University of Tehran

Journal of Fisheries

Home Page: https://jfisheries.ut.ac.ir

Online ISSN: 2423-7809

Molecular investigation of *Vibrio parahaemolyticus* strains by tracking the virulence genes *tdh* and *trh* in shrimp samples collected from retail markets in Bushehr city

Ali Farjad[1] | Nasrollah Pirani[2] | Majid Pasandideh[3] | Reza Pasandideh[4*] | Aghil Dashtiannasab[5]

1. Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Shahrekord University, Shahrekord, Iran. Email: alifarjad67@gmail.com
2. Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Shahrekord University, Shahrekord, Iran. Email: napirany@yahoo.com
3. Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Shahrekord University, Shahrekord, Iran. Email: majidpasandideh@gmail.com
4. Corresponding Author, Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Bushehr, Iran. Email: rezapasandideh63@gmail.com
5. Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Bushehr, Iran. Email: adashtiannasab@gmail.com

ARTICLE INFO

Article type:
Research Article

Article History:
Received: 08 January 2026
Revised: 27 April 2026
Accepted: 03 May 2026
Published online: 05 July 2026

Keywords:
Food safety,
Molecular surveillance,
Virulence genes,
Pacific white shrimp (Penaeus vannamei),
Vibrio parahaemolyticus.

ABSTRACT

Vibrio parahaemolyticus is one of the most important foodborne pathogenic bacteria associated with seafood, and some of its strains are capable of causing human illness due to the presence of virulence genes *tdh* and *trh*. The aim of this study was to investigate the prevalence of pathogenic strains of *V. parahaemolyticus* by detecting the genes *tdh* and *trh* in samples of Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*). In this study, a total of 100 fresh farmed shrimp samples were randomly collected from retail markets in Bushehr city, Iran during the last summer and early autumn of 1404 (2025). After homogenization, the samples were cultured on selective TCBS agar medium. Among the cultured samples, 39 samples (39%) showed green or greenish-blue colonies suspected of *Vibrio* spp. PCR analysis revealed that 12 isolates (30.76% of the suspected isolates) were positive for the *tlh* and *toxR* genes, confirming them as *V. parahaemolyticus*. However, none of the *tlh* and *toxR* positive isolates harbored the virulence genes *tdh* or *trh*. The results of this study indicate the presence of *V. parahaemolyticus* strains in shrimp samples, while virulence genes associated with human pathogenicity were not detected in the examined isolates. The absence of *tdh* and *trh* virulence genes in *V. parahaemolyticus* isolates indicates a low risk of widespread human pathogenicity resulting from the consumption of farmed shrimp. Nevertheless, due to the presence of this bacterium in the aquatic ecosystem, there is a possibility of an increased frequency of pathogenic strains in subsequent rearing periods through environmental factors such as changes in temperature and salinity, or shifts in the microbial community. Therefore, this study emphasizes the necessity of continued molecular monitoring and adherence to health considerations in shrimp farms and the distribution chain.

Cite this article: Farjad, A., Pirani, N., Pasandideh, M., Pasandideh, R., Dashtiannasab, A. (2026). Molecular investigation of *Vibrio parahaemolyticus* strains by tracking the virulence genes *tdh* and *trh* in shrimp samples collected from retail markets in Bushehr city. *Journal of Fisheries*, 79 (2), 97-106. DOI: http//doi.org/10.22059/jfisheries.2026.409665.1475

© The Author(s) **Publisher:** University of Tehran Press.
DOI: http//doi.org/10.22059/jfisheries.2026.409665.1475

دانشگاه تهران

شیلات، مجله منابع طبیعی ایران

سایت نشریه: https://jfisheries.ut.ac.ir

شاپا الکترونیکی: ۷۸۰۹-۲۴۲۳

بررسی مولکولی سویه‌های ویبریو پاراهمولیتیکوس از طریق ردیابی ژن‌های حدت *tdh* و *trh* در نمونه‌های میگوی جمع‌آوری شده از مراکز فروش شهر بوشهر

علی فرجاد[۱] | نصراله پیرانی[۲] | مجید پسندیده[۳] | رضا پسندیده[۴*] | عقیل دشتیان نسب[۵]

۱. گروه علوم دامی، دانشکدهٔ کشاورزی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران. رایانامه: alifarjad67@gmail.com

۲. گروه علوم دامی، دانشکدهٔ کشاورزی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران. رایانامه: napirany@yahoo.com

۳. گروه علوم دامی، دانشکدهٔ کشاورزی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران. رایانامه: majidpasandideh@gmail.com

۴. نویسنده مسئول، پژوهشکده میگوی کشور، موسسهٔ تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، بوشهر، ایران.
رایانامه: rezapasandideh63@gmail.com

۵. موسسهٔ تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، بوشهر، ایران.
رایانامه: adashtiannasab@gmail.com

اطلاعات مقاله

نوع مقاله:
پژوهشی

تاریخ‌های مقاله:
تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۱۰/۱۸
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۵/۰۲/۰۷
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۵/۰۲/۱۳
تاریخ انتشار: ۱۴۰۵/۰۴/۱۴

کلیدواژه:
ایمنی مواد غذایی،
پایش مولکولی،
ژن‌های بیماری‌زایی،
میگوی سفید غربی (Penaeus vannamei)،
ویبریوپاراهمولیتیکوس.

