------ مجلة علوم الرافدين، المجلد 27، العدد 3، ص 62-76، 2018 ------

عزل وتشخيص أنواع جنس الضمات من عينات الروبيان الطازج والمجمد وتأكيد تشخيص النوع *Vibrio parahaemolyticus* باستخدام تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل

شاكر غازي جرجيس ***أميرة محمود الراوي**

قسم علوم الحياة/ كلية العلوم/ جامعة الموصل

***E-mail: umnashwa@yahoo.com**

(أستلم 1/ 6 /2014 ؛ قُبل 21 / 2 /2018)

الملخص

أولى البحث اهتماماً بعزل وتشخيص جرثومة *V.parahaemolyticus* من عينات الغذاء البحري (الروبيان). إذ تم جمع 40 عينة روبيان طازجة من الاسواق المحلية لمدينة البصرة بعد اصطيادها مباشرة و20 عينة روبيان مجمدة تركية المنشأ. استخدمت طريقتان للإغناء تضمنت الاغناء في وسط غير انتخابي وهو ماء الببتون القاعدي (APW) لمدة 8 ساعات ثم الاغناء في وسط انتخابي وهو وسط Salt Polymyxin Broth (SPB) لمدة 24 ساعة ثم التلقيح على وسطي Thiosulphate Citrate Bile Sucrose agar (TCBS) و Arabinose Ammonium Sulphate Cholate AASC) agar). اجريت الاختبارات الشكلية والكيموحيوية للمستعمرات النامية على الوسط الانتخابي، كما تم تأكيد تشخيص العزلات باستخدام الوسط المولد للون Chromagar™ Vibrio (CV) ولأول مرة محليا. واخيرا تم تأكيد تشخيص جرثومة *Vibrio parahaemolyticus* باستخدام تفاعل البلمرة المتسلسل للتحري عن الجين *tox R*. حيث اظهرت النتائج عزل الانواع *Vibrio mimicus*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio vulnificus*, *V. parahaemolyticus* بنسب بلغت 45%، 20%، 37.5 ،17.5% من عينت الروبيان الطازجة وبنسب 35%، 20%، 25%، 15% من عينات الروبيان المجمدة على التوالي. كما تبين انسجام التشخيص للعزلات باستخدام الاختبارات الكيموحيوية مع التشخيص باستخدام الوسط المولد للون CV وبينت نتائج تفاعل البلمرة المتسلسل لتأكيد تشخيص جرثومة *V. parahaemolyticus* امتلاك 22 عزلة من مجموع 25 للجين *tox R* الذي يعد جين خاص بالنوع.

الكلمات الدالة: *Vibrio parahaemolyticus*، الروبيان، تفاعل البلمرة المتسلسل.

Isolation and Identification Species of *Vibrio* Genus from Fresh and Frozen Shrimp and Confirmation the Identification of *Vibrio parahaemolyticus* by Polymerase Chain Reaction Technique

Shaker G. Jerjees **Amera M. Al-Rawi**

Department of Biology/ College of Science/ University of Mosul

ABSTRACT

This research was concerned with the isolation and identification of *Vibrio parahaemolyticus* from seafood (shrimp) samples. (40) samples of freshly harvested shrimp from the local markets in Al-Basra city and twenty (20) samples of frozen shrimp (Turkey origin) were collected. Two enrichment methods were used for the enhancement of the growth and isolation of vibrio species, which include enrichment in non selective medium Alkaline peptone water (APW) for 8 hours and then in selective broth salt polymyxin broth (SPB) and then plated on two solid selective media, ThioSulphate Citrate Bile Sucrose agar (TCBS) and Arabinose Ammonium Sulphate Cholate agar

(AASC) and morphological, cultural and biochemical tests were performed on the colonies grown on selective media, then we confirmed the identification by using the chromogenic medium Chromagar™ Vibrio for the first time locally. Finally *tox R* based polymerase chain reaction was used to cofirm the identification of *V. parahaemolyticus.* The results showed the isolation of *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio mimicus* in percentage 45%, 20%, 37.5%, 17.5% from fresh shrimp, 35%, 20%, 25%, 15% from the frozen shrimp respectively. The results also showed that there is an accordenance between biochemical tests and Chromagar™ Vibrio. The results of *tox R* based PCR revealed that 22*l*25 of *V. parahaemolyticus* contain the *tox R* gene which is species-specific gene.

Keywords: *Vibrio parahaemolyticus*, Shrimp, Polymerase Chain Reaction.

المقدمة

تعد أنواع جنس الضمات جراثيم سالبة الكرام، لا هوائية اختيارية، عصيات منحنية الشكل، غير مكونة للسبورات، موجبة لاختباري الاوكسيديز والكتاليز، متحركة بأسواط قطبية ويتثبط نموها بالمركب 0129 المثبط للضمات (Austin, 2010). إذ تتواجد هذه الجراثيم بصورة طبيعية في بيئات البحار لأنها مقاومة لتراكيز عالية من ملح الطعام، وترتبط أنواع عديدة منها مع الامراض المنقولة بالأغذية وفسادها كما تعد بعض انواعها ممرضة بصورة متخصصة للإنسان مثل النوعين *V. parahaemolyticus* و *Vibrio. cholerae* التي تسبب الامراض المعوية الخطرة، يضم جنس الضمات 65 نوعاً الا أن 12 نوعاً منها وصفت كممرضات للإنسان وهي *V. , V fluvialis, V. damsel, V. hollisae, V. mimicus, V. cholerae V. parahaemolyticus, V. vulnificus, V. cincicnateinsis, V. metschniciovi, V carchariae, furnissii* (Nair *et al.*, 2009)، وتعد الأنواع *V. vulnificus, V. parahaemolyticus, V. cholerae* الأكثر أهمية من الناحية السريرية والمسؤولة عن معظم الامراض المنقولة بالأغذية (Austin, 2010). كما وصفت الضمات بأنها مسببات رئيسة للالتهاب المعدي - المعوي المرتبط باستهلاك الاغذية البحرية (Wagley *et al.*, 2009)، حيث تنتشر جرثومة *V. parahaemolyticus* بصورة واسعة في البيئات البحرية وهي مسبباً رئيساً للأمراض المرتبطة باستهلاك القشريات والاسماك الطازجة او غير المطبوخة او الملوثة بعد الطبخ ويمكن أن تسبب اصابات معدية - معوية متوسطة الى شديدة وتكون مسؤولة عن 25% من مجموع الامراض المنقولة بالغذاء مقارنة مع اصابات الانواع الاخرى من الضمات (Feldhusen, 2000). تستخدم طرق عديدة للتحري عن جراثيم الضمات في عينات الاغذية البحرية ثم نشأت عدة بروتوكولات للتحري عن النوعين , *V. parahaemolyticus V. cholerae* في العينات المختلفة ومنها بروتوكول الخطوتين من الاغناء الاول في وسط غير انتخابي ثم الاغناء في وسط انتخابي والتلقيح على الوسط الصاب الانتخابي القياسي TCBS إلا أن هذا البرتوكول يعد مستهلكاً للجهد والوقت اضافة الى ان وسط TCBS لا يميز جرثومة *V. cholerae* عن بعض سلالات *V. alginolyticus* و *V. fluvialis*وجرثومة *V. parahaemolyticus* عن النوعين *V. mimicus,V.vulnificus*. (Donovan and Van, 1995).

