ردیابی *ویبریو پاراهمولیتیکوس* در نمونه‌های میگوی جمع آوری شده از شهر اردبیل به روش PCR

داریوش عسگرپور[1*]، مهدی قاسمی[2]، ماهرخ بهرامی[3]

۱. دانش آموخته کارشناسی ارشد میکروب شناسی مواد غذایی، گروه میکروب شناسی و ویروس شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان، ایران.

۲. گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم، واحد اردبیل، دانشگاه آزاد اسلامی، اردبیل، ایران.

۳. دانش آموخته کارشناسی میکروبیولوژی، دانشکده علوم، واحد اردبیل، دانشگاه آزاد اسلامی، اردبیل، ایران.

[*]نویسنده مسئول: *D._asgarpoor@zmus.ac.ir*

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۵/۲۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۷/۲۱

چکیده

ویبریو پاراهمولیتیکوس از خانواده ویبریوناسه یک باکتری هالوفیل گرم منفی میله‌ای شکل، غیراسپور زا و دارای تاژک قطبی و متحرک می باشد که به عنوان عامل گاستروآنتریت ناشی از مصرف غذا های دریایی آلوده در سراسر جهان شناخته می شود. این باکتری سه بیماری عمده بالینی در انسان ایجاد می کند به‌طوری‌که علاوه برگاستروآنتریت می تواند باعث ایجاد عفونت زخم و سپتی سمی شود. هدف از انجام این مطالعه، بررسی میزان آلودگی به *ویبریو پاراهمولیتیکوس* در نمونه‌های میگوی جمع آوری شده از شهر اردبیل بود. در این مطالعه توصیفی مقطعی، ۸۰ نمونه میگوی تازه از فروشگاه‌های مختلف عرضه کننده مواد غذایی دریایی شهر اردبیل جمع آوری شد. نمونه‌ها بلافاصله هموژن و در محیط TCBS آگار کشت داده شده و سویه های جداسازی شده مورد آزمون‌های بیوشیمیایی قرار گرفتند. DNA کلنی‌های تیپیک *ویبریو پاراهمولیتیکوس* استخراج و ژن *Vp-toxR* به عنوان شاخصی جهت شناسایی *ویبریو پاراهمولیتیکوس* با روش PCR مورد بررسی قرار گرفت. نتایج PCR نشان داد از ۸۰ نمونه میگوی جمع آوری شده، ۱۱ نمونه (۱۳/۷۵ درصد) حامل ژن Vp-toxR بودند. بر اساس نتایج بدست آمده میگو مخزن مهمی برای این باکتری بوده و از آن‌جا که می‌تواند حامل باکتری زنده و عفونی کننده باشد لذا مصرف غیر بهداشتی این اغذیه دریایی به‌عنوان خطر باالقوه برای بهداشت و سلامت عمومی محسوب می‌گردد.

واژگان کلیدی: *ویبریو پاراهمولیتیکوس*، میگو، PCR.

مقدمه

از دیرباز تاکنون تحقیقات زیادی در مورد سلامتی غذا صورت گرفته است؛ با این حال حتی با وجود روش‌های جدید کاهش آلودگی مواد غذایی به عوامل میکروبی بیماری‌زا، شیوع رو به افزایش مسمومیت های غذایی یکی از مهم ترین مسائل در جوامع بشری به شمار می آید. از جمله باکتری های مهم که در بروز مسمومیت های اغذیه دریایی آلوده دخیل است، *ویبریو پاراهمولیتیکوس* [1] می باشد (Su and Liu, 2007). *ویبریو پاراهمولیتیکوس* از خانواده ویبریوناسه یک باکتری هالوفیل گرم منفی میله‌ای شکل، غیراسپورزا و دارای تاژک قطبی و متحرک می باشد که به عنوان عامل گاستروآنتریت ناشی از مصرف غذاهای دریایی آلوده در سراسر جهان شناخته می شود (Baumann and Schubert, 1984). این باکتری مثل سایر جنس ویبریوها به‌صورت باسیل خمیده می باشد که بدون اسپور بوده و عرض آن ۰/۸-۰/۵ میکرون و طول آن ۲/۶-۱/۴ میکرون می باشد (Drake et al., 2007). *ویبریو پاراهمولیتیکوس* اولین بار در سال ۱۹۵۰ در کشور ژاپن از گاستروآنتریت ناشی از مصرف غذای دریایی آلوده گزارش شده است (Ceccarelli et al., 2013). این باکتری سه بیماری عمده بالینی در انسان ایجاد می کند که علاوه بر گاستروآنتریت که شایع ترین بیماری ایجاد شده توسط این باکتری است، می تواند باعث ایجاد عفونت زخم و سپتی سمی شود. علایم ناشی‌از گاستروآنتریت ایجاد شده توسط *ویبریو پاراهمولیتیکوس* شامل اسهال، کرامپ های شکمی، استفراغ، تهوع، سردرد و تب مختصر است (Nair et