چکیده

ویبریوپاراهمولیتیکوس (*Vibrio parahaemolyticus*) یکی از مهم‌ترین باکتری‌های بیماری‌زای قابل انتقال از غذاهای دریایی است و برخی سویه‌های آن به‌واسطهٔ دارا بودن ژن‌های حدت *tdh* و *trh* قادر به ایجاد بیماری در انسان هستند. هدف از این مطالعه، بررسی شیوع سویه‌های بیماری‌زای *V. parahaemolyticus* از طریق شناسایی ژن‌های *tdh* و *trh* در نمونه‌های میگوی سفید غربی (*Penaeus vannamei*) بود. به این منظور، تعداد ۱۰۰ نمونه میگوی پرورشی تازه در اواخر تابستان و اوایل پاییز ۱۴۰۴ به‌صورت تصادفی از مراکز فروش شهر بوشهر جمع‌آوری شد. نمونه‌ها پس از هموژن شدن روی محیط انتخابی TCBS آگار کشت داده شدند. از میان نمونه‌های کشت‌شده، ۳۹ نمونه (۳۹ درصد) دارای کلنی‌های سبز یا سبز–آبی مشکوک به *Vibrio* بودند. پس از انجام آزمایش PCR، ۱۲ جدایه (۳۰/۷۶ درصد از جدایه‌های مشکوک) از نظر ژن‌های *tlh* و *toxR* به‌عنوان نشانگرهای اختصاصی *V. parahaemolyticus*، مثبت شناسایی شدند. بررسی ژن‌های حدت نشان داد که هیچ‌یک از جدایه‌های *tlh* و *toxR* مثبت، حامل ژن‌های *tdh* و *trh* نبودند. نتایج این مطالعه بیانگر حضور سویه‌های *V. parahaemolyticus* در نمونه‌های میگو بود، در حالی‌که ژن‌های مرتبط با بیماری‌زایی انسانی در جدایه‌های بررسی‌شده شناسایی نشدند. عدم شناسایی ژن‌های حدت *tdh* و *trh* در جدایه‌های *V. parahaemolyticus* دلالت بر خطر پایین بروز موارد گسترده بیماری‌زایی انسانی، ناشی از مصرف میگوهای پرورشی، دارد. با این حال، با توجه به حضور این باکتری در اکوسیستم آبی، احتمال افزایش فراوانی سویه‌های بیماری‌زا در دوره‌های بعدی پرورش از طریق عوامل محیطی مانند تغییر دما و شوری و یا تغییر جمعیت میکروبی وجود دارد. بنابراین این مطالعه بر ضرورت ادامهٔ پایش‌های مولکولی و رعایت ملاحظات بهداشتی در مزارع پرورشی و زنجیرهٔ توزیع میگو تأکید می‌کند.

استناد: فرجاد؛ علی، پیرانی؛ نصراله، پسندیده؛ مجید، پسندیده؛ رضا، دشتیان نسب؛ عقیل (۱۴۰۵). بررسی مولکولی سویه‌های ویبریو پاراهمولیتیکوس از طریق ردیابی ژن‌های حدت *tdh* و *trh* در نمونه‌های میگوی جمع‌آوری شده از مراکز فروش شهر بوشهر. *نشریهٔ شیلات، مجله منابع طبیعی ایران*، ۷۹ (۲)، ۱۰۶-۹۷. DOI: http//doi.org/10.22059/jfisheries.2026.409665.1475

© نویسندگان.
ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.
DOI: http//doi.org/10.22059/jfisheries.2026.409665.1475

۱. مقدمه

امروزه با افزایش جمعیت جهان، توجه انسان به غذاهای دریایی جهت تأمین نیازهای پروتئینی افزایش یافته است، به‌طوری که این محصولات جایگاه خاصی را در تغذیهٔ مصرف‌کنندگان پیدا کرده‌اند. در این راستا، سیستم‌های پرورش متراکم در اکثر کشورهای تولیدکنندهٔ آبزیان به‌منظور افزایش عملکرد تولید به‌کار گرفته شده‌اند. با این حال، افزایش تراکم ذخیره‌سازی و خوراک‌دهی بیش از حد می‌تواند منجر به تغییر شاخص‌های فیزیکو–شیمیایی آب، پایین آمدن کیفیت آب، بروز شرایط نامطلوب استخر و در نتیجه افزایش خطر شیوع بیماری و تأثیر منفی بر سلامت آبزیان گردد. در محیط طبیعی، تعادلی بین موجودات آبزی و بیماری‌های مرتبط با آن‌ها وجود دارد، اما زمانی که موجودات در تراکم‌های بالا و در محیط‌های محصور پرورش می‌یابند، این تعادل به شدت دستخوش تغییر می‌شود. در این شرایط مصرف آبزیان می‌تواند با مخاطراتی نظیر انتقال عوامل بیماری‌زای باکتریایی همراه باشد (Kongchum *et al.*, 2022).

تبارشاخه (کلاد)[۱] *Vibrio* به‌عنوان عامل اصلی ویبریوزیس شناخته می‌شود که شامل چندین گونهٔ مهم باکتریایی از جمله *Vibrio parahaemolyticus* است. *V. parahaemolyticus*، باکتری گرم منفی نمک‌دوست[۲] و فلور طبیعی اکوسیستم‌های دریایی، برای اولین بار در سال ۱۹۵۰ در ژاپن به‌عنوان عامل عفونت گوارشی انسان در اثر مصرف غذاهای دریایی آلوده گزارش شد. شیوع این باکتری در صدف، آب، غذاهای دریایی و میگو در سطح جهان مشاهده شده است (Broberg *et al.*, 2011; Kang *et al.*, 2016). در انسان، *V. parahaemolyticus* موجب عفونت گوارشی، درد شکم، استفراغ، سردرد، تب و لرز پس از مصرف غذاهای دریایی آلوده یا نیم‌پز می‌شود (Paria *et al.*, 2021). همچنین *V. parahaemolyticus* عامل اگزوفتالمی[۳]، زخم، سپتی‌سمی[۴] و کدورت قرنیه در ماهی و بیماری نکروز حاد هپاتوپانکراس (AHPND)[۵] در میگو است. بیماری‌زایی سویه‌های *V. parahaemolyticus* با قابلیت همولیز آنها ارتباط نزدیکی دارد. اغلب سویه‌های *V. parahaemolyticus* جداسازی شده از محیط یا غذا، قدرت بیماری‌زایی ندارند، در حالی‌که سویه‌های بیماری‌زا معمولاً دارای فاکتورهای حدتی مانند ژن‌های همولیزین مستقیم مقاوم به حرارت (*tdh*)[۶] و همولیزین وابسته به *tdh* (*trh*)[۷] هستند. این ژن‌ها به‌ترتیب پروتئین‌های TDH و TRH را تولید می‌کنند که می‌توانند خاصیت سمی در بدن میزبان داشته باشند. علاوه بر این، این باکتری دارای سه سیستم بیماری‌زا به نام‌های سیستم ترشحی نوع سه ۱ (T3SS1)[۸]، سیستم ترشحی نوع سه ۲ (T3SS2)[۹] و سیستم ترشحی نوع شش (T6SS)[۱۰] است که به زنده‌ماندن و تکثیر آن در دستگاه گوارش انسان کمک می‌کند (Hubbard *et al.*, 2016).