وبسبب ضراوة جرثومة *V. parahaemolyticus* وما تمتلكه من عوامل ضراوة منها انتاج التوكسينين TDH و TRH ولغرض منع الاصابة بها يتم اجراء التقييم الميكروبي للأغذية البحرية باستخدام الطرق الزرعية التقليدية ثم التشخيص بالاختبارات الكيموحيوية والتي من سلبياتها انها تعطي نتائج موجبة كاذبة او نتائج سالبة (Croci *et al.*, 2007). لذا تشير اغلب الدراسات المهتمة بالتقييم الميكروبي لعينات الاغذية البحرية الى ضرورة اجراء الاختبارات الجزيئية مثل تفاعل البلمرة المتسلسل لأجل تأكيد تشخيص العزلات المشخصة اولا بالطرق المظهرية والكيموحيوية لتلافي اخطاء التشخيص الروتيني (Sujeewa *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 1999). ان ادخال المواد المتفلورة والمولدة للون مباشرة الى الوسط الزرعي الصاب للكشف عن الفعالية الانزيمية المتخصصة بأنواع الجراثيم ادى الى التمييز الدقيق للجراثيم المختلفة اضافة الى

التشخيص السريع مباشرة على اوساط العزل الاولية (Manafi, 1996). وعموماً تُظهر الاوساط المولدة للون حساسية وتخصصية فائقة مقارنة مع الاوساط الانتخابية التقليدية وحديثاً ظهرت اوساط مولدة للون عديدة لعزل افراد الضمات والتمييز فيما بينها مثل اوساط ChromID ™ Vibrio التي تميز النوعين *V. cholare*, *V. parahaemolyticus* عن الأنواع الأخرى من الضمات، كما اكتشف وسط اخر هو Chromagar ™ Vibrio والذي يعد ايضاً انتخابياً و تفريقياً لجرثومة *V. parahaemolyticus* عن بقية الأنواع من خلال ظهور مستعمرات بنفسجية اللون خاصة بها فيما تظهر الانواع الاخرى ألوانا مختلفة اعتماداً على الفعالية الانزيمية على المادة الاساس الموجودة في الوسط ألزرعي (Eddabra *et al.*, 2011).

المواد وطرائق العمل

جمعت 40 عينة روبيان طازج من الاسواق المحلية في محافظة البصرة/ جنوب العراق ووضعت في قنانٍ معقمة. وكذلك جمعت 20 عينة روبيان مجمدة من الاسواق المحلية (ذات المنشأ التركي) ووضعت في قنانٍ معقمة وحفظت جميعها في صندوق حاوٍ على الثلج لحين ايصالها الى المختبر ومن ثم حفظت بالتجميد لحين اجراء الاختبارات البكترويولوجية عليها.

أزيلت أغلفة عينات الروبيان الطازجة وغسلت بالماء المقطر المعقم تحت الظروف المعقمة ثم وزن 25 غم من قطع الروبيان واضيفت الى 225 سم^3 من وسط ماء البيتون القاعدي APW وسحقت بالخلاط والخليط يمثل التخفيف 10^{-1}، أجريت سلسلة تخافيف منها لغاية 10^{-5} ثم نقل 1 سم^3 من التخافيف الاخيرة الى 10 سم^3 من وسط APW وحضنت لمدة 8 ساعة بدرجة 37°م وبعد انتهاء فترة التحضين نقل منها 1 سم^3 الى 10 سم^3 من وسط البوليمكسين والملح السائل (SPB) وحضنت لمدة 6 ساعات بدرجة حرارة 37°م نقل منها حملة لوب ولقحت بطريقة التخطيط على اوساط العزل الاولي الانتخابية TCBS، وسط Chrom agar ™ Vibrio (Hara-Kudo *et al.*, 2003).

الأوساط الغذائية المستخدمة في العزل والتشخيص: حضرت حسب تعليمات الشركة المجهزة (مع اضافة 3% من NaCl الى كل وسط (Kaysner and De paola, 2004) وضبط الاس الهيدروجيني، وعقمت بالموصدة بدرجة 121°م لمدة 15 دقيقة اعتماداً على ما ذُكر في (Koneman *et al.*, 2006 ; Kaysner and Depaola, 2004).

وشملت الأوساط الآتية: ماء البيتون القاعدي (APW)، البوليمكسين والملح السائل (SPB)، وسط Carry Blair الناقل، التربتون السائل، التربتون الصلب، وسط TCBS، مولر ديكاربوكسيليز السائل، ماء البيتون، الفينول الأحمر الأساس، سايمونس ستريت، وسط مرق النترات، وسط الحركة، ماء البيتون والكلوكوز والفوسفيت، آكار الحديد ثلاثي السكريات، وسط العج، وسط تحمل الملوحة، وسط Chrom agar TM Vibrio (Kaysner and De Paola, 2004 ؛ Koneman *et al.*, 2006).

حضرت صبغة كرام Gram stain و كواشف الاوكسديز، الكتاليز، كوفاكس، المثيل الاحمر، باريت، اختزال النترات، sodium deoxycholate 0.5% حسب ما جاء في(Atlas *et al.*, 2010،Benson, 2003).

أجريت مجموعة من الاختبارات على مرحلتين اعتماداً على ما ذكره الباحث Otteavaini وجماعته (2003) وكما يلي:

طور التشخيص الأولي لجنس الضمات: أجريت فيها ثلاثة اختبارات لغرض التشخيص على مستوى الجنس شملت اختبار تحمل الملوحة بتركيز 3% من NaCl، اختبار الاوكسيديز، اختبار الاكسدة - الأختزال للكلوكوز (Elliot *et al.*, 2003). كما اجري اختبار String test على المستعمرات التي اعطت نتيجة موجبة لاختبار الاوكسيديز ويعد هذا الاختبار تشخيصي لأفراد جنس الضمات عن جنسي *Aeromonas* و*Pleisomonas* الموجبة لاختبار انزيم الاوكسديز، اجري الاختبار بمزج 2-3 مستعمرات منفردة فتية عمرها 24 ساعة نامية على وسط Blood agar مع قطرة من محلول 0.5% Sodium deoxycholate على شريحة زجاجية نظيفة وقُرئت النتيجة بعد دقيقة واحدة من المزج من خلال ملاحظة تكّون أو عدم تكّون كتلة لزجة يمكن سحبها بواسطة اللوب بمظهر خيطي (Prescott *et al.*, 2011).

طور التشخيص على مستوى النوع: استخدم مخطط (Alsina and Blanch, 1994 a, b) لغرض التشخيص الدقيق لكل الأنواع التابعة لجنس الضمات وشملت اختبارات تحلل الأحماض الامينية الثلاثة (الارجنين، اللايسين، الاورنثين)، اختبارات استهلاك السكريات (السكروز، السيليبايوز، اللاكتوز، الارابينوز، المانوز، المانيتول،السالسين،الاينوسيتول)، اختبار اختزال النترات.

ثم حضرت مسحات رقيقة من المستعمرات النامية على أوساط العزل الأولي الانتخابية وصبغت بصبغة كرام وفحصت بالمجهر الضوئي لملاحظة قابلية الاصطباغ وشكل الخلايا.

كما تم اختبار إنتاج أنزيم الكتاليز، اختبار إنتاج انزيم السايتوكروم-اوكسديز، اختبار اختزال النترات، اختبار إنتاج الاندول، اختبار فوكس-بروسكور، اختبار المثيل الأحمر، اختبار استهلاك السترات، اختبار الحركة، اختبار النمو على وسط TSI، اختبار الاكسدة-الاختزال للكلوكوز، اختبار انتزاع مجموعة الكاربوكسيل من الأحماض الامينية اللايسين والارجنين والاورنثين، اختبار النمو في درجة حرارة 43°م حيث أجريت هذه الاختبارات اعتماداً على ما جاء في (Atlas, 2010; Koneman *et al*., 2006).

ولمعرفة قابلية تحمل الملوحة، لقحت العزلات النقية الفتية في وسط Tryptone broth الحاوي على تراكيز مختلفة من ملح الطعام NaCl هي (0%، 1%، 3%، 6%، 8%، 10%) وحضنت بدرجة 37°م لمدة 24 ساعة تحت الظروف الهوائية ولوحظت العكورة في الأنابيب الملقحة وحددت قابلية نمو العزلات المختبرة في التراكيز المدروسة (Kaysner and De Paola, 2004).