[1] *Vibrio parahaemolyticus*

al., 2007; Drake et al., 2007; Wang et al., 2014). گاهی اسهال حالت خونی پیدا می کند که تحت عنوان گوشتابه ای (Meat washed) نامیده می-شود. در این حالت مدفوع حالت آبکی قرمز رنگ به خود می گیرد که بر خلاف دیسانتری گونه های شیگلایی دیده می‌شود (Drake et al., 2007). *ویبریو پاراهمولیتیکوس* را به فراوانی از انواع مختلف فراورده های دریایی مانند ماهی، میگو، صدف خوراکی، خرچنگ، ساردین، لابستر، ماکرل و اختاپوس جداسازی کرده‌اند (Liston. 1990). از میان این فراورده‌های دریایی میگو یکی از مهم ترین محصولات شیلات در قسمت های جنوب و جنوب شرقی آسیا به شمار می رود که آن را به عنوان شاخص مهم اقتصادی نیز در نظر می‌گیرند. سیستم تغذیه‌ای صافی خواری[1] در میگو وجود ندارد لذا باکتری *ویبریو پاراهمولیتیکوس* موجود در بافت میگو در مقایسه با نرم‌تنان کمتر است (Robert-Pillot et al., 2010). بر اساس گزارش ها، نرخ آلودگی میگو به *ویبریو پاراهمولیتیکوس* رو به افزایش بوده، لذا حضور این باکتری در میگو به عنوان فاکتور خطرناک می تواند بیماری مرتبط با *ویبریو پاراهمولیتیکوس* را به دنبال داشته باشد (Sani et al., 2013, Wang et al., 2014). مطابق دستورالعمل های سازمان غذا و دارو ایالت متحده امریکا (FDA) تعداد باکتری *ویبریو پاراهمولیتیکوس* در هر گرم از ماده غذایی دریایی باید کمتر از 10^4 سلول و یا حداکثر 10^3 cfu/g باشد (Miliotis. 2005). مهم ترین معیار هایی که جهت کنترل و پیشگیری از عفونت های این باکتری در میگو توصیه شده عبارتند از: رعایت نکات بهداشتی، شست و شوی مناسب میگو با آب شرب، استفاده از یخ های تهیه شده از آب شرب، استفاده از کلر به میزان دو تا هفت قسمت در میلیون در آب شست و شو و آب مورد استفاده در تهیه یخ در نگهداری کوتاه مدت میگو

[1] Filter feed

(Rahimi et al., 2001). تجزیه و تحلیل نمونه های میگو به روش مستقیم PCR میزان تشخیص *ویبریو پاراهمولیتیکوس* را بین 10^4 cfu/g و 10^3cfu/g نشان داده است. بنابراین ردیابی و تشخیص این باکتری در نمونه های میگو به روش آنالیز مستقیم [2] در مقایسه با روش های مرسوم بیوشیمیایی و فیزیکی مناسب می‌باشد (Robert-Pillot et al., 2010). بر اساس گزارش ها، نرخ آلودگی میگو به *ویبریو پاراهمولیتیکوس* سال به سال افزایش می یابد و در فصول گرم سال نیز میزان آلودگی حتی به ۹۰ درصد افزایش می‌یابد؛ بنابراین حضور این باکتری در میگو یک فاکتور خطرناک تلقی می شود. به‌طوری‌که ارزیابی مخاطرات میکروبی میگوی پخته شده نیز نشان داده است که در برخی موارد مصرف میگوی پخته شده نیز می‌تواند بیماری مرتبط با *ویبریو پاراهمولیتیکوس* را به دنبال داشته باشد (Wang et al., 2014). در سال های اخیر با افزایش شیوع جهانی عفونت های *ویبریو پاراهمولیتیکوس*، این ارگانیسم به عنوان عامل ۷۰-۵۰ درصد از موارد عمده‌ی گاستروآنتریت ناشی از مصرف غذا های دریایی خام و یا نپخته را به خود اختصاص داده است (Wang et al., 2013). امروزه به‌دلیل مقاومت باکتری ها نسبت به کلاس‌های آنتی بیوتیکی که این باکتری نیز از این امر مستثنی نیست و با توجه به اهمیت موضوع در سلامت عمومی، این تحقیق با هدف تشخیص و ردیابی سریع *ویبریوپاراهمولیتیکوس* در نمونه های میگوی عرضه شده در فروشگاه‌های مختلف شهر اردبیل صورت پذیرفت.

مواد و روش کار

جمع آوری نمونه و هموژن کردن آن‌ها

جهت انجام این مطالعه، ۸۰ نمونه میگوی تازه به طور تصادفی از فروشگاه های عرضه کننده اغذیه دریایی در مناطق مختلف شهر اردبیل در طی خرداد ماه تا اوایل مهر ۱۳۹۵جمع‌آوری و در دمای یک تا چهار درجه

[2] Direct analysis

سانتی‌گراد در ظرف حاوی یخ خشک به آزمایشگاه منتقل شدند. نمونه های میگو بلافاصله پس از انتقال به آزمایشگاه، بوسیله دستگاه هموژنایزر (Heidolph, Schwabach, Germany) هموژن شدند به‌طوری‌که ۲۵ گرم از نمونه میگو در ۲۲۵ میلی لیتر محلول نمکی (سرم فیزیولوژی) ۳ الی ۳/۵ درصد با pH= ۸/۶ اضافه شد و محلولی هموژنیزه از ماده غذایی در مدت سه دقیقه با ۱۰۰۰ ×rpm ۱۵-۵ بدست آمد.