در مطالعات گوناگون وجود ژن‌های حدت[۱۱] در جدایه‌های محیطی مختلف از *V. parahaemolyticus* گزارش شده است. در تحقیقات پیشین ایران، نرخ شیوع این ژن‌ها در میگوهای دریایی پایین گزارش شده است از جمله ۱/۷ درصد ژن *tdh* و ۰/۷ درصد ژن *trh* در ۲۹ جدایهٔ مثبت از ۳۰۰ نمونه میگوی سواحل استان‌های بوشهر، هرمزگان و خوزستان (Rahimi *et al.*, 2010)، ۲/۸ درصد ژن *tdh* و ۱/۴ درصد ژن *trh* در ۱۲ جدایه مثبت از ۷۰ نمونه میگوی خرده‌فروشی‌های شهر زنجان (Asgarpoor *et al.*, 2018)، ۲/۷ درصد ژن *tdh* بدون ژن *trh* در ۱۷ جدایه مثبت از ۱۱۰ نمونه میگوی خرده‌فروشی‌های شهر کرمان (Mohseni *et al.*, 2024). مطالعات مشابهای در جهان نیز انجام شده است؛ برای مثال در یک مطالعه در ایالات متحده آمریکا با بررسی بیش از ۲۰۰ جدایهٔ محیطی، فراوانی ژن‌های *tdh* و *trh* به‌ترتیب ۲–۴ درصد و کمتر از ۲ درصد گزارش شد

---

[۱] Clade
[۲] Halophilic bacterium
[۳] Exophthalmia
[۴] Septicaemia
[۵] Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND)
[۶] Thermostable direct hemolysin (tdh)
[۷] tdh-related hemolysin (trh)
[۸] Type three secretion system 1 (T3SS1)
[۹] Type three secretion system 2 (T3SS2)
[۱۰] Type six secretion system (T6SS)
[۱۱] Virulence genes

(Gutierrez-West *et al.*, 2013).

در ایران مصرف غذاهای دریایی به‌ویژه در میان ساکنان استان‌های ساحلی رونق زیادی دارد. از سوی دیگر، ورود فاضلاب‌های شهری و صنعتی به آب دریا در ایران می‌تواند خطر آلودگی به انواع مختلف از باکتری را به‌همراه داشته باشند. از طرفی، شکاف‌ها و زائده‌های موجود در بدن میگو می‌توانند به‌عنوان مخزن‌های طبیعی برای تکثیر *V. parahaemolyticus* باشند (Amin & Salem, 2012). در روش‌های کلاسیک ارزیابی کیفیت گوشت، از روش‌های کشت میکروبی و بیوشیمیایی استفاده می‌شود، اما این روش‌ها گاهی پیچیده و یا زمان‌بر هستند. روش‌های ژنتیک مولکولی، ارزیابی مواد غذایی را بدون آسیب به کیفیت آنها تسریع کرده و از دقت و حساسیت بالایی برخوردارند (Biswas & Mandal, 2020). بنابراین، ردیابی مکرر و سالیانهٔ *V. parahaemolyticus* بیماری‌زا در محصولات دریایی از طریق روش‌های سریع و دقیق مولکولی یک امر ضروری جهت حفظ سلامت مصرف‌کنندگان است. استان بوشهر به‌عنوان یکی از قطب‌های تولید میگوی پرورشی در ایران مطرح است (Iranian Fisheries Statistical Yearbook, 2019, 2023). اما تولیدات بالای استخرهای پرورشی در سال‌های اخیر با افزایش بار میکروبی *ویبریو* و شیوع بیماری AHPND مواجه بوده است. بنابراین مطالعهٔ حاضر با هدف بررسی فراوانی سویه‌های *V. parahaemolyticus* در میگوهای سفید غربی پرورشی جمع‌آوری شده از مراکز فروش شهر بوشهر از طریق غربالگری ژن‌های حدت *tdh* و *trh* انجام شد.

۲. روش‌شناسی پژوهش

۲-۱. جمع‌آوری نمونه‌های میگو

تعداد ۱۰۰ نمونه میگوی سفید غربی (*Penaeus vannamei*) پرورشی تازه از مراکز مختلف فروش شهر بوشهر به‌صورت تصادفی در اواخر تابستان و اوایل پاییز ۱۴۰۴ جمع‌آوری شد. نمونه‌های میگو در کیسه‌های پلاستیکی و در مجاورت یخ نگهداری و بلافاصله به آزمایشگاه میکروبیولوژی پژوهشکدهٔ میگوی کشور و آزمایشگاه بیوتکنولوژی حیوانی دانشگاه شهرکرد منتقل شدند.