ولتأكيد تشخيص جرثومة *V. parahaemolyticus*، انتخبت مستعمرات فتية نقية ولقحت بالتخطيط على وسط Chromo agar ™ vibrio وحضنت بدرجة 37°م لمدة 24 ساعة. فحصت الأطباق بعد انتهاء التحضين لقراءة النتيجة بدلالة ألوان المستعمرات المتكونة وصورت المستعمرات فوتوغرافيا. كما تم إجراء تفاعل البلمرة المتسلسل للتحري عن الجين *toxR* في عينات الـ DNA المستخلص من مزارع جرثومة *V. parahaemolytcus*.

المواد والمحاليل المستخدمة في إستخلاص الحامض النووي والترحيل الكهربائي: وسط Luria- Bertani السائل، محلول دارئ TE (Tris- EDTA PH: 8.0)، محلول دارئ التحميل Loading buffer، محلول صبغة الاثديوم بروميد بتركيز 0.5 مايكروغرام/ سم^3، محلول Tris- Borate- EDTA (TBE 10X)، مؤشر الحامض DNA Ladder (100bp)، هلام الاكاروز بتركيز 1.3 %، محلول Tris- Borate-EDTA (1X)، هلام الاكاروز بتركيز 1%.

عدة استخلاص الدنا الجرثومي: تم استيراد العدة E.Z.N. A Bacterial Extraction DNA Kit من شركة Omega الانكليزية.

طريقة استخلاص الحامض النووي من مزارع جرثومة *V. prarahaemolytics*: اجريت عملية الاستخلاص حسب تعليمات الشركة المجهزة (Omega الانكليزية).

البادئات: استخدم زوج من البادئات اعتمادا على ما ذكر الباحث Kim وجماعته (1999) تتابع هذه البادئات هي

toxR F: 5- ATACGAGTGGTTGCTGTCATG- 3

toxR R: 5- GTCTTCTGACGCAATCGTTG- 3

تحضير البادئات: حضر المحلول الخزين Stock solution لكل بادئ من زوجي البادئات بإضافة الماء المقطر المعقم اعتمادا على تركيز كل بادئ ومن ثم تم تحضير تركيز 10 picomol/µl من البادئ.

استخدم GoTaq R Green Master mix المجهز من شركة Promega الأمريكية لأجراء التفاعل في تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل للتحري عن الجين *toxR*. حضر 50 مايكروليتر من الحجم النهائي للتفاعل وفق تعليمات الشركة المجهزة كما موضح في الجدول التالي:

2 X Gotaq Green master mix	25 مايكروليتر
Fwd primer (10 picomol)	2 مايكروليتر
Rev primer (10 picomol)	2 مايكروليتر
Template (100 ng/ µl)	4 مايكروليتر
Free nuclease water	17 مايكروليتر

تم برمجة جهاز التضخيم الحراري بالظروف المناسبة للتضخيم وهي 96 م° لمدة 5 دقائق لغرض المسخ الاولي واجريت 30 دورة تتضمن 94 م° لمدة 1 دقيقة لغرض المسخ و63 م° لمدة 90 ثانية لغرض الازدواج و 72 م° لمدة 90 ثانية لغرض الاستطالة واجريت اخيراً دورة نهائية من الامتداد عند 72 م° لمدة 10 دقائق، ثم وضعت انابيب الابندروف بسعة 200 مايكروليتر في الجهاز لحين انتهاء برنامج التضخيم (Kim *et al*., 1999). ولغرض التأكد من عملية تضخيم الحامض النووي اجريت عملية الترحيل الكهربائي حيث اضيف 10 مايكروليتر من الدنا المؤشر marker DNA ذي حجم 100 bp إلى الحفرة الاولى واضيف 10 مايكروليتر من السيطرة السالبة للحفرة الثانية التي هي عبارة عن خليط التفاعل مع البادئات ولكن بدون الدنا القالب ثم أضيف 10 مايكروليتر من نواتج التضخيم إلى جميع حفر هلام الاكاروز المغمور في محلول (1X) TBE بعناية ما عدا الحفرة الاولى والثانية و ربط مجهز القدرة مع حوض الترحيل ومرر التيار الكهربائي بقدرة 85 فولت ولمدة 90 دقيقة، ثم نقل الهلام إلى جهاز UV- Transilluminator لملاحظة حزم نواتج التضخيم وصورت فوتوغرافياً.

النتائج والمناقشة

بينت نتائج زرع عينات الروبيان الطازجة والمجمدة ظهور مستعمرات ملساء مختلفة الالوان بعد التحضين لمدة 24 ساعة بدرجة 37 م°. والصورة 1 توضح مستعمرات تابعة لأفراد الضمات وتم التأكد من ذلك بأجراء اختبارات الاوكسيديز واختبار String وتحمل 3%من Nacl التي تعد ايجابية للضمات وهذا ما اكدته دراسات عدة (Kysner and De Paola, 2004; Jayasinghe *et al*., 2008).

وعند استخدام طريقة الاغناء الثنائية لعزل *V. parahaemolyticus* ابدت كفاءة عالية في تثبيط الانواع الاخرى من الضمات والحصول على مستعمرات منفردة تتميز بلونها الاخضر ذي المركز المعتم واتفقت هذه النتيجة مع دراسة Hara-Kudo وجماعته (2001) بسبب احتواء الوسط على المضاد الحيوي البوليمكسين الذي يثبط نمو الانواع الاخرى من الضمات ويسمح بنمو *V. parahaemolyticus* و(الصورة 2) توضح نمو مستعمرات الجرثومة على وسط TCBS. ابدت نتائج الزرع على الوسط TCBS ظهور مستعمرات خضراء اللون ملساء تابعة للنوع *V. mimicus* (الصورة 3). اما جرثومة *V. vulnificus* فقد ظهرت اغلب عزلاتها بشكل مستعمرات خضراء-مزرقة ملساء بقطر 2-4 ملم (الصورة 4)، اما بعض عزلاتها فظهرت بشكل مستعمرات صفراء اللون لأنها مخمرة لسكر السكروز. في حين بدت مستعمرات النوع *V alginolyticus* صفراء بقطر 3-5 ملم منتشرة على وسط TCBS لأنها تمتلك ظاهرة العج المميزة لها (الصورة 5). اتفقت نتائجنا مع دراسات (Jayasinghe *et al*., 2008; Janda *et al*., 1988; Elliot *et al*., 2003) التي اشارت الى ان الوسط TCBS يعد وسط عزل اولي قياسي انتخابي وتفريقي ما بين انواع الضمات اعتماداً على تخميرها لسكر السكروز.

بينت نتائج الفحص المجهري للمسحات المصبوغة بصبغة كرام المحضرة من المستعمرات النامية على وسط TCBS التابعة لأفراد جنس الضمات ظهور خلايا عصوية قصيرة سالبة لصبغة كرام, بأشكال متغايرة منحنية ومستقيمة، كروية وأشكال منتفخة مرتبة بهيئة ازواج او مفردة او بصورة غير منتظمة (الصورة 6) واتفقت هذ النتائج مع ما اشارت اليه دراسات (Koneman *et al.*, 2006; Elliot *et al.*, 2003). وبالنسبة لعزلات جرثومة *V. parahaemolyticus* فقد ظهرت خلاياها بشكل عصيات قصيرة مستقيمة الى منحنية الشكل سالبة الكرام وان قسماً من خلاياها تميل لأخذ الصبغة بكثافة عند قطبي الخلية bipolar staining وتترتب بشكل مفرد او ثنائيات (الصورة 7)، واشارت دراسة Koneman وجماعته (2006) بان انواع جنس الضمات تبدو بشكل خلايا مستقيمة او منحنية وان صفة الخلايا المنحنية تلاحظ عادة في بداية طور الثبات في المزارع السائلة اما في الطور اللوغارتيمي فتلاحظ خلايا مستقيمة او اشكال مكورة ذات نهايات مدورة مع وجود نسبة قليلة من الخلايا المنحنية.