کشت و آزمون‌های بیوشیمیایی

نمونه های میگوی هموژن شده، در محیط TCBS آگار[1] (MERCK, Darmstadt, Germany) کشت داده شدند و به مدت ۲۴-۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه گذاری شدند. بعد از اتمام زمان انکوباسیون، کلنی‌های دو الی سه میلیمتری سبز یا سبز-آبی انتخاب و به محیط تریپتیک سوی آگار(TSA)[2] (MERCK, Darmstadt, Germany) حاوی ۳ درصد NaCl منتقل شدند و ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری شدند. نهایتاً ایزوله‌های باکتریایی از طریق آزمون‌های گرم، اکسیداز، کاتالاز، تخمیر قند و TSI مورد آزمایش قرار گرفتند.

استخراج DNA ژنومیک *ویبریو پاراهمولیتیکوس* به روش جوشاندن

ایزوله های باکتریایی *ویبریو پاراهمولیتیکوس* به مدت یک شبانه روز در محیط Luria-Bertani (LB) broth در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرم‌خانه گذاری شدند. ۱/۵ میلی لیتر از سوسپانسیون میکروبی به مدت چهار دقیقه با دور ۵۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شدند. سپس مایع رویی دور ریخته شد و روی رسوب باکتری ۱۰۰ میکرولیتر بافر TE اتوکلاو شده اضافه گردید. مجدداً سانتریفیوژ به مدت چهار دقیقه با دور rpm ۸۰۰۰ صورت گرفت تا رنگ محیط کشت از سوسپانسیون حذف گردد. عمل شست و شو سه بار تکرار شد. پس از اتمام عمل شست و شو، مایع رویی دور ریخته شد و روی رسوب باکتری ۱۰۰ میکرولیتر بافر TE اتوکلاو شده اضافه گردید. سوسپانسیون‌های بدست آمده، ابتدا به مدت ده دقیقه به بن ماری جوش و سپس به مدت پنج دقیقه به یخ منتقل شدند. این عمل سه بار تکرار شد. نمونه‌های فوق به مدت پنج دقیقه با دور rpm ۱۲۰۰۰ سانتریفیوژ شدند. سپس مایع رویی که حاوی DNA ژنومیک باکتری است، در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد برای مصارف بعدی نگهداری شدند. ژنوم سویه *ویبریوپاراهمولیتیکوس* ATTC 17802 خریداری شده از مرکز ملی دخایر ژنتیکی و زیستی ایران نیز استخراج گردید تا به عنوان کنترل مثبت در روش PCR به کار رود.

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز

. به منظور شناسایی *ویبریو پاراهمولیتیکوس*های جداسازی شده از میگو به روش PCR از ژن (Toxin operon gene) *vp-toxR* با اندازه ۳۶۸ bp که اختصاصی *ویبریو پاراهمولیتیکوس* می باشد، استفاده گردید. به منظور ردیابی این ژن از پرایمرهای زیر استفاده شد (Kim et al., 1999).

toxR-F: 5'-GTCTTCTGACGCAATCGTTG -3'

toxR-R: 5'ATACGAGTGGTTGCTGTCATG-3'

مقدار و غلظت مواد مورد نیاز برای انجام PCR ژن *toxR* و برنامه دمایی دستگاه ترمال سایکلر (Analytica Jena, AB Germany) در جدول ۱ آمده است.

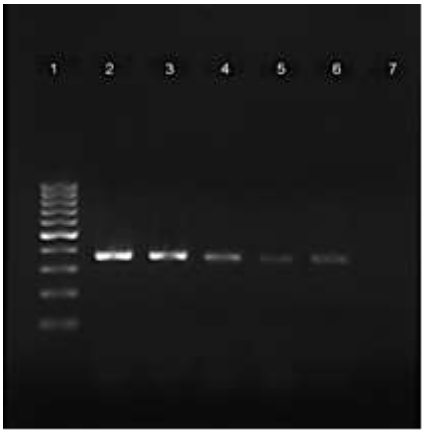
[1] Thiosulphate citrate bile salt sucrose
[2] Tryptic soy agar

جدول ۱: برنامه دمایی دستگاه ترمال سایکلر جهت تکثیر ژن *toxR*، مقدار

برنامه	نوع عملیات	درجه حرارت	زمان	تعداد سیکل
۱	Primary Denaturation	۹۴ °	۵ دقیقه	۱
۲	Denaturation	۹۴ °	۱ دقیقه	۳۰
۳	Annealing	۵۷ °	۱ و نیم دقیقه	
۴	Elongation	۷۲ °	۱ و نیم دقیقه	
۵	Final Elongation	۷۲ °	۸ دقیقه	۱