۲-۲. کشت جدایه‌های باکتریایی

پس از انتقال به آزمایشگاه، نمونه‌های میگو از طریق کوبیدن درون هاون هموژن شدند. سپس با روش استریل، مقدار ۱ گرم از هر نمونهٔ هموژن شده به ۹ میلی‌لیتر محلول نمکی فیزیولوژیکی با غلظت ۳ الی ۳/۵ درصد اضافه گردید. در ادامه به‌منظور افزایش تعداد باکتری‌های *ویبریو*، ۱ میلی‌لیتر از هر محلول به ۹ میلی‌لیتر از محیط کشت آب پپتون قلیایی (APW)[۱] (pH= ۸/۵) اضافه و به‌مدت ۶ تا ۸ ساعت در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد در گرم‌خانه پیش‌غنی‌سازی شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از محلول نمکی روی محیط انتخابی TCBS آگار کشت داده شد و برای مدت ۱۸ تا ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد در گرم‌خانه قرار گرفت. پس از اتمام زمان انکوباسیون، کلونی‌های مشکوک *V. parahaemolyticus* به رنگ سبز یا سبز-آبی با ضخامت ۳-۲ میلی‌متر روی محیط کشت ظاهر شدند (Hosseini *et al.*, 2004; Patel *et al.*, 2018).

۲-۳. استخراج DNA

مادهٔ ژنتیکیِ کلونی‌های مشکوک *V. parahaemolyticus* با استفاده از روش جوشاندن، مشابه سایر گونه‌های *Vibrio* (از جمله *V. cholerae*) با کمی تغییرات، استخراج شد (Wilson, 2001). به این منظور، با استفاده از لوپ استریل مقدار کمی از کلونی‌های سبز یا سبز-آبی به‌صورت مستقیم از محیط کشت TCBS آگار برداشت و در ۳۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل معلق شد. سپس سوسپانسیون باکتریایی به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجهٔ سانتی‌گراد در بن‌ماری حرارت داده شد تا سلول‌ها شکسته شده و DNA آزاد شود. بلافاصله پس از جوشاندن، نمونه‌ها به‌مدت ۵ دقیقه روی یخ قرار گرفتند تا DNA تثبیت گردد. سپس نمونه‌ها در سرعت ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۱ دقیقه سانتریفیوژ شد. مایع رویی حاوی DNA به‌دست‌آمده جمع‌آوری و به‌عنوان الگوی اولیه در واکنش PCR مورد استفاده قرار گرفت (Wilson, 2001).

۱ Alkaline Peptone Water

۲-۴. تعیین کمیت و کیفیت DNA

کمیت و خلوص DNA استخراج شده با استفاده از دستگاه نانودراپ (انگلستان، NANO- 200, A&E) و براساس جذب در طول موج‌های ۲۶۰، ۲۸۰ و ۲۳۰ نانومتر تعیین شد.

۲-۵. سویهٔ مرجع *V. parahaemolyticus*

سویهٔ مرجع *V. parahaemolyticus* ATCC 17802 از "مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران" خریداری و روی محیط کشت TCBS آگار کشت داده شد. سپس ژنوم آن با روش جوشاندن استخراج و به‌عنوان کنترل مثبت در واکنش PCR مورد استفاده قرار گرفت.

۲-۶. تکثیر ژن‌های مورد نظر توسط PCR

به‌منظور تشخیص حضور یا عدم حضور شاخص‌های حدت در کلونی‌های شناسایی شده از ردیابی ژن‌های حدت *tdh* و *trh* با استفاده از روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) استفاده شد. سویه‌های *V. parahaemolyticus* دارای ژن‌هایی به نام *tlh* و *toxR* هستند که در همهٔ سویه‌ها صرف‌نظر از توانایی آنها در بیماری‌زایی وجود دارند (Nelapati & Krishnaiah, 2010). بنابراین در این مطالعه از ژن‌های *tlh* و *toxR* به‌عنوان نشانگرهای اختصاصی برای شناسایی این باکتری در سطح گونه استفاده شد. توالی پرایمرهای مورد استفاده در این تحقیق در جدول ۱ ارائه شده است. ترکیبات مورد نیاز برای هر واکنش PCR و برنامهٔ حرارتی مناسب طبق جدول‌های ۲ و ۳ بهینه‌سازی شد. به‌منظور مشخص شدن نتایج PCR، محصولات تکثیر شده روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد با جریان الکتریکی ۷۵ ولت و به‌مدت ۵۰ دقیقه الکتروفورز شدند. سپس باندهای قطعات تکثیرشده روی ژل توسط دستگاه ترانس ایلومیناتور UV رویت شد.

جدول ۱- توالی پرایمرهای مورد استفاده برای تکثیر ژن‌ها در واکنش PCR

ژن هدف	توالی پرایمر (5′→3′)	اندازه قطعه (bp)	کاربرد	منبع
tdh	F: GTAAAGGTCTCTGACTTTTGGAC	270	شناسایی ژن همولیزین مقاوم به حرارت (عامل حدت اصلی)	(Bej *et al.*, 1999)
	R: TGGAATAGAACCTTCATCTTCACC			
trh	F: TTGGCTTCGATATTTTCAGTATCT	486	شناسایی ژن همولیزین مرتبط با بیماری‌زایی (عامل حدت)	(Nishibuchi and Kaper, 1995)
	R: CATAACAAACATATGCCCATTTCCG			
tlh	F: AAAGCGGATTATGCAGAAGCACTG	450	تأیید گونهٔ *V. parahaemolyticus*	(Bej *et al.*, 1999)
	R: GCTACTTTCTAGCATTTTCTCTGC			
toxR	F: GTCTTCTGACGCAATCGTTG	368	تأیید گونهٔ *V. parahaemolyticus*	(Kim *et al.*, 1999)
	R: ATACGAGTGGTTGCTGTCATG			

جدول ۲- ترکیبات مورد نیاز برای تکثیر هر ژن در واکنش PCR

ترکیب	حجم (µL)
مسترمیکس آمپلیکون 2X	۱۰
پرایمر رفت (10 µM)	۰/۵
پرایمر برگشت (10 µM)	۰/۵
DNA	۲
آب	۷
حجم کل	۲۰