الجدول 1: نتائج الاختبارات الكيموحيوية المستخدمة في تشخيص انواع جنس الضمات

الاختبارات الكيموحيوية	الأنواع الجرثومية			
	V. mimicus	*V. alginolyticus*	*V. vulnificus*	*V. parahaemolyticus*
لون المستعمرة على TCBS	أخضر	أخضر	أزرق	أخضر
لون المستعمرة على CV	أزرق	كريمي	أزرق	بنفسجي
اختبار الأكسيدين	+	+	+	+
اختبار الكاتاليز	+	+	+	+
اختبار String	+	+	+	+
النمو في 0% من Nacl	+	-	-	-
النمو في 3% من Nacl	+	+	+	+
النمو في 6% من Nacl	V	+	+	+
النمو في 8% من Nacl	-	+	-	+
النمو في 10% من Nacl	-	+	-	-
اختبار O/F	F	F	F	F
النمو في درجة 43 م°	+	+	+	+
اختبار TSI	K/A - -	A/A - -	K/A - -	K/A - -
تحلل الحامض الأميني اللايسين	+	+	+	+
تحلل الحامض الأميني الأورنثين	+	V	V	+
تحلل الحامض الأميني الأرجنين	-	-	-	-
اختبار الحركة	+	+	+	+
اختبارات IMVC	+ - + +	+ + + +	V - + +	+ - + +
انتاج الغاز من تخمير الكلوكوز	-	-	-	-
اختزال النترات	+	+	+	+
تخمر سكر اللاكتوز	-	-	+	-
تخمر سكر السكروز	-	+	V	-
تخمر سكر السالسين	-	-	-	-
تخمر سكر المانوز	+	+	+	+
تخمر سكر الأرابينوز	-	-	-	+
تخمر سكر السيليبايوز	-	-	+	V

V: Variable F: Fermentative A: Acid K: Alkaline

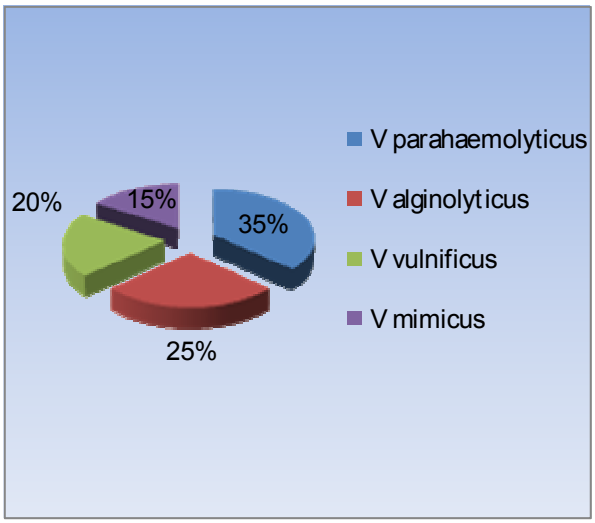
أعطت مستعمرات أنواع الضمات نتيجة موجبة لاختبار string بدلالة تكون خيط لزج من الـ DNA بعد اضافة قطرتين من 0.5 % من sodium deoxycholate الى حملة لوب من النمو واستمر ظهور الخيط لمدة 45 ثانية (الصورة 8) وهذا ما اشار اليه (Prescott *et al.*, 2011) . اعطت كل انواع جنس الضمات نتيجة موجبة لاختبار انزيم السايتوكروم بدلالة ظهور لون بنفسجي كما اعطت كل العزلات نتيجة موجبة لاختبار انزيم الكتاليز وجاءت النتيجة متفقة مع (Kaysner and De Paola, 2004)،

أعطت عزلات *V. parahaemolyticus*، *V. alginolyticus*، *V. vulnificus*، *V. mimicus* نتيجة موجبة لاختبار تحمل الملوحة بدلالة ظهور عكارة في وسط TSB الحاوي على 3% من Nacl بعد تحضينها بدرجة 37 لمدة 24 ساعة مما يوكد على انها تابعة لأفراد جنس الضمات اذ لا تستطيع جراثيم *Aeromonas* , *Pleisomonas* من النمو في هذا التركيز. واظهرت النتائج ظهور نتيجة موجبة لاختبارO/F اي انها تستطيع النمو في الظروف الهوائية واللاهوائية مما يدل على امتلاكها لايض تخمري وتأكسدي في الوقت نفسه كما أعطت كل العزلات نتيجة سلبية لإنتاج الغاز من تخمير سكر الكلوكوز التي تعد صفة تشخيصية مميزة لكل افراد الضمات واظهرت النتائج عدم قدرة العزلات الجرثومية على انتاج غازي H_2S و Co_2 التي تعد صفة تشخيصية وتفاوتت الانواع في تخميرها للسكريات الثلاثة وجاءت النتائج متفقة مع دراسات (Barrow and Felthan, 1993 ; Koneman *et al.*, 2006 ; Kaysner and Depaola, 2004).

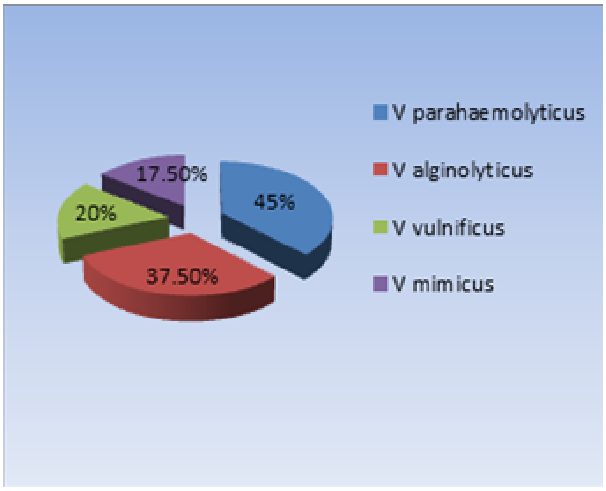
أظهرت النتائج قدرة النوع *V. parahaemolyticus* من النمو في تراكيز 3%، 6%، 8% من ملح الطعام ولم تستطع النمو بدونه لذا تسمى هذه الجرثومة مع النوعين *V. alginolyticus* ، *V. vulnificus* بالضمات المحبة للملوحة Halophilic vibrios اذ لا تستطيع النمو إلا بوجود على الاقل 1% من Nacl كما بينت النتائج قدرة الجرثومة *V. alginolyticus* على النمو في تراكيز 3%، 6%، 8%، 10% من Nacl ولم تستطع النمو بدونه وان صفة النمو بتركيز 10% تعد تشخيصية لهذه الجرثومة لأنها الوحيدة القادرة على النمو بهذا التركيز واتفقت هذه النتائج مع (Koneman *et al.*, 2006).

بينت النتائج تباين العزلات في قدرتها على استهلاك السكريات وعلى الاخص السكروز واظهرت النتائج اختلاف الانواع في قدرتها على تحليل وازالة الكاربوكسيل من الاحماض الامينية الارجنين واللايسين والاورنثين كما موضح في الجدول (1)، واظهرت جميع الانواع القدرة على الحركة و هذا يتفق مع ما اشارت إليه (*Elliot et al.*, 2003 ; Koneman *et al.*,2006) التي اكدت قابلية جميع انواع الضمات على الحركة. بالنسبة لاختبار اختزال النترات اظهرت جميع العزلات القدرة على اختزال النترات الى نتريت، أما اختبارات IMVC فقد اختلفت ما بين الانواع الجدول (1). اظهرت عزلات الانواع الاربعة قدرة على النمو في درجة حرارة 43 م° واتفقت النتيجة مع دراسة (Kaysner and De Paola, 2004).