نتایج

فراوانی *ویبریو پاراهمولیتیکوس* در نمونه های میگـو از مجموع ۸۰ نمونه میگوی کشت داده شده روی محـیط TCBS آگار تعـداد ۳۵ نمونـه (۴۳/۷۵ درصـد) دارای کلنی های سبز یا سبز-آبی با اندازه دو الـی سـه میلـی متر مشخص شد. نتایج آزمون های بیوشـیمیایی نشـان داد کـه از ایـن ۳۵ نمونـه تعـداد ۱۵ نمونـه (۴۲/۸۵ درصد) به لحاظ حضور باکتری *ویبریو پاراهمولیتیکوس* مثبت بودند. فراوانی ژن *Vp-toxR* در سویه‌های *ویبریو پاراهمولیتیکوس* جداسـازی شـده از میگـو بـه منظـور تأیید تشخیص *ویبریو پاراهمولیتیکوس*، ژن *toxR* (ژن حفاظت شده در سویه های *ویبریـو پـاراهمولیتیکوس*) به عنوان مارکر مورد ارزیابی قـرار گرفـت. از میـان ۱۵ جدایه شناسایی شده تعداد ۱۱ نمونـه (۷۳/۳۳ درصـد) حامل این ژن بودند. در مجمـوع از ۸۰ نمونـه میگـوی جمع آوری شده، ۱۱ نمونه (۱۳/۷۵ درصد) حامـل ژن *toxR* بودند (تصویر ۱).



تصویر۱: محصول PCR ژن *toxR* بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد

چاهک ۱: مارکر (100 bp DNA Ladder)، چاهک ۲: کنترل مثبت ، چاهک ۳، ۴، ۵ و ۶: نمونه های حامل ژن *toxR*، چاهک ۷: کنترل منفی (فاقد DNA)

بحث

در این تحقیق، آلـودگی نمونـه هـای میگـوی چنـدین فروشـگاه عرضـه کننـده اغذیـه دریـایی بـه *ویبریـو پاراهمولیتیکوس* مورد بررسی قرار گرفت. هرچند سویه های *ویبریو پاراهمولیتیکوس* جداسازی شده از میگو به لحاظ فنوتیپی و آزمون های بیوشیمیایی مورد آزمایش قرار گرفتند، با این وجود نتایج بدست آمـده نشـان داد که روش PCR نسبت به سایر تکنیک ها در تشـخیص این پاتوژن در اغذیه دریایی دقیـق تـر مـی باشـد. بـه-طوری‌که در این مطالعه نتایج آزمون های بیوشـیمیایی نشان دهنـده ایـن بـود کـه تعـداد ۱۵ نمونـه (۱۸/۷۵ درصد) از ۸۰ نمونه آلـوده بـه *ویبریـو پـاراهمولیتیکوس* بوده است و این در حالی است که ۱۱ نمونه در آزمـون مولکولی، بعنوان نمونه مثبت گزارش می‌شود.

در سال های اخیر این ارگانیسم مسئول تعداد زیادی اپیدمی های مسمومیت های غذایی در ایالات متحده شناخته شده است. به‌خصوص در سال‌های ۱۹۹۷ و ۱۹۹۸ که به عنوان یک عامل پاتوژن مهم و یک خطر جدی در زمینهٔ بهداشت عمومی معرفی شد (Miliotis, 2005). شواهد حاکی از آن است که گاستروانتریت ناشی از *ویبریو* از متداول ترین مسمومیت های غذایی در ژاپن است. در سال ۲۰۰۱ شیوع *ویبریو پاراهمولیتیکوس* در ماهی در کشور پرتقال ۳۵ درصد و در یونان ۱۴ درصد گزارش شد این درحالی است که نمونه مثبت در انگلستان و فرانسه دیده نشد (Davies et al., 2001). روش های مختلفی برای شناسایی *ویبریو پاراهمولیتیکوس* وجود دارد که از میان این تکنیک‌ها، روش PCR به عنوان روشی سریع، آسان تر و قابل اعتمادتر برای شناسایی این باکتری در اغذیه دریایی از طریق ژن *toxR* مورد استفاده قرار می‌گیرد. این ژن به خوبی در میان *ویبریو پاراهمولیتیکوس*ها محافظت (conserve) شده می‌باشد. لذا این ژن برای شناسایی اختصاصی *ویبریو پاراهمولیتیکوس* به کار می‌رود (Abd-Elghany and Sallam, 2013). مطالعات مختلفی نشان دهنده این است که *ویبریو پاراهمولیتیکوس* در طیف گسترده‌ای از مواد غذایی دریایی یافت می‌شود و می‌تواند باعث ایجاد بیماری در انسان شود. فراوانی *ویبریو پاراهمولیتیکوس* در نمونه های میگو در مطالعه حاضر با برخی از مطالعات هم خوانی نشان داد

در ایران نیز مطالعاتی را که آلودگی مواد غذایی دریایی به *ویبریو پاراهمولیتیکوس* را گزارش کرده باشند، صورت گرفته است. برخی از گزارش‌ها میزان فراوانی *ویبریو پاراهمولیتیکوس* در نمونه‌های میگو و ماهی را به ترتیب ۱۱ درصد (Zarei et al., 2012) و ۲۱/۴ درصد (Basti et al., 2006) و در مطالعه دیگری این میزان را در نمونه های میگو ۹/۳ درصد گزارش نموده‌اند (Rahimi et al., 2010). در یک مطالعه‌ای میزان فراوانی *ویبریو پاراهمولیتیکوس* در ۱۱۷ نمونه انواع مواد غذایی دریایی مانند ماهی، میگو و صدف حدود ۹/۴ درصد گزارش شده است (Jakšić et al., 2002).