جدول ۳. برنامهٔ حرارتی مناسب برای تکثیر هر ژن در واکنش PCR

مرحله	دما	زمان	تعداد چرخه
واسرشت‌سازی اولیه	۹۴°C	۳ دقیقه	۱ چرخه
واسرشت‌سازی	۹۴°C	۱ دقیقه	۳۰ چرخه
اتصال	۵۸°C	۱ دقیقه	۳۰ چرخه
بسط	۷۲°C	۱ دقیقه	۳۰ چرخه
بسط نهایی	۷۲°C	۵ دقیقه	۱ چرخه

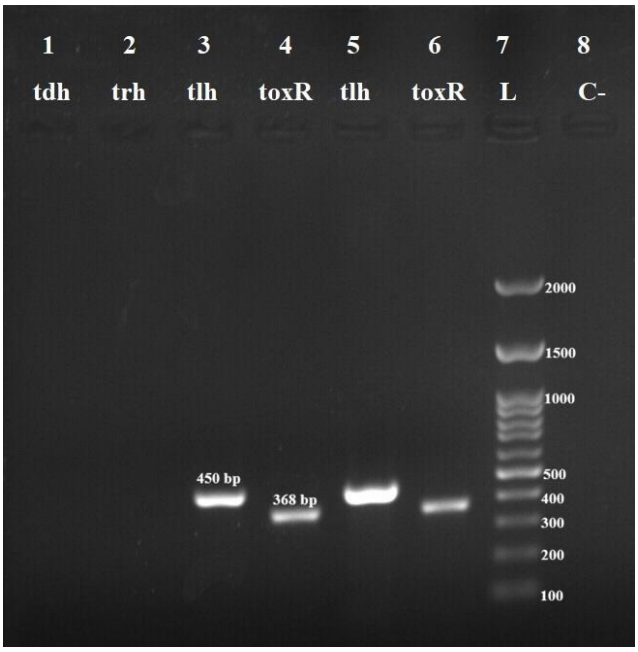
۳. یافته‌شناسی پژوهش

۳–۱. تعیین کمیت و کیفیت DNA

غلظت DNA استخراج شده از کلونی‌های مشکوک *V. parahaemolyticus* در بازهٔ ۷۳/۰۳ تا ۱۰۸/۷۸ نانوگرم بر میکرولیتر قرار داشت، بنابراین مادهٔ ژنتیکی از کمیت مناسبی برای انجام آزمایش PCR برخوردار بود. برای نمونه‌های مختلف، نسبت جذب ۲۶۰ به ۲۳۰ در بازهٔ ۱/۷۵ تا ۲/۰ و نسبت جذب ۲۶۰ به ۲۸۰ در بازهٔ ۱/۴ تا ۲/۱ قرار داشتند که نشان‌دهندهٔ کیفیت قابل قبول DNA استخراج شده با روش جوشاندن داشت. همچنین تکثیر موفق ژن‌های *tlh* و *toxR* که نشانگرهای اختصاصی برای تأیید گونهٔ *V. parahaemolyticus* هستند تاییدکنندهٔ کمیت و کیفیت مناسب DNA استخراج‌شده برای مطالعات مولکولی بود.

۳–۲. نتایج آزمایش PCR

نتایج آزمایش PCR نشان داد که از میان ۱۰۰ نمونه میگوی کشت‌داده روی محیط TCBS آگار، ۳۹ نمونه (معادل ۳۹ درصد) دارای کلونی‌های سبز یا سبز–آبی بودند که به‌عنوان کلونی‌های مشکوک به *V. parahaemolyticus* تلقی شدند. آزمون PCR بر پایهٔ ژن‌های *tlh* و *toxR* نشان داد که از میان این ۳۹ نمونه، ۱۲ جدایه (معادل ۱۲ درصد از کل نمونه‌ها و ۳۰/۷۶ درصد از جدایه‌های مشکوک) به‌طور قطعی متعلق به گونهٔ *V. parahaemolyticus* بودند. همان‌طور که در شکل ۱ مشخص است، حضور قطعات ۴۵۰ و ۳۶۸ جفت بازی برای ژن‌های به‌ترتیب *tlh* و *toxR* نشان از تأیید گونهٔ *V. parahaemolyticus* و صحت واکنش PCR داشت. در بررسی ژن‌های حدت، هیچ‌یک از جدایه‌های تأییدشده حامل ژن *tdh* نبودند (صفر جدایه، صفر درصد) و همچنین هیچ نمونه‌ای برای ژن *trh* نیز واکنش مثبت نشان نداد (شکل ۱).



شکل ۱– تصاویر نتایج آزمایش PCR روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد. حضور قطعات ۴۵۰ و ۳۶۸ جفت بازی برای ژن‌های به‌ترتیب *tlh* و *toxR* نشان از تأیید گونهٔ *V. parahaemolyticus* و صحت واکنش PCR داشت. ۱ تا ۴: کلونی سبز–آبی جداسازی شده از میگو، ۵ و ۶: کنترل مثبت (سویهٔ مرجع *V. parahaemolyticus* ATCC 17802)، ۷: نردبان ژنی ۱۰۰ جفت بازی و ۸: کنترل منفی‌اند.