بينت نتائج زرع عينات الروبيان الطازجة والمجمدة المغناة حسب الطريقة الموصوفة من قبل Hara-Kudo وجماعته (2001) عزل الأنواع الأربعة من أفراد جنس الضمات (الشكلين 1،2) اذ يوضح الشكل الاول والثاني نسب عزل الانواع الاربعة من عينات الروبيان الطازجة والمجمدة على التوالي:



الشكل 1: نسب عزل أنواع جنس الضمات من عينات الروبيان الطازج.



الشكل 2: نسب عزل أنواع جنس الضمات من عينات الروبيان المجمد

واتفقت نتائج العزل في دراستنا مع نتائج العديد من الدراسات التي اشارت الى تواجد جراثيم *V. alginolyticus, V. mimicus, V. vulnificus, V. parahaemolyticus* بنسب عالية في عينات الاغذية البحرية الطازجة، ولاسيما الروبيان والمحار المصطادة من مياه المناطق الساحلية الدافئة لأنها تعد فلورا طبيعية لهذه المناطق وفي الحيوانات البحرية المستوطنة لهذه المياه (Maugeri *et al.*, 2000 ؛ Hui-Min, 2014 ؛ Gomathi *et al.*, 2013). بالنسبة لعزل جرثومة *V. parahaemolyticus* فقد عزلت بنسبة 45 و35% من الروبيان الطازج والمجمد على التوالي، واتفقت هذه النتيجة مع دراسة الباحث Khan و جماعته (2007) الذين عزلوا الجرثومة بنسبة 45% فيما توصل الباحث Pal and Das (2010) والباحث Maniyan-Kode وجماعته (2013) الى نسبة بلغت 75% من عينات الاغذية الطازجة. إن سبب الاختلاف قد يعزى الى اختلاف الموقع الجغرافي والظروف البيئية مثل درجة الحرارة ونسبة الملوحة فضلا عن اختلاف ظروف الاغناء والاوساط المستخدمة.

وفي دراستنا عزلت جرثومة *V. alginolyticus* بنسبة 37.5% و25% من عينات الروبيان الطازج والمجمد (الشكل 1) واتفقت النتيجة مع دراسة Maugeri وجماعته (2000) ولكنها اختلفت مع دراسة الباحثين (Gomathi *et al.*,2013؛ Mannas *et al.*, 2010) الذين عزلوا الجرثومة بنسب عالية بلغت 81% و 80% على التوالي وان سبب ذلك قد يعزى الى اختلاف الموقع الجغرافي والظروف البيئية مثل درجة الحرارة ونسبة الملوحة فضلا عن عدم توفير ظروف مناسبة مثالية لتشجيع نمو الجرثومة.

عزلت جرثومة *V. mimicus* بنسبة 17.5% و 15% من عينات الروبيان الطازج والمجمد على التوالي (الشكل 2) وهذا يتفق مع نتائج الباحثين (Adebayo-Tayo *et al.*, 2011؛ Maugeri *et al.*, 2000). كما عزلت كمسبب رئيسي لأمراض الالتهاب المعدي-المعوي لدى الأشخاص الذين استهلكوا الاغذية البحرية والاسماك الطازجة كما تمتلك عوامل

ضراوة مختلفة مما تجعلها قادرة على احداث الاصابة للإنسان والحيوانات البحريـة (Janda *et al.*,1988 ؛ Gomathi *et al.*, 2013).

ومن الشكلين1 و2 يتبين ان الجرثومة *V. vulnificus* عزلت بنسبة 20% من عينات الروبيـان الطـازج والمجمـد وجاءت النتيجة مقاربة لدراسة (Hui-Min, 2014) الذي بين عزلها بنسبة 14.1% من عينات الروبيان الطازجة فيما عزلـت بنسبة أقل في دراسة (Adebayo-Tayo *et al.*, 2011) بلغت 1.9% وبمقارنة نسب العزل من عينات الروبيـان المجمـدة يلاحظ ان النسب واطئة مقارنة مع نسب عزلها من عينات الروبيان الطازج وان سبب ذلك قد يعزى الـى حـدوث تثبـيط او تحطيم لهذه الجراثيم اثناء عملية التجميد اذ تعد افراد جنس الضمات حساسة جدا لدرجة حرارة التجميد مما ادى الى اختزال في نسب عزلها وهذا ما اكدته الدراسات (Cook, 1994 ; Drake *et al.*, 2007).

الجدول 2: مقارنة بين نتائج تشخيص الانواع بالاختبارات الكيموحيوية واستخدام الوسط Chromagar™ Vibrio

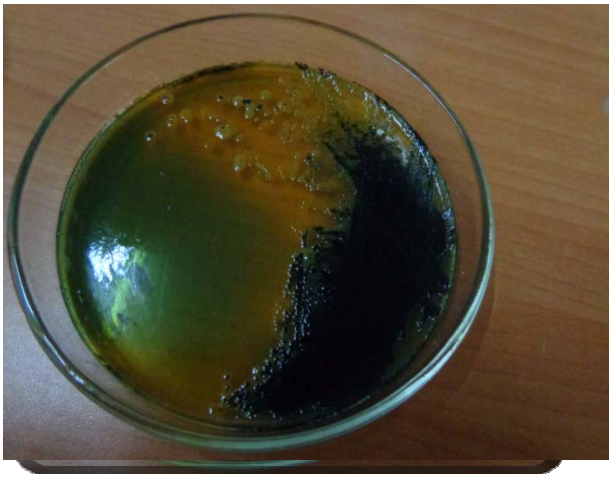
ت	العزلات الجرثومية	عدد العزلات المشخصة بالاختبارات الكيموحيوية	عدد العزلات باستخدام وسط CV
.1	*V. parahaemolyticus*	25	23
.2	*V .vulnificus*	12	10
.3	*V. mimicus*	10	8
.4	*V. alginolyticus*	20	17

يبين الجدول (2) نتائج تشخيص الانواع بالاختبارات الكيموحيويـة وباسـتخدام الوسـط Vibrio ChromagarTM اذ لقحت العزلات المشخصة بالاختبارات الكيموحيوية على الوسط Vibrio Chromagar TM (CV) لغرض تأكيد تـشخيص الأنواع إذ أعطت عزلات *V. parahaemolyticus V. alginolyticus, V. vulnificus. V. mimicus*، وأظهرت نتائجنـا بان 23 من مجموع 25 عزلة تابعة لجرثومة *V. parahaemolyticus* اعطت المستعمرات بنفسجية اللون لأنها تمتلك الانزيم β-D-glucopyranosidase الذي يحلل المادة الاساس الموجودة بالوسط مما يكسبها اللـون البنفـسجي واظهـرت عـزلات النوعين *V. vulnificus V. mimicus*، مستعمرات زرقاء اللون لأنها انتجت الانزيم galactopyranosidase أما عـزلات النوع *V. alginolyticus* فقد ظهرت بيضاء الى كريمية اللون لعدم امتلاكها للإنزيمين واتفقت النتيجة مع (Hara-Kudo *et al.*, 2001). الذي يعد انتخابيـاً لاحتوائـه علـى ملـح الطعـام بتركيـز 4%، ox bile ، sodium cholate، sodium deoxycholate فضلا عن الدالة الحامضية القاعدية 9.2 ويعد تفريقياً لاحتوائه على مـادتي 5-Bromo-4-Chloro-β-D-galactopyranoside و5-Bromo-4-Chloro-β-D-glucopyranoside فـالأنواع التـي تنـتج أنـزيم β -D-galactopyranosidase تعطي مستعمرات زرقاء اللون اما التي تنتج انـزيم β-D- glucopyranosidase فإنهـا تكـون مستعمرات بنفسجية اللون أما التي لا تنتج الانزيمين فتظهر بشكل مستعمرات بيضاء-كريمية اللـون (Hara-Kudo *et al.*, 2001). والصور (9، 10) توضح نمو مستعمرات الانواع الاربعة المعزولة على وسط CV.