Di pinto و همکاران (۲۰۰۸) طی مطالعه‌ای در جنوب ایتالیا، ۱۴۴ نمونه صدف خوراکی را مورد بررسی قرار دادند. آنها، *ویبریو پاراهمولیتیکوس* را بر اساس کشت، تست‌های بیوشیمیایی و سنجش مولکولی(PCR) تشخیص دادند و گزارش کردند که ۴۷ نمونه (۳۲/۶ درصد) دارای کلنی‌های سبز-آبی در محیط TCBS بود. تست های تشخیصی نشان دادند که فقط ۱۲ نمونه، *ویبریو پاراهمولیتیکوس* می‌باشد و از ۱۴۴ نمونه مورد بررسی شده فقط ۶/۲۵ درصد حامل ژن *toxR* بوده‌اند و این در حالی است که ۱۳/۷۵ درصد از ۸۰ نمونه میگوی مورد بررسی مطالعه ما به لحاظ حضور ژن *toxR* مثبت شدند.

Hosseini و همکاران (۲۰۰۴) در مناطق جنوبی ایران مطالعه‌ای را با هدف شناسایی گونه‌های ویبریو در نمونه‌های میگوی پرورشی و دریایی انجام دادند. در این مطالعه از ۷۷۰ نمونه میگو فقط ۱۶ نمونه (۲/۱ درصد) گونه‌های ویبریو جداسازی شده است هم چنین در این مطالعه تنوع باکتری نسبت به مطالعه ما بیشتر بوده ولی میزان فراوانی باکتری نسبت به نتیجه مطالعه ما پایین تر بود. گونه غالب در این مطالعه *ویبریو پاراهمولیتیکوس* گزارش شده است این درحالی است که میزان آلودگی میگو در مطالعه ما با ۱۳/۷۵ درصد در تعداد نمونه پایین نشانگر عدم رعایت نکات بهداشتی در زمان حمل این محصول دریایی از مبدأ تا شهر اردبیل می باشد و احتمالاً میزان باکتری موجود در میگو طی پروسه حمل و نقل و تا زمان رسیدن به محل های عرضه کننده میگو افزایش یافته است

در یک مطالعه‌ای در مالزی ۱۰۰ نمونه صدف راه راه (cockle) با هدف تشخیص *ویبریو پاراهمولیتیکوس* مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه میزان فراوانی

ویبریو پاراهمولیتیکوس ۶۰ درصد گزارش شده است. این میزان شیوع باکتری در این مطالعه نسبت به مطالعه ما بسیار بالا بوده و نشان‌گر این است که میزان حضور باکتری *ویبریو پاراهمولیتیکوس* در صدف نسبت به میگو بالا می‌باشد و این می تواند ناشی از این باشد که صدف به‌دلیل داشتن سیستم تغذیه‌ای فیلتری باعث جذب *ویبریو پاراهمولیتیکوس* در حین تغذیه از آب می شود. نتایج این مطالعه نشانگر این است که cockle مخزن بالقوه‌ای برای این باکتری بوده و غذاهای دریایی مثل cockle در این سطح از حضور *ویبریو پاراهمولیتیکوس* می تواند سلامت مصرف کننده را به خطر بیاندازد (Bilung et al., 2005).

در طی سال‌های ۱۹۹۶ تا ۱۹۹۷ در تایوان مطالعه ای صورت گرفت که غذاهای دریایی وارده شده از کشورهای آسیایی از جمله اندونزی، تایلند، هنگ کنگ و ویتنام به منظور بررسی وجود *ویبریو پاراهمولیتیکوس* مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه تعداد ۳۱۵ نمونه (۴۵/۹ درصد) به لحاظ حضور *ویبریو پاراهمولیتیکوس* مثبت گزارش گردید. آنها با بررسی غذاهای دریایی وارد شده از ویتنام به این نتیجه رسیدند که از ۱۲۶ نمونه خرچنگ شنی (sand crab) تعداد ۴۱ نمونه (۳۲/۵ درصد)، از ۹۵ نمونه لابستر ۲۶ نمونه (۴۴/۱ درصد)، از ۹۵ نمونه خرچنگ آب شیرین (crawfish) ۲۰ نمونه (۲۱/۱ درصد) و از ۱۰۶ نمونه حلزون خوراکی (snail) تعداد ۴۷ نمونه (۴۴/۳ درصد) آلوده به *ویبریو پاراهمولیتیکوس* بوده است. هم چنین با بررسی خرچنگ (crab) وارداتی هنگ کنگ به این نتیجه رسیدند که از ۱۱۴ نمونه خرچنگ، ۸۱ نمونه (۷۷/۱ درصد) دارای *ویبریو پاراهمولیتیکوس* می باشد. آن‌ها هم چنین با بررسی غذاهای دریایی وارد شده از تایلند به این نتیجه دست یافتند که از ۳۲ نمونه خرچنگ ۲۶ نمونه (۸۱/۳ درصد) و از ۶۲ نمونه میگو ۴۷ نمونه (۷۵/۸ درصد) آلوده به *ویبریو پاراهمولیتیکوس* بوده است. با بررسی نمونه ماهی های وارد شده از اندونزی نیز به این نتیجه رسیدند که از ۹۲ نمونه تعداد ۲۷ نمونه (۲۹/۳ درصد) آلودگی به *ویبریو پاراهمولیتیکوس* دارد (Wong et al., 1999). این مطالعه میزان آلودگی انواع غذا های دریایی را به *ویبریو پاراهمولیتیکوس* در حد بسیار بالایی نشان می دهد و این در حالی است که در مطالعه ما درصد شیوع این باکتری در میگو کمتر از این مطالعه می باشد لذا می توان گفت میزان فراوانی باکتری *ویبریو پاراهمولیتیکوس* در غذاهای دریایی در حین پروسه انتقال افزایش می یابد به‌طوری‌که مطالعات متعدد نیز این موضوع مهم را اثبات می کند. از طرفی می توان گفت در مطالعه ما به دلیل این که میگو ها وارداتی نبوده‌اند و بُعد مسافت انتقال میگو از مبدأ تا محل عرضه میگو زیاد نبوده است لذا میزان آلودگی نیز در حد بسیار بالایی نبوده است.

