴/۳۰٪) *ویبریو پاراهمولیتیکوس* پروتئاز مثبت بودند. آن ها وجود ژن های *tdh* و *trh* را در این نمونه ها ثابت کردند و نشان دادند که این ژن ها باعث همولیز شدن گلبول قرمز شده و سیستم ایمنی را تضعیف می کند. بر طبق این گزارش *ویبریو پاراهمولیتیکوس* به دلیل داشتن ژن های حدت، دارای قدرت بیماری زایی بیشتری در اثر خوردن فرآورده های خام و نپخته آلوده، می باشد (**۱۴**). بنابراین حضور این ژن های حدت در باکتری *ویبریو پاراهمولیتیکوس* نقش به سزایی در بیماری زایی باکتری دارد.

در کل بررسی حاضر اطلاعات بسیار روشن و ارزشمندی را در مورد بار آلودگی میکروبی فراورده های ماهی، لابستر و خرچنگ صید شده از خلیج فارس ارائه می دهد. فرائوانی بالای *ویبریو پاراهمولیتیکوس* در این محصولات و شیوع بالای ژن های حدت *trh*، *tlh* و *tdh* در سوش های جدا شده از ماهی، لابستر و خرچنگ نشان می دهد که مصرف این فراورده ها به شکل خام

یا نیم پز می تواند سبب بروز مشکلات گوارشی مانند دل درد، اسهال و گاستروانتریت شود. نویسندگان بررسی حاضر پخت صحیح فراورده های دریایی را بهترین راه جلوگیری از ابتلا به ویبریوزیس ناشی از *ویبریو پاراهمولیتیکوس*، نی دانند. نظارت صحیح بهداشتی در مراکز صید و توزیع فراورده های دریایی نیز می تواند از بار آلودگی این فراورده ها بکاهد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان بررسی حاضر از تمامی پرسنل کاردان مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، میکروبیولوژی و کنترل کیفی مواد غذایی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد و همچنین کارکنان مراکز صید و توزیع ماهی و میگو در بندر بوشهر، کمال تشکر و قدردانی را دارند.

تعارض منافع:

بین نویسندگان هیچ تعارضی وجود ندارد.

References

1.Mead PS, Slutsker L, Dietz V, Mccaig LF, Bresee JS, Shapiro C, et al. Food-related illness and death in the United States. Emerg Infect Dis. 1999;5(5):607-625.
2.Beuchat LR. Combined effects of water activity, solute, and temperature on the growth of Vibrio parahaemolyticus. Appl Microbiol. 1974;27(6):1075-1080.
3.Nishibuchi M, DePaola A. Foodborne pathogens. 2nd ed. United Kingdom: Horizon Scientific Press; 2005. P. 114 168. 2005.
4.Wong HC, Chen MC, Liy SH, Liu DP. Incidence of highly genetically diversified Vibrio parahaemolyticus in seafood imported from Asian countries. Int J Food Microbiol. 1999;52(3):181-188.
5.Dalsgaard A, Forslund A, Tam NV, Vinh DX, Cam PD. Cholera in Vietnam: Changes in genotypes and emergence of class I integrons containing aminoglycoside resistance gene cassette in Vibrio cholera O1 strains isolated from 1979 to 1996. J Clin Microbiol. 1999;37(3):734-741.
6.Broberg CA, Calder TJ, Orth K. *Vibrio parahaemolyticus* cell biology and pathogenicity determinants. Microbe Infect. 2011;13(12-13):992–1001.
7.Shirai H, Ito H, Hirayama T, Nakamoto Y, Nakabayashi N, Kumagai K, et al. Molecular, epidemiologic evidence for association of thermostable direct hemolysin (TDH) and TDH-related hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus* with gastroenteritis. Infect Immun. 1990;58(11):3568– 3573.
8.Matsuda S, Kodama T, Okada N, Okayama K, Honda T, Iida T. Association of *Vibrio parahaemolyticus* thermo stable direct hemolysin with lipid raftsis essential for cytotoxicity butn ot hemolytic activity. Infect Immun. 2010;78(2):603–610.
9.Tarr CL, Patel JS, Puhr ND, Sowers EG, Bopp CA, Strockbine NA. Identification of Vibrio isolates by a multiplex PCR assay and rpoB sequence determination. J Clin Microbiol. 2007;45(1):134-40.
10.Bej AK, Patterson DP, Brasher CW, Vickery MCL, Jones DD, Kaysner CA. 1999. Detection of total and hemolysin producing *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish using multiplex PCR amplification of *tlh*, *tdh* and *trh*. J Microbiol Method. 1999;36(3):215–225.
11.Farmer JJ, Janda JM, Birkhead K. In: Manual of clinical microbiology. Murray PR, Baron EJ, Jorgense JH, Pfaller MA, Yolken RH, editors. 8th ed. Washington DC: American Society for Microbiology; 2003. P. 706-718. 2003.
12.Rahimi, E. Ameri, M. Doosti, A. and Gholampour, A.R. 2010. Occurrence of toxigenic Vibrio parahaemolyticus strain in shrimp in Iran. Foodborne Pathog Dis. 2010;7(9):1107-1111
13.Raissy M, Moumeni M, Ansari M, Rahimi E. Antibiotic resistance pattern of some Vibrio strains isolated from seafood. Iran J Fish Sci. 2012;11(3):618-626.
14.Ottaviani D, Santarelli S, Bacchiocchi S, Masini L, Ghittino C, Bacchiocchi I. Presence of pathogenic Vibrio parahaemolyticus strains in mussels from the Adriatic Sea, Italy. Food Microbiol. 2005;22(6):585-590.
15.Su YC, Liu C. Vibrio parahaemolyticus: A concern of sea food safety. Food Microbiol. 2007;24(6):549- 558.
16.Shirazi MH, Ranjbar R, Salari MH, Bagheri Tirtash Y, Najafi A, Sadeghifard, N. Isolation of Vibrio parahaemolyticus from fish in Tehran and their antimicrobial resistance. Iranian J Infect Diss Trop Med. 2007;11(35):65-68.
17.Jalali jafari B, Barzegar dolatabadi M. Shrimp health management. 2nd ed. Tehran: Noorbakhsh Publications; 2009.
18.Su YC, Liu C. Vibrio parahaemolyticus: A concern of sea food safety. Food Microbiol. 2007;24(6):549- 558.
19.Senachai P, Chomvarin C, Namwat W, Wongboot W, Wongwajana S, Tangkanakul W. Application of tetraplex PCR for detection of Vibrio cholerae, V. parahaemolyticus, V. vulnificus and V. mimicus in cockle. Southeast Asian J Trop Med Publ Health. 2013;44(2):249-58.
20.Maheshwari M, Krishnaiah N, Ramana V. Evaluation of Polymerase Chain Reaction for the detection of Vibrio cholerae in Contaminants. Ann Biol Res. 2011;2(4):212-217.
21.Yang ZQ, Jiao XA, Zhou XH, Cao GX, Fang WM, Gu RX. Isolation and molecular characterization of *Vibrio parahaemolyticus* from fresh, low-temperature preserved, dried, and salted seafood products in two coastal areas of eastern China. Int J Food Microbiol. 2008;125 (3):279-285.
22.Mahmud Z, Kassu A, Mohammad A, Yamato M, Bhuiyan NA, Balakrish Nair G, et al. Isolation and molecular characterization of toxigenic *Vibrio parahaemolyticus* from the kii Channel, Japon. Microbiol Res. 2006;161(1):25-37.