۴. بحث و نتیجه گیری نهایی

این مطالعه با هدف کاربرد روش‌های مولکولی برای شناسایی سویه‌های بیماری‌زای *V. parahaemolyticus* در نمونه‌های میگوی جمع‌آوری شده از مراکز فروش مختلف شهر بوشهر انجام گرفت. روش‌های مولکولی مبتنی بر PCR در مقایسه با روش‌های کلاسیک از مزایای بیشتری نظیر حساسیت و اختصاصیت بالاتر، سهولت و سرعت انجام آزمایش برخوردار هستند. در روش‌های کلاسیک میکروبیولوژی، آزمایش‌های بیوشیمیایی برای تعیین هویت و تشخیص فنوتیپی گونه‌های *Vibrio* به‌کار می‌روند. این آزمون‌ها قادر به تشخیص عوامل بیماری‌زایی نبوده و تنها مشخص می‌کنند که کلونی جداشده احتمالاً متعلق به *V. parahaemolyticus* یا سایر گونه‌های *Vibrio* است. در مقابل، در روش‌های مولکولی ژن‌های *tlh* و *toxR* به‌عنوان شاخص‌های اختصاصی گونهٔ *V. parahaemolyticus* و ژن‌های *tdh* و *trh* به‌عنوان شاخص‌های اصلی بیماری‌زایی محسوب می‌شوند (Bej *et al.*, 1999; Nelapati & Krishnaiah, 2010). با توجه به اینکه در این مطالعه شناسایی قطعی سویه‌های *V. parahaemolyticus* براساس ژن‌های *tlh* و *toxR* انجام شد و روش PCR از دقت و اختصاصیت بالاتری نسبت به آزمون‌های بیوشیمیایی برخوردار است، انجام تست‌های بیوشیمیایی برای تأیید نهایی ضروری نبود.

در مطالعهٔ حاضر از میان ۱۰۰ نمونه میگوی جمع‌آوری شده از مراکز فروش مختلف در شهر بوشهر، ۳۹ جدایه *tlh* و *toxR* مثبت به‌دست آمد، اما هیچ جدایه‌ای حامل ژن‌های حدت *tdh* و *trh* نبود. این نتایج با اغلب مطالعات انجام‌شده در ایران و جهان همخوانی دارد که در آنها حضور ژن‌های حدت بسیار کم گزارش شده است. بنابراین، جدایه‌های به‌دست‌آمده در این مطالعه عمدتاً سویه‌های غیرپاتوژن بودند. نتایج مطالعهٔ حاضر براساس چند عامل زیستی قابل توجیه است. اول اینکه معمولاً فراوانی جدایه‌های حامل *tdh*/*trh* در نمونه‌های محیطی/غذایی نسبت به نمونه‌های بالینی بسیار پایین‌تر است (Bej *et al.*, 1999; Letchumanan *et al.*, 2014; Raghunath, 2015)؛ بنابراین عدم مشاهدهٔ این ژن‌ها در مجموعه‌ای از نمونه‌های میگوی پرورشی امری قابل قبول است. دوم اینکه طی دورهٔ پرورش میگوی سفید غربی در استخرهای بوشهر، تغییرات شرایط آب دریا، نوسانات دمایی و سایر عوامل محیطی، جمعیت میکروبی را دگرگون می‌سازد. عوامل اکولوژیک مختلف مانند دما، شوری و ترکیب میکروبی محیط پرورش، توزیع *گونه‌های Vibrio* را تحت تأثیر قرار می‌دهند؛ به‌طور مثال، افزایش دما در فصول گرم بار کلی گونه‌های *Vibrio* را بالا می‌برد، اما لزوماً فراوانی ژن‌های *tdh/trh* را افزایش نمی‌دهد (Martinez-Urtaza *et al.*, 2008). دلیل سوم اینکه در مطالعات مختلف گزارش شده است که ژن‌های حدت *tdh* و *trh* می‌توانند در جمعیت‌های طبیعی به‌صورت پراکنده حضور داشته یا در اثر فشارهای تکاملی و سازگاری محیطی از دست بروند؛ در نتیجه، برخی زیست‌بوم‌ها عمدتاً توسط سویه‌های غیرپاتوژن *V. parahaemolyticus* اشغال می‌شوند (Letchumanan *et al.*, 2014; Raghunath, 2015). بنابراین ترکیبی از دلایل طبیعی، اکولوژیک و تکاملی می‌تواند توجیه کنندهٔ عدم مشاهدهٔ ژن‌های *tdh/trh* در نمونه‌های میگوی پرورشی مورد بررسی در این مطالعه باشد. با این حال، ژن‌های حدت ممکن است روی عناصر قابل انتقال افقی (مانند پلاسمیدها و ترانسپوزون‌ها) قرار گیرند و انتشار آنها می‌تواند از طریق انتقال افقی ژن در محیط‌های میکروبی تسهیل شود. بنابراین تغییر جمعیت میکروبی می‌تواند در آینده موجب افزایش فراوانی سویه‌های بیماری‌زا شوند (Letchumanan *et al.*, 2014; Ghenem *et al.*, 2017).

بر اساس مطالعات متعدد در ایران، فراوانی *V. parahaemolyticus* در نمونه‌های میگو و سایر محصولات دریایی در محدودهٔ ۱۰ تا۳۰ درصد گزارش شده است؛ با این حال، فراوانی ژن‌های حدت *tdh* و *trh* در اغلب نمونه‌های محیطی پایین بوده است (Rahimi *et al.*, 2010; Asgarpoor *et al.*, 2018). برای مثال، طی نخستین مطالعه در ایران، از تعداد ۳۰۰ میگوی جمع‌آوری شده از سواحل استان‌های بوشهر، هرمزگان و خوزستان، ۲۹ جدایه مثبت *V. parahaemolyticus*، ۵ جدایه (۱/۷ درصد) حامل ژن حدت *tdh* و ۲ جدایه (۰/۷ درصد) حامل ژن *trh* شناسایی شد (Rahimi *et al.*, 2010). همچنین، در بررسی میگوهای عرضه‌شده در خرده‌فروشی‌های شهر زنجان طی ماه‌های اسفند ۱۳۹۳ تا خرداد ۱۳۹۴، از ۷۰ نمونه میگوی جمع‌آوری شده، ۱۲ نمونه (۱۷/۱ درصد) مثبت *V. parahaemolyticus*، ۲ نمونه (۲/۸ درصد) حامل ژن *tdh* و ۱ نمونه (۱/۴ درصد) حامل ژن *trh* شناسایی شدند (Asgarpoor *et al.*, 2018). در مطالعهٔ دیگر، از ۱۱۰ نمونه میگوی جمع‌آوری شده از خرده‌فروشی شهر کرمان در تابستان ۱۴۰۱، ۱۷ نمونه مثبت *V. parahaemolyticus* و ۲ جدایه (۲/۷ درصد) حامل ژن *tdh* شناسایی شد، اما هیچ نمونه‌ای از نظر ژن *trh* مثبت