Raissy و همکاران (۲۰۱۵) در یک مطالعه ای ۱۱۳ نمونه (۵۵ نمونه میگو و ۵۸ نمونه ماهی) خلیج فارس را با هدف شناسایی مولکولی گونه های مختلف *ویبریو* مورد بررسی قرار دادند و گزارش نمودند که ۲۵ نمونه (۲۲ درصد) از مجموع کل نمونه ها به گونه های مختلف *ویبریو* آلوده هستند که از این بین تعداد چهار نمونه را به لحاظ *ویبریو پاراهمولیتیکوس* مثبت گزارش کردند. این در حالی است که تشخیص مولکولی این باکتری در مطالعه ما ۱۱ نمونه بود. هم چنین مطالعه Rahimi و همکاران (۲۰۱۰) روی ۳۰۰ نمونه میگوی تازه جمع آوری شده از بوشهر، خوزستان و هرمزگان جهت شناسایی سویه های توکسین زای *ویبریو پاراهمولیتیکوس*، نشان داد که ۱۱۸ نمونه (۳۹/۳ درصد) دارای کلنی آبی-سبز هستند و در کل از این تعداد، ۲۸ جدایه *ویبریو پاراهمولیتیکوس* توکسین زا را شناسایی نمودند. این در حالی است که در مطالعه ما ۴۳/۷۵ درصد نمونه‌ها دارای کلنی سبز-آبی بود و میزان شیوع *ویبریو پاراهمولیتیکوس* نیز نسبت به این مطالعه بیش تر بود. دلیل بالا بودن میزان شیوع

باکتری *ویبریو پاراهمولیتیکوس* در مطالعه حاضر در مقایسه با این دو مطالعه می تواند ناشی از موقعیت جغرافیایی و ُبعد مسافت محل صید میگو تا محل عرضه باشد. با این توضیح که استان های جنوبی به دلیل نزدیکی به مکان های صید میگو، فاصله زمانی صید تا عرضه را کاهش می‌دهند.

Abd-Elghny و همکاران (۲۰۱۳) در مصر، میزان فراوانی *ویبریو پاراهمولیتیکوس* در نمونه های میگوی جمع آوری شده از خورده فروشی های شهر منصوره را ۴۵درصد گزارش کردند. این در حالی است که در مطالعه ما میزان شیوع این باکتری در نمونه های میگو کمتر از این مطالعه می باشد. البته می توان گفت به دلیل بالا بودن دما در این شهر میزان فراوانی این باکتری نسبت به شهر اردبیل بیش تر بوده است و احتمالاً عرضه غیر بهداشتی اغذیه دریایی میزان شیوع این باکتری را در مواد غذایی دریایی این شهر بالا برده است. این میزان آلودگی می تواند خطر بالقوه‌ای را برای سلامتی ایجاد کند لذا می‌توان بیان کرد که به منظور تشخیص این باکتری علاوه بر روش های تشخیصی مرسوم باکتریولوژیک، باید از روش های مولکولی قابل اعتماد مانند PCR نیز بهره گرفت.

Zarei و همکاران (۲۰۱۲) در تحقیقی شیوع فصلی گونه های ویبریو (با تأکید بر *ویبریو پاراهمولیتیکوس*) در نمونه میگو های جمع آوری شده از خرده فروشی‌های جنوب غرب ایران انجام دادند. آن ها در این مطالعه ۷۵ نمونه را در هر فصل مورد بررسی قرار دادند. نتیجه بدست آمده از این مطالعه نشان داد که در چهار درصد از ۷۵ نمونه میگوی جمع آوری شده از فصل زمستان، ۱۳/۳ درصد از نمونه‌های جمع آوری شده از فصل بهار، ۱۸/۶ درصد از نمونه های جمع آوری شده از فصل تابستان و هشت درصد از نمونه‌های جمع آوری شده از فصل پائیز به *ویبریو پاراهمولیتیکوس* آلوده بوده است. نتایج مطالعه ما نیز مشابه نتایج این مطالعه می‌باشد بطوریکه از ۸۰ نمونه میگوی مورد بررسی ما ۱۳/۷۵ درصد آلودگی به این باکتری را داشتند. نتایج این مطالعه و مطالعات دیگر نشان دهنده این است تغییرات دمایی در فصول می تواند میزان فراوانی باکتری را در میگو افزایش یا کاهش دهد.