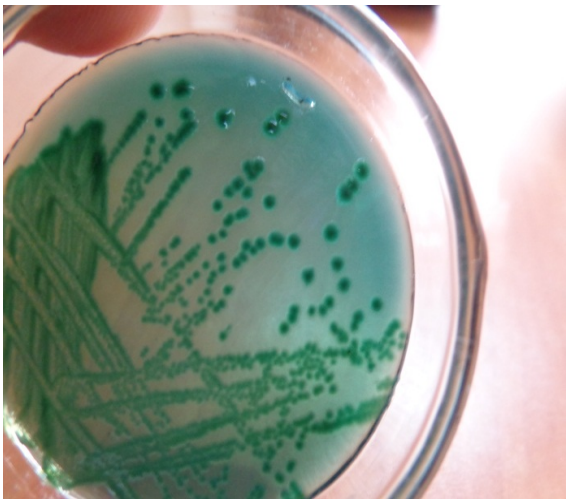
أجريت عملية استخلاص الحامض النووي لعزلات جرثومة *V. parahaemolyticus* البـالغ عـددها 25 واظهـرت النتائج ظهور حزم على هلام الاكاروز الصورة (11)، وخففت عينات الدنا العالية التركيز الى تركيز 50-100 نانوغرام لكـل مايكروليتر لتهيئتها لتفاعل البلمرة المتسلسل لغرض تفادي ظهور حزم dimer، تم إجراء تفاعل البلمرة المتسلسل للتحري عن الجين *toxR* وأظهرت النتائج بعد ترحيل نواتج التضخيم على هلام الاكاروز بنسبة 1.3% ظهور حزم بحجم 368 زوج قاعدة تقريبا اعتمادا على مقارنتها مع الدليل الحجمي المستخدم الصورة (12). أي أن 25/22 من الجرثومة *V.parahaemolyticus* امتلكت الجين *toxR* واتفقت هذه النتيجة مع العديد من الدراسات التي ذكرت بان تفاعل *toxR* based PCR يعد كفوء ودقيقاً

جداً في تأكيد تشخيص *V. parahaemolyticus* المعزولة من عينات الأغذيـة البحريـة والـسريرية، إذ أشـارت دراسـة Sujeewa وجماعته (2009) إلى تشخيص 128 عزلة من *V. parahaemolyticus* من مجموع 251 عينة باستخدام تفاعل البلمرة المتسلسل للجين *toxR*. تحتوي كل سلالات النوع *V. parahaemolyticus* على جين منظم هو *toxR* الذي يتواجد في جميع سلالاتها بغض النظر عن كونهـا منتجـة للتوكـسينين TDH,TRH المـشفرين مـن الجينـين *tdh, trh* وأشـارت دراسات؛ (Lee *et al*., 1995 ؛ Dileep *et al*., 2003 ؛ Karunasagar *et al*., 1997 ؛ Kim *et al*., 1999) إلـى أن طريقة PCR *toxR* تعد طريقة تشخيص كفؤة وحساسة لتشخيص سلالات *V. parahaemolyticus* .

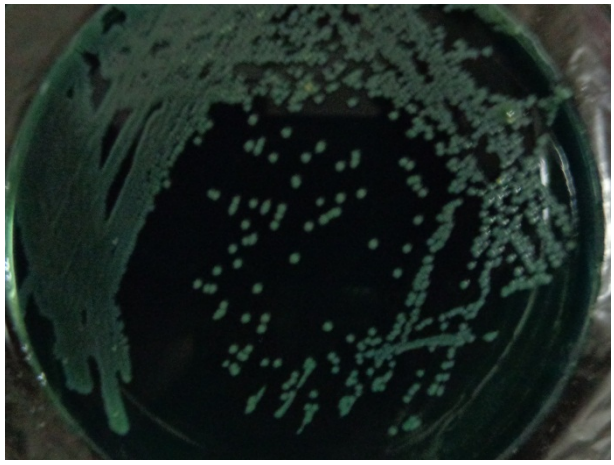
في دراستنا لم تظهر 3 من عزلات الحزم المتخصصة بحجم 368 زوج قاعدة المشخصة على أنها جرثومة *V. parahaemolyticus* حسب الاختبارات المظهرية و الكيموحيوية عند إجراء PCR *toxR* وهذا يؤكد دقة PCR *toxR* في التشخيص المتخصص للجرثومة المعزولة من عينات الروبيان واتفقت النتيجة مع دراسة الباحث Kanjanasopa وجماعته (2011) الذين أشاروا إلى أن بعض العزلات التي أعطت مستعمرات خضراء واختبارات كيموحيوية خاصة *V. parahaemolyticus* لم تمتلك الجين toxR وهذا ما أكدته أيضا دراسة الباحث Hara-Kudo وجماعته (2003) الذين أشاروا إلى وجود عدة محددات وسلبيات باستخدام وسط TCBS والاختبارات الكيموحيوية للتشخيص الدقيق لعزلات النوع *V. parahaemolyticus* في السنوات الأخيرة إذ تشابه مستعمراتها على وسط TCBS مستعمرات الأنواع الأخرى من الضمات مثل *V. vulnificus*. و *V. mimicus* وأنواع *V. fluvialis*، *photobacterium* و *chryseomonas* و *shewanella* فضلا عن تغاير الاختبارات الكيموحيوية وتباينها حسب السلالات.



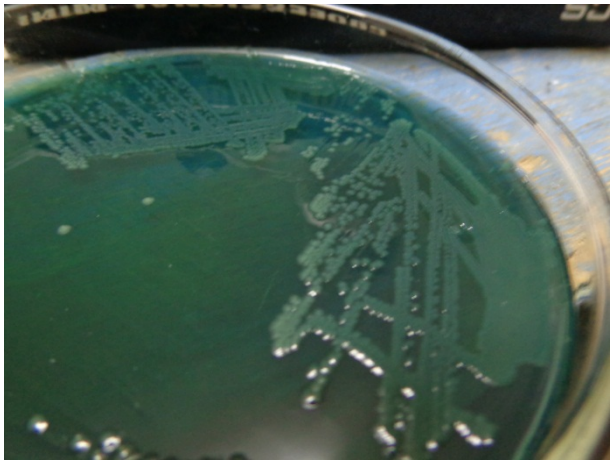
صورة 1: مستعمرات تابعة لأفراد جنس الضمات على وسط



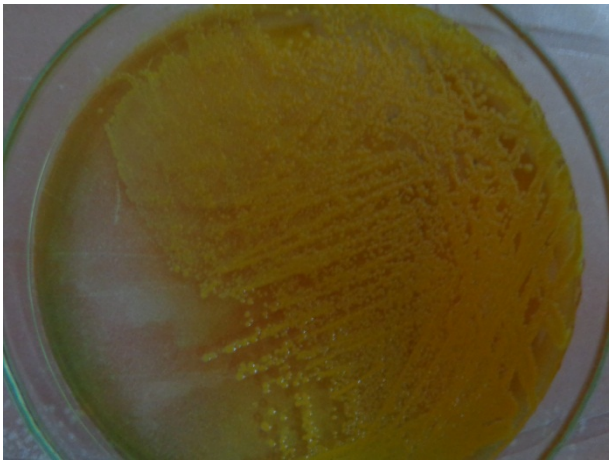
صـــــورة 2: مـــــستعمرات جرثومـــــة *V.parahaemolyticus* علـــى وســـط TCBS.