نبود (Mohseni *et al.*, 2024). با این وجود، در مطالعه‌ای روی ۲۰۰ نمونهٔ دریایی (ماهی، خرچنگ و لابستر) صیدشده از خلیج فارس در تابستان ۱۳۹۲، نرخ بالاتری از سویه‌های بیماری‌زا مشاهده شد؛ به‌طوری‌که فراوانی ژن‌های حدت *tdh*، *tlh* و *trh* به ترتیب ۴۵/۹۳، ۴۰/۴۷ و ۱۶/۴۶ درصد گزارش شد که این موضوع احتمالاً به تفاوت منطقه‌ای، تفاوت زمانی و نوع نمونه‌ها ارتباط داشته باشد (Safarpourdehkordi *et al.*, 2013). در همین راستا، مطالعات مشابهی در سطح جهان نیز گزارش شده است. برای مثال در یک پژوهش، الگوی مقاومت ضد میکروبی سویه‌های *V. parahaemolyticus* جداشده از میگوهای عرضه‌شده در خرده‌فروشی‌های مالزی بررسی شد. شناسایی مولکولی مبتنی بر ژن *toxR* نشان داد که ۵۷/۸ درصد از ایزوله‌ها متعلق به *V. parahaemolyticus* بودند، در حالی‌که تنها ۱۰ درصد از سویه‌های *toxR* مثبت حامل ژن *trh* بودند و هیچ‌یک ژن *tdh* را نداشتند (Letchumanan *et al.*, 2015). بنابراین، الگوی مشاهده‌شده در تحقیق روی نمونه‌های میگوی پرورشی جمع‌آوری شده از مراکز فروش شهر بوشهر با یافته‌های مطالعات پیشین در ایران و جهان مطابقت دارد.

۵. نتیجه‌گیری نهایی

یافته‌های این مطالعه نشان داد اگرچه بخشی از جدایه‌های به‌دست‌آمده از نمونه‌های میگوی پرورشی از نظر ژن‌های *tlh* و *toxR* به‌عنوان نشانگرهای اختصاصی *V. parahaemolyticus* مثبت بودند، اما هیچ‌یک از جدایه‌ها حامل ژن‌های بیماری‌زایی انسانی *tdh* و *trh* نبودند. از منظر سلامت عمومی، این یافته دلالت بر خطر پایین بروز موارد گستردهٔ بیماری‌زایی انسانی ناشی از مصرف میگوهای پرورشی دارد. با این حال، با توجه به حضور این باکتری در اکوسیستم آبی، احتمال افزایش فراوانی سویه‌های بیماری‌زا در دوره‌های بعدی پرورش از طریق عوامل محیطی مانند تغییر دما و شوری و یا تغییر جمعیت میکروبی وجود دارد. بنابراین، نتایج مطالعهٔ حاضر نیازی به هشدار بیماری‌زایی فوری نشان نمی‌دهد اما بر ضرورت ادامهٔ پایش مولکولی، رعایت ملاحظات بهداشتی در مزارع پرورشی و اجرای مقررات کنترل کیفیت در زنجیرهٔ توزیع تأکید می‌کند.

تشکر و قدردانی

نویسندگان برخود لازم می‌دانند از همکاری و مساعدت پژوهشکدهٔ میگوی کشور و دانشگاه شهرکرد جهت انجام این تحقیق نهایت سپاسگزاری را داشته باشند. همچنین از داوران محترم و اساتید ارجمند نشریهٔ شیلات، به‌خاطر ارزیابی مقاله و ارائهٔ نظرات علمی تشکر و قدردانی می‌گردد.

تعارض منافع

نویسندگان مقاله تأیید می‌کنند که هیچگونه تعارض منافع مرتبط با این پژوهش ندارند.

References

Amin, R.A., Salem, A.M., 2012. Specific detection of pathogenic *Vibrio* species in shellfish by using multiplex polymerase chain reaction. *Global Veterinaria* 8(5), 525-531.

Asgarpoor, D., Haghi, F., Zeighami, H., 2018. Detection and molecular characterization of *Vibrio parahaemolyticus* in shrimp samples. *The Open Biotechnology Journal* 12(1), 46-50. DOI: 10.2174/1874070701812010046

Bej, A.K., Patterson, D.P., Brasher, C.W., Vickery, M.C., Jones, D.D., Kaysner, C.A., 1999. Detection of total and hemolysin-producing *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish using multiplex PCR amplification of tlh, tdh and trh. *Journal of Microbiological Methods* 36(3), 215-225. DOI: 10.1016/s0167-7012(99)00037-8

Biswas, A.K., Mandal, P.K., 2020. Current perspectives of meat quality evaluation: Techniques, technologies, and challenges. *Meat Quality Analysis* 3-17. DOI: 10.1016/B978-0-12-819233-7.00001-X

Broberg, C.A., Calder, T.J., Orth, K., 2011. *Vibrio parahaemolyticus* cell biology and pathogenicity determinants. *Microbes and Infection* 13(12-13), 992-1001. DOI: 10.1016/j.micinf.2011.06.013

Ghenem, L., Elhadi, N., Alzahrani, F., Nishibuchi, M., 2017. *Vibrio parahaemolyticus*: a review on distribution, pathogenesis, virulence determinants and epidemiology. *Saudi journal of medicine & medical sciences* 5(2), 93-103. DOI: 10.4103/sjmms.sjmms_30_17