اگرچه گونه‌های مختلف *ویبریو پاراهمولیتیکوس* بسیار حساس به حرارت هستند ولی موارد بسیاری از شیوع *ویبریو پاراهمولیتیکوس* در انسان توسط مصرف مواد غذایی دریایی خام و کم پخته گزارش شده است و عمدتاً وقوع بیماری بطور مستقیم یا غیر مستقیم به مواد غذایی دریایی مربوط است (Hlady and Klontz, 1996). از طرفی آمار مصرف روزافزون این فراورده‌ها توسط خانواده‌های ایرانی سبب می‌شود تا اهمیت بهداشتی این فراورده‌ها بیش از پیش مورد توجه قرار گیرد. همچنین با توجه به سطح غیر قابل قبول عرضه بهداشتی میگوی تازه در بازارهای میگو و ماهی فروشی، احتمال بروز عفونت‌ها و مسمومیت‌های ناشی از مصرف میگوی غیر بهداشتی وجود دارد. بطوری که در تحقیق حاضر نیز محل عرضه میگو به لحاظ بهداشتی در وضعیت مطلوبی نبودند.

نتیجه‌گیری

در مطالعه انجام‌گرفته، هرچند میزان آلودگی نمونه‌های میگو بالا نبود با این وجود مصرف میگوی آلوده به *ویبریو پاراهمولیتیکوس* می‌تواند نقش بسزایی در شیوع گاستروآنتریت در سطح استان اردبیل داشته باشد که این مسئله می تواند بیانگر حضور *ویبریو پاراهمولیتیکوس* در انواع مواد غذایی دریایی از جمله میگو باشد. هم چنین عرضه نامناسب میگوی تازه در فروشگاه ها احتمال مسمومیت های ناشی از مصرف غیر بهداشتی این اغذیه دریایی را افزایش می دهد. لذا جهت کنترل و پیشگیری از عفونت های این باکتری در میگو و سایر مواد غذایی دریایی که به عنوان مخزن این باکتری هستند، وضع استاندارد های لازم امری ضروری به نظر می‌رسد.

منابع

1. Abd-Elghany, S.M., and Sallam, K.I. 2013. Occurrence and Molecular Identification of *Vibrio Parahaemolyticus* in Retail Shellfish in Mansoura, Egypt. Food Control. 33: 399-405.
2. Basti, A.A., Misaghi, A., Salehi, T.Z., and Kamkar, A. 2006. Bacterial Pathogens in Fresh, Smoked and Salted Iranian Fish. Food Control. 17: 183-188.
3. Baumann, P., and Schubert, R.H.W. 1984. Family II. Vibrionaceae. In: Krieg, N.R., Holt, J.G. (Eds.), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.Williams & Wilkins Co., Baltimore, pp. 516–550.
4. Bilung, L.M., Radu, S., Bahaman, A.R., Rahim, R.A., Napis, S., Ling, M.W.C.V., Tanil, G.B., and Nishibuchi, M. 2005. Detection of *Vibrio Parahaemolyticus* in Cockle (Anadara Granosa) by PCR. FEMS Microbiol Lett. 252: 85-88.
5. Ceccarelli, D., Hasan, N.A., Huq, A. and Colwell, R.R. 2013. Distribution and Dynamics of Epidemic and Pandemic *Vibrio Parahaemolyticus* Virulence Factors. Front Cell Infect Microbiol. 3: 1-9.
6. Davies, A.R., Capell, C., Jehanno, D., Nychas, G.J. and Kirby, R.M. 2001. Incidence of Foodborne Pathogens on European Fish. Food Control. 12: 67-71.
7. Di Pinto, A., Ciccarese, G., De Corato, R., Novello, L. and Terio, V. 2008. Detection of Pathogenic *Vibrio Parahaemolyticus* in Southern Italian Shellfish. Food Control. 19: 1037-41.
8. Drake, S.L., DePaola, A. and Jaykus, L.A. 2007. An Overview of *Vibrio Vulnificus* and *Vibrio Parahaemolyticus*. Compr Rev Food Sci Food Saf. 6: 120-144.
9. Halako, A. and Forohesh, H. 2007. The Frequency of *Vibrio Parahaemolyticus* in Southeastern Coast of Caspian Sea. Med Lab J. 1: 38-42.
10. Hlady, W.G. and Klontz, K.C. 1996. The Epidemiology of *Vibrio* Infections in Florida, 1981–1993. J Infect Dis. 173: 1176-1183.
11. Hosseini, H., Cheraghali, A.M., Yalfani, R. and Razavilar, V. 2004. Incidence of *Vibrio Spp*. In Shrimp Caught of the South Coast of Iran. Food Control. 15: 187-190.
12. Jakšić, S., Uhitil, S., Petrak, T., Bažulić, D. and Gumhalter Karolyi, L. 2002. Occurrence of *Vibrio Spp*. In Sea Fish, Shrimps and Bivalve Molluscs Harvested from Adriatic Sea. Food Control. 13: 491-493.
13. Kim, Y.B., Okuda, J., Matsumoto, C., Takahashi, N., Hashimoto, S. and Nishibuchi, M. 1999. Identification of *Vibrio Parahaemolyticus* Strains at the Species Level by PCR Targeted to the *ToxR* Gene. J Clin Microbiol. 37: 1173-1177.
14. Liston, J. 1990. Microbial hazards of seafood consumption. Food Technol. 44: 56–62.
15. Miliotis, M. 2005. Quantitative Risk Assessment on the Public Health Impact of Pathogenic *Vibrio Parahaemolyticus* in Raw Oysters: Center for Food Safety and Applied Nutrition Food and Drug Administration, U.S. Department of Health and Human Services, pp.1-29.
16. Nair, G.B., Ramamurthy, T., Bhattacharya, S.K., Dutta, B., Takeda, Y. and Sack, D.A. 2007. Global Dissemination of *Vibrio Parahaemolyticus* Serotype O3: K6 and Its Serovariants. Clin Microbiol Rev. 20: 39-48.
17. Rahimi, E., Ameri, M., Doosti, A. and Gholampour, A.R. 2010. Occurrence of Toxigenic *Vibrio Parahaemolyticus* Strains in Shrimp in Iran. Foodborne Pathog Dis. 7: 1107-1111.
18. Rahimi, E., Tajbaksh, E., Fadaeifard, F., Izadi, B., Alimoradi, M. and Goudarzi, M.A. 2001. Prevalence of *Vibrio Spp*. In Marine Shrimp (*Paeneus Monodon*) Caught Off the Persian Gulf Coast of Iran. Iran J Food Sci Technol. 3: 21-26.
19. Raissy, M., Rahimi, E., Azargun, R., Moumeni, M., Rashedi, M. and Sohrabi, H.R. 2015. Molecular Detection of *Vibrio spp*. in Fish and Shrimp from the Persian Gulf. J Food Biosci Technol. 5: 49-52.