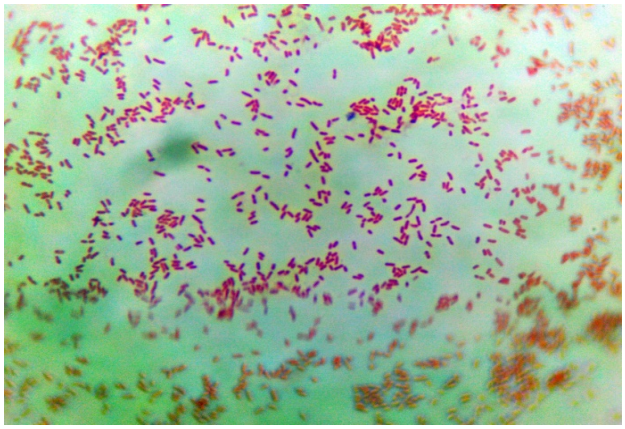
صورة 3: مستعمرات جرثومة *V. mimicus* على وسط TCBS.



صورة 4: مستعمرات جرثومة *V. vuluificus* على وسط TCBS.



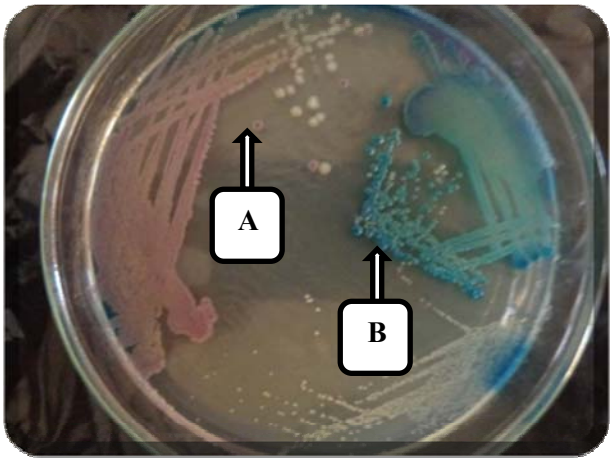
صورة 5: مستعمرات جرثومة *V. alginolyticus* على وسط TCBS.



صورة 6: خلايا جراثيم جنس الضمات تحت المجهر الضوئي (100 X).

صورة 7: خلايا جرثومة *V. parahaemolyticus* تحت المجهر الضوئي (100 X).

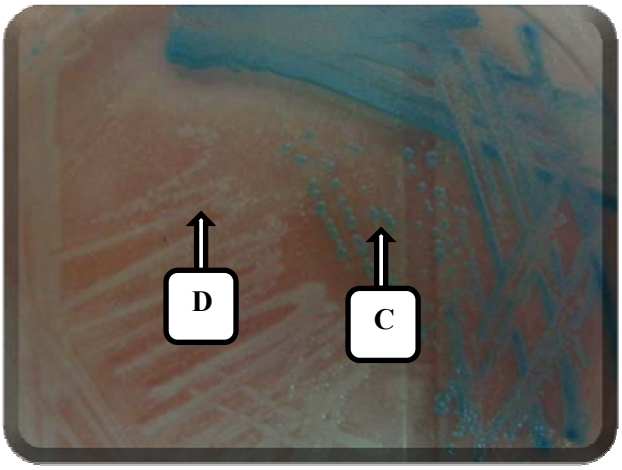
صورة 8: اختبار String.



صورة 9:

(B) مستعمرات جرثومة *V parahaemolyticus*.

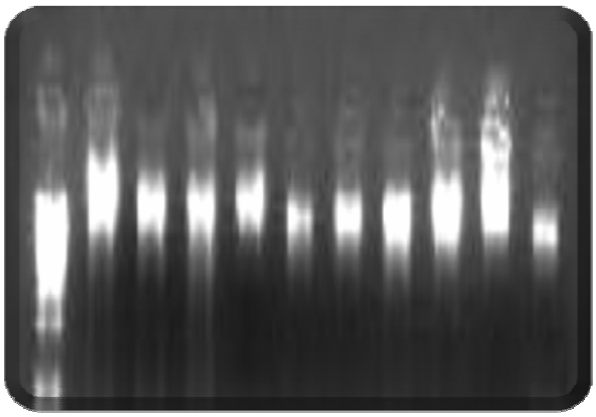
(C) مستعمرات جرثومة *V vuluificus*.



صورة 10:

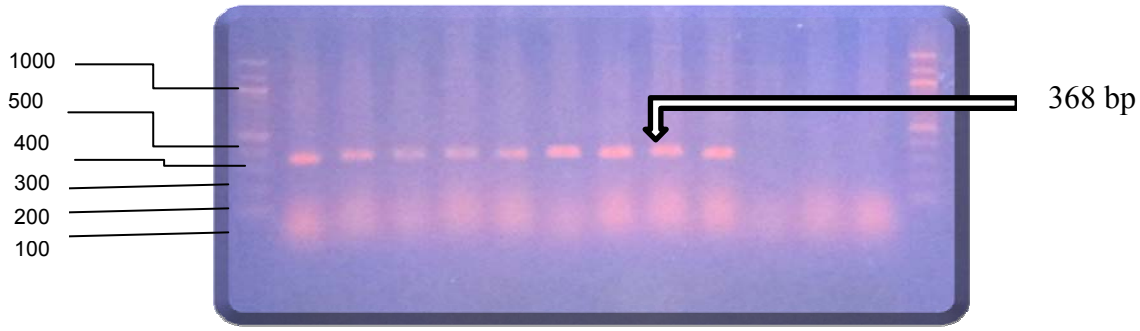
(C) مستعمرات جرثومة *V mimicus*.

(A) مستعمرات جرثومة *V alginolyticus*.



صورة 11: حزم الـ DNA المستخلص من الجرثومة على هلام الاكاروز.

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 C⁻ M



صورة 12: حزم الدنا المتضاعف 1– 9 بحجم 368 زوج قاعدة ناتج تضخيم الجين *toxR*.

C^-: سيطرة سالبة.

M: مؤشر الدنا 100 bp

المصادر

Adebayo-Tayo, B.C.; Okonko, I.O.; John, M.O.; Odu, N.N.; Nwanze, J.C.; Ezediokpu, M.N. (2011). Occurrence of potentially pathogenic Vibrio species in sea foods obtained from oron creek. *Advances in Biological Research.* **5** (6), 356-365.

Alsina, M.; Blanch, A.R. (1994a). A set keys for biochemical identification of environmental Vibrio species. *J. Applied Bacteriol.* **76**, 79–85.

Alsina, M.; Blanch, A.R. *(*1994b). Improvement and update of a set of key for biochemical identification of key for biochemical identification of *Vibrio* species. *J. Applied Bacteriol.* **77,** 719–72.

Atlas, R.M. (2010). "Handbook of Microbioloical Media". 4th ed., Taylor and Francis Group, LLC, New York, USA.

Austin, B. (2010). Vibrios as causal agents of zoonoses. *Veterinary Microbiol*. **140**, 310-317.

Barrow, G.I.; Feltham, R.K.A. (1993). "Cowan and Steel`s Manual for the Identification of Medical Bacteria". 3rd ed. Cambridge, England: Cambridge University Press.

Benson, H.J. (2002). "Microbiological Applications, The Laboratory Manual in General Microbiology". 8th ed., McGraw-hill Companies, Inc., New York, USA. pp. 231-232

Choopun, N.; Louis, V.; Haq, A.; Colwell, R.R. (2002). Simple procedure for rapid identification of *Vibrio cholerae* from the aquatic environment. *Applied and Microbiol.* **68**(2), 995-998.

Cook, D.W. (1994). Effect of time and temperature on multiplication of *Vibrio vulnificus* in postharvest Gulf coast shellstock oysters. *Appl Environ Microbiol*. **60**, 3483–4.