Gutierrez West, C.K., Klein, S.L., Lovell, C.R., 2013. High frequency of virulence factor genes tdh, trh, and tlh in *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated from a pristine estuary. *Applied and Environmental Microbiology* 79(7), 2247-2252. DOI: 10.1128/AEM.03792-12

Hosseini, H., Cheraghali, A.M., Yalfani, R., Razavilar, V., 2004. Incidence of *Vibrio* spp. in shrimp caught off the south coast of Iran. *Food Control* 15(3), 187-190. DOI: 10.1016/S0956-7135(03)00045-8

Hubbard, T.P., Chao, M.C., Abel, S., Blondel, C.J., Abel zur Wiesch, P., Zhou, X., Davis, B.M., Waldor, M.K., 2016. Genetic analysis of *Vibrio parahaemolyticus* intestinal colonization. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113(22), 6283-6288. DOI: 10.1073/pnas.1601718113

Iranian Fisheries Statistical Yearbook, 2019–2023. Iranian Fisheries Organization, Tehran, Iran. 64 p. (in Persian)

Kang, C.-H., Shin, Y., Kim, W., Kim, Y., Song, K., Oh, E.-G., Kim, S., Yu, H., So, J.-S., 2016. Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from oysters in Korea. *Environmental Science and Pollution Research* 23(1), 918-926. DOI: 10.1007/s11356-015-5650-9

Kim, Y.B., Okuda, J., Matsumoto, C., Takahashi, N., Hashimoto, S., Nishibuchi, M., 1999. Identification of *Vibrio parahaemolyticus* strains at the species level by PCR targeted to the toxR gene. *Journal of Clinical Microbiology* 37(4), 1173-1177. DOI: 10.1128/JCM.37.4.1173-1177.1999

Kongchum, P., Chimtong, S., Prapaiwong, N., 2022. Association between single nucleotide polymorphisms of *nLvALF1* and *PEN2-1* genes and resistance to *Vibrio parahaemolyticus* in the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture and Fisheries* 7(4), 373-381. DOI: 10.1016/j.aaf.2021.08.003

Letchumanan, V., Chan, K.-G., Lee, L.-H., 2014. *Vibrio parahaemolyticus*: a review on the pathogenesis, prevalence, and advance molecular identification techniques. *Frontiers in Microbiology* 5, 1-13. DOI: 10.3389/fmicb.2014.00705

Letchumanan, V., Yin, W.-F., Lee, L.-H., Chan, K.-G., 2015. Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Vibrio parahaemolyticu*s isolated from retail shrimps in Malaysia. *Frontiers in Microbiology* 6, 1-11. DOI: 10.3389/fmicb.2015.00033

Martinez-Urtaza, J., Lozano-Leon, A., Varela-Pet, J., Trinanes, J., Pazos, Y., Garcia-Martin, O., 2008. Environmental determinants of the occurrence and distribution of *Vibrio parahaemolyticus* in the rias of Galicia, Spain. *Applied and Environmental Microbiology* 74(1), 265-274. DOI: 10.1128/AEM.01307-07

Mohseni, P., Bagheri, M., Gholamian Adimi, N., 2024. Detection, molecular confirmation and genotypic investigation of virulence factors trh and tdh in *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated from shrimp samples obtained from retail stores in Kerman. *Experimental Animal Biology* 13(50), 11-17. DOI: 10.30473/eab.2025.72666.1968 (In Persian)

Nelapati, S., Krishnaiah, N., 2010. Detection of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* by Polymerase chain reaction using toxR, tdh and trh genes. *Veterinary World* 3(6), 268-271. DOI: 10.5455/vetworld.2010.268-271

Nishibuchi, M., Kaper, J.B., 1995. Thermostable direct hemolysin gene of *Vibrio parahaemolyticus*: a virulence gene acquired by a marine bacterium. *Infection and immunity* 63(6), 2093-2099. DOI:10.1128/iai.63.6.2093-2099.1995

Paria, P., Behera, B.K., Mohapatra, P.K.D., Parida, P.K., 2021. Virulence factor genes and comparative pathogenicity study of tdh, trh and tlh positive *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated from Whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) in India. *Infection, Genetics and Evolution* 95, 105083. DOI: 10.1016/j.meegid.2021.105083

Patel, R., Savalia, C., Kumar, R., Kalyani, I., Gupta, S., Suthar, A., 2018. Isolation, Identification and Molecular Characterization of *Vibrio parahaemolyticus* from Shrimp Samples from South Gujarat of Navsari District. *Journal of Animal Research* 8(1), 131-136. DOI:10.30954/2277-940X.2018.00150.21

Raghunath, P., 2015. Roles of thermostable direct hemolysin (TDH) and TDH-related hemolysin (TRH) in *Vibrio parahaemolyticus*. *Frontiers in Microbiology* 5, 1-4. DOI: 10.3389/fmicb.2014.00805

Rahimi, E., Ameri, M., Doosti, A., Gholampour, A.R., 2010. Occurrence of toxigenic *Vibrio parahaemolyticus* strains in shrimp in Iran. *Foodborne Pathogens and Disease* 7(9), 1107-1111. DOI: 10.1089/fpd.2010.0554

Safarpourdehkordi, F., Hosseini, S., Rahimi, E., Momeni, M., Yahaghi, E., Khodaverdi Darian, E., 2014. Investigate the frequency of virulence genes *Vibrio parahaemolyticus* isolated from fish, lobsters and crabs caught from Persian Gulf. *Iranian Journal of Medical Microbiology* 8(2), 1-7.

Wilson, K., 2001. Preparation of genomic DNA from bacteria. *Current Protocols in Molecular Biology* 56(1), 2-4. DOI: 10.1002/0471142727.mb0204s56