20. Robert-Pillot, A., Copin, S., Gay, M., Malle, P. and Quilici, M. 2010. Total and Pathogenic *Vibrio Parahaemolyticus* in Shrimp: Fast and Reliable Quantification by Real-Time PCR. Int J Food Microbiol. 143: 190-7.

21. Sani, N.A., Ariyawansa, S., Babji, A.S. and Hashim, J.K. 2013. The Risk Assessment of *Vibrio Parahaemolyticus* in Cooked Black Tiger Shrimps (Penaeus Monodon) in Malaysia. Food Control. 31: 546-552.

22. Su, Y-C. and Liu, C. 2007. *Vibrio Parahaemolyticus*: A Concern of Seafood Safety. Food Microbiol. 24: 549-558.

23. Wang, J.J., Sun, W.S., Jin, M.T., Liu, H.Q., Zhang, W., Sun, X.H., Pan, Y.J. and Zhao, Y. 2014. Fate of *Vibrio Parahaemolyticus* on Shrimp after Acidic Electrolyzed Water Treatment. Int J Food Microbiol. 179: 50-56.

24. Wang, L., Shi, L., Su, J., Ye, Y. and Zhong, Q. 2013. Detection of *Vibrio Parahaemolyticus* in Food Samples Using in Situ Loop-Mediated Isothermal Amplification Method. Gene. 515: 421-425.

25. Wong, H-C., Chen, M-C., Liu, S-H. and Liu, D-P. 1999. Incidence of Highly Genetically Diversified *Vibrio Parahaemolyticus* in Seafood Imported from Asian Countries. Int J Food Microbiol. 52:181-188.

26. Zarei, M., Borujeni, M.P., Jamnejad, A. and Khezrzadeh, M. 2012. Seasonal Prevalence of Vibrio Species in Retail Shrimps with an Emphasis on *Vibrio Parahaemolyticus*. Food Control. 25: 107-109.

Detection of *Vibrio parahaemolyticus* in shrimp samples collected from Ardabil by PCR method

Asgarpoor D[1*], Ghasemi M[2], Bahrami M[3]

1. Graduate of MSc in Food Microbiology, Department of Microbiology and Virology, Faculty of Medicine, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran.

2. Department of Microbiology, Ardabil Branch, Islamic Azad University, Ardabil, Iran.

3. Graduate of BSc in Microbiology, Department of Microbiology, Ardabil Branch, Islamic Azad University, Ardabil, Iran.

***Corresponding author:** *D._asgarpoor@zums.ac.ir*

Received: 12 May 2017 Accepted: 12 July 2017

Abstract

Vibrio parahaemolyticus, a member of family Vibrionaceae, is a non-spore-forming, rod-shaped, gram-negative and halophilic bacterium with a single polar flagellum known as seafood-borne gastroenteritis throughout the world. These bacteria are characterized by three major clinical manifestations, including wound infection, primary septicemia and gastroenteritis. Accordingly, the present cross-sectional study aimed to detect *V. parahaemolyticus* using PCR method in 80 fresh shrimp samples collected from different seafood centers in Ardabil, Iran. The samples after immediately homogenization were cultured in TCBS agar. The resulting isolates were identified by biochemical tests, and then typical colonies were selected for DNA extraction. Next, the PCR technique was employed to detect the presence or absence of *vp-toxR* gene as a marker of these bacteria. Based on the findings, 11 (13.75 %) out of 80 fresh shrimp samples were positive for *V. parahaemolyticus*. According to the results, shrimp could be the major sources of *V. parahaemolyticus* that have a potential risk to the public health inasmuch as might be viable and infectious.

Keywords: *Vibrio parahaemolyticus*, shrimp, PCR.