Croci, L.; Suffredini, E.; Cozzi, L.; Toti, L.; Ottavini, D.; Pruzzo, C. (2007). Comparison of different biochemical and molecular methods for the identification of *Vibrio parahaemolyticus*. *J. Applied Microbiol*. **102**, 229-237.

Dileep, V.; Kumar, H.S.; Kumar, Y.; Nishibuchi, M.; Karunasagar, I.; Karunasagar, I. (2003). Application of polymerase chain reaction for detection of *Vibrio parahaemolyticus* associated with tropical sea foods and coastal environment. *Letters in Applied Microbiol.,* **36**, 423-427.

Donovan, T.J.; Van, N.P. (1995). Culture media for the isolation and enumeration of pathogenic Vibrio species in foods and environmental samples. *Int. J. Food Microbiol.,* **26**(1),77-91.

Drake, S.L.; De Paola, A.; Jaykus, L.A. (2007). An overview of Vibrio vulnificus and Vibrio parahaemolyticus. *Compr. Rev. Food Sci., F* **6**, 120–144.

Eddabra, R.; Piemont, Y.; Scheftel, J. (2011). Evaluation of a new chromogenic medium, chromID™ Vibrio, for the isolation and presumptive identification of Vibrio cholerae and Vibrio parahaemolyticus from human clinical specimens. *European J. Clinical Microbiol. and Infectious Diseases.* **30**, 733-737.

Elliot, E.L.; Kaysner, A.C.; Tamplin, M.L. (2003)." *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* and other *Vibrio* spp." In Bacteriological Analytical Manual Online, Chapter 9, 9th ed. US FDA Centre for Food Safety and Applied Nutrition.

Feldhusen, F. (2000). The role of seafood in bacterial food borne diseases. *Microbes and Infection,* **2**, 1651-1660.

Gomathi, R.S.; Vinothkumar, R.; Arunagir, K. (2013). Isolation and identification Vibrios from marine seafood samples. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.,* **2**(2), 36-43.

Hara-Kudo, Y.; Nishina, T.; Nakagawa, H.; Konuma, H.; Hasegawa, J.; Kumagai, S. (2001). Improved method for detection of *Vibrio parahaemolyticus* in seafood. *Applied and Environmental Microbiol.* **67**, 5819-5823.

Hara-Kudo, Y.; Sugiyama, K.; Nishibuchi, M.; Chowdhury, A.; Yatsuyanagi, J.; Ohtomo, Y.; Saito, A.; Nagano, H.; Nishina, T.; Nakagawa, H.; Konuma, H.; Miyahara, M.; Kumagai, S. (2003). Prevalence of pandemic thermostable direct hemolysin-producing *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 in seafood and the coastal environment in Japan. *Applied and Environmental Microbiol*. **69**, 3883-3891.

Hlady, W.G.; Klontz, K.C. (1996). The Epidemiology of *Vibrio* Infections in Florida, 1981–1993. *J. Infectious Diseases.***173**, 1176-1183.

Hui-min, J. (2014). Research on the contamination status of shrimp pathogenic vibrio. *J. Chemical and Pharmaceutical Research*, **6**(3), 974-977.

Janda, J.M.; Powers, C.; Bryant, R.G.; Abbott, S.L. (1988). Current perspectives on the epidemiology and pathogenesis of clinically significant Vibrio spp. *Clin Microbiol Rev.* **1**(3), 245-67.

Jayasinghe, C.V.L.; Ahmed, S.B.N.; Kariyawasam, M.G.I.U.(2008). The isolation and identification of *Vibrio* species in marine shrimps of sri lanka. *Clin Microbiol. Rev.* **1**(3),255-65.

Kanjanasopa, D.; Pimpa, B.; Chowpongpang, S. (2011). Occurrence of Vibrio parahaemolyticus in cockle (Anadara granosa) harvested from the south coast of Thailand. Songklanakarin Journal of Science and Technology, 33(3), 295-300.

Karunasagar, I.; Nayak, B.B.; Karunasagar, I. (1997). Rapid detection of Vibrio parahaemolyticus from fish by polymerase chain reaction (PCR). In Diseases in Asian Aquaculture–III, ed. Flegel, T. and MacRae, I.H. pp. 119–122. Manila: Asian Fisheries Society.

Kaysner, C.; De Paola, A.J. (2004). U.S. Food and Drug Administration; *Bacteriological Analytical Manual*; Methods for specifpathogens; Chapter 9 *Vibrio*. Available at *http://www.fda.gov/Food/science Research /Laboratory Methods/ Bacteriological Analytical Manual BAM/*.

Khan, A.W.; Hossain, S.J.; Uddin, S.N. (2007). Isolation, identification and determination of antibiotic susceptibility of *Vibrio parahaemolyticus* from Shrimp at Khulna Region of Bangladesh. *Research J. Microbiol.* **2**(3), 216-227.

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 *tox*-R gene. *J. Clinical Microbiol.* **37**, 1173-1177.

Koneman, E.W.; Winn, W.; Allen, S.; Schreckenberger, P.; Woods, G. (2006). "Co; pr Atlas and Textbook of Diangostic Micbiology". (ed). Lippincot Williams and Wilkins, Philadelphia USA. pp. 342-343

Lee, C-Y.; Pan, S-F.; Chen, C-H. (1995). Sequence of a cloned *pH72H* 674 fragment and its use for detection of *Vibrio parahaemolyticus* in Shellfish with the PCR. *Appl. Environ. Microbiol.,* 61, 1311–317.

Manafi, M. (1996). Fluorogenic and chromogenic enzyme substrates in culture media and identification tests. *Int. J. Food Microbiol*., **31**,45-58.

Mannas H, Chaouqy N E, Eddabra R, Martinez Urtaza Jand Mimouni R. (2010). Prevalence and diversity of Vibrio sp. from different sources in marine environment at Agadir and essaouira (Morocco). *J. Clinical Microbio.* **25**, 2881–2886.

Maniyan-Kode, R.A.; Jikingston, J.J.; Murali, H.S.; Batra, H.V.; Date, P. (2013). Specific identification of *Vibrio parahaemolyticus* employing monoclonal antibody based immunoassay. *International J. Pharma. and Bio. Sci.,* **4**(2), 156 p.

Maugeri, T.L.; Caccamo, D.; Gugliandolo, C. (2000). Potentially pathogenic vibrios in brackish waters and mussels. *J. Food Protection* , **72**, 60-66.

Nair, G.B.N.; Faruque, S.M.; Sack, D.A. (2009). Vibrios, p. 332-372, In Y. Motarjemi and M. Adams, eds. Emerging Foodborne Pathogens. CRC Press., Cambrige England.

Ottaviani, D.; Masini, L.; Bacchiocchi, S. (2003). A biochemical protocol for the isolation and identification of current species of *Vibrio* in seafood. *J. Appl. Microbiol*., **95**, 1277-1284.

Pal, D.; Das, N. (2010). Isolation, identification and molecular characterization of Vibrio parahaemolyticus from fish samples in Kolkata. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.,***14**(6), 545-9.

Prescott, L.M.; Harley, J.P.; Klein, D.A. (2011). "Microbiology". 3rd ed. Wm. C. Brown co mmunication, Inc., Iowa, USA, pp. 633 – 636.

Sujeewa, A.K.W.; Norrakiah, A.S.; Laina, M. (2009). Prevalence of toxic genes of *Vibrio parahaemolyticus* in shrimps (*Penaeus monodon*) and culture environment. *International Food Research J.* **16**, 89-95.

Wagley, S.; Koofhethile K.; Rangdale, R. (2009). Prevalence and potential pathogenicity of Vibrio parahaemolyticus in Chinese mitten crabs (Eriocheir 282 sinensis) harvested from the River Thames estuary, England. *J. Food Protection*.**72**, 60-66.