مطالعه وقوع گونه‌های ویبریو در صدف صید شده از خلیج فارس به‌روش Multiplex-PCR

مهدی رئیسی[1*]
منوچهر مؤمنی[2]
عباس متین‌فر[3]
حسن ممتاز[4]
فیروز فدائی فرد[5]

۱. دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد، دانشیار گروه بهداشت و بیماریهای آبزیان، شهرکرد، ایران
۲. دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد، کارشناس آزمایشگاه مرکز تحقیقات شیلات، شهرکرد، ایران
۳. مؤسسه تحقیقات شیلات ایران، استادیار بخش آبزی پروری، تهران، ایران
۴. دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد، دانشیار گروه میکروبیولوژی، شهرکرد، ایران

مسئول مکاتبات:
mehdi.raissy@iaushk.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۶/۱۳
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۸/۲۵

چکیده

بخش عمده‌ای از گونه‌های جنس *ویبریو* که معمولاً در آب‌های گرم یافت می‌شوند، دارای توان بالقوه جهت ایجاد مسمومیت‌های غذایی در انسان هستند. نقش آبزیان و فرآورده‌های آبزی در انتقال بیماری اثبات شده، ولی تاکنون مطالعه‌ای در خصوص آلودگی صدف در ایران صورت نپذیرفته است. هدف از انجام این بررسی، مطالعه وقوع آلودگی با گونه‌های *ویبریو* در صدف صید شده از خلیج فارس با استفاده از تکنیک PCR چندگانه بود. در این بررسی که برای نخستین بار در کشور انجام شد، بافت خوراکی ۶۰ عدد صدف مورد مطالعه باکتری‌شناسی قرار گرفت. به‌منظور تشخیص باکتری از آزمون‌های بیوشیمیایی پس از کشت در محیط اختصاصی و جهت تائید نتایج از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز چندگانه (Multiplex-PCR) استفاده شد. نتایج نشان داد که ۱۸/۳ درصد از نمونه‌های بررسی شده (۱۱ نمونه) حاوی گونه‌های *ویبریو* هستند و در ۸۱/۷ درصد (۴۹ نمونه) آلودگی یافت نشد. از بین گونه‌های *ویبریو*، *Vibrio harveyi* بیش از سایر گونه‌ها مشاهده (۱۰ درصد) و *Vibrio parahaemdyticus* و *Vibrio valnificus* نیز به‌ترتیب در ۳/۳ و ۵ درصد نمونه‌ها یافت شدند. نتایج نشان می‌دهد که صدف صید شده از خلیج فارس می‌تواند حاوی گونه‌های *ویبریو* بیماری‌زا برای انسان باشد.

واژگان کلیدی: *ویبریو*، صدف، خلیج فارس، Multiplex-PCR.

مقدمه

گونه‌های جنس *ویبریو* در برگیرنده باکتری‌های گرم‌منفی، تخمیرکننده بی‌هوازی و نمک دوست هستند که به‌دلیل قدرت تحمل نمک در آب‌های شور و لب‌شور یافت می‌شوند (Amaro *et al.*, 1997)، اگرچه برخی گونه‌ها (*V. chlorella* و *V. mimicus*) در آب‌های شیرین به کرات گزارش شده‌اند (Tarr *et al.*, 2007). این باکتری‌ها به‌طور معمول در محیط‌های آبی در مناطق گرم یا معتدل یافت شده و از آب، رسوبات، پلانکتون‌ها، انواع ماهیان، میگو و سخت پوستان و همچنین صدف جدا شده‌اند (Duan and Su, 2006).

برخی گونه‌های این جنس برای آبزیان بیماری‌زا هستند و برخی گونه‌ها نیز ممکن است به‌صورت آلودگی ثانویه ایجاد شده در مراحل صید یا پس از آن از ماهی یا میگو جدا شوند. تاکنون ۱۲ گونه *ویبریو* مولد بیماری غذازاد در انسان شناسایی شده که به‌طور عمده منجر به بروز علائم گوارشی در شخص مصرف کننده می‌گردند (Mead *et al.*, 1999). امروزه غذاهای دریایی، به‌ویژه انواعی که به‌صورت خام یا نیم‌پز مورد مصرف قرار می‌گیرند از منابع مهم آلودگی به *ویبریو* محسوب می‌شوند، به‌طوری‌که در ژاپن، ۷۰-۵۰ درصد موارد بروز گاستروانتریت ناشی از گونه *V. parahaemolyticus* است (Farmer *et al.*, 2003). از زمان نخستین گزارش بیماری ناشی از *ویبریو* در ژاپن (Fujino *et al.*, 1951)، موارد متعددی از وقوع آلودگی در فرآورده‌های دریایی از نقاط مختلف جهان به ثبت رسیده است (Hoi *et al.*, 1998; Davies *et al.*, 2001; Ottaviani *et al.*, 2005; Normanno *et al.*, 2006). در ایران نیز گزارشاتی از بروز آلودگی آبزیان آب شور و شیرین از جمله ماهی، میگو، لابستر و خرچنگ وجود دارد (حقیقی و همکاران، ۱۳۸۱؛ شیرازی و همکاران، ۱۳۸۵؛ Raissy *et al.*, 2012a, 2012b; Rahimi *et al.*, 2010)، ولی تاکنون در ایران مطالعه‌ای در خصوص آلودگی صدف به *ویبریو* انجام نشده است. مطالعه حاضر با هدف بررسی

Archive of SID

www.SID.ir

آلودگی صدف صید شده از مناطق جنوبی کشور به *ویبریو* و خطر احتمالی برای مصرف کننده برای نخستین بار در ایران صورت پذیرفت.

مواد و روش‌ها

تعداد ۶۰ عدد صدف (*Pinctada radiata, Saccostrea cucullata, Circenita callipyga*) از بندرعباس در سال ۱۳۹۰ صید و در شرایط مناسب در مجاورت کیسه‌های یخ به آزمایشگاه شیلات دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد منتقل شدند. در آزمایشگاه نمونه‌ها بلافاصله به‌منظور بررسی حضور گونه‌های جنس *ویبریو* با استفاده از آزمون‌های بیوشیمیایی و همچنین M-PCR مورد مطالعه قرار گرفتند.

به‌منظور بررسی آلودگی با *ویبریو*، نمونه همگن شده از بخش خوراکی صدف در محیط آب پپتونه منتقل و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرم‌خانه‌گذاری گردید. پس از ۲۴ ساعت نمونه‌ها به محیط اختصاصی TCBS (BD diagnostics, Heidelberg, Germany) منتقل و به‌مدت ۲۴ ساعت قرار گرفتند. کلونی‌های جدا شده پس از رنگ‌آمیزی گرم، به‌منظور شناسایی با استفاده از آزمون‌های بیوشیمیایی شامل تست حرکت، اکسیداز، کاتالاز، تولید اسید از گلوکز، مانوز، لاکتوز، مانیتول، آرابینوز، دکربوکسیلاسیون اسیدهای آمینه لیزین، آرژنین، اورنیتین، احیای نیتریت، رشد در nutrient broth حاوی ۱۰-۸ درصد نمک و سایر آزمون‌های اختصاصی شناسایی *ویبریو* بر اساس Hosseini و همکاران (۲۰۰۴) و Bockemuhl (۱۹۹۲) مورد بررسی قرار گرفتند.

استخراج DNA بر اساس روش Bockemuhl (۱۹۹۲) صورت پذیرفت. برای این منظور باکتری‌های مشکوک در محیط Tryptic soy broth حاوی ۱ درصد نمک به‌مدت ۲۴ ساعت گرم‌خانه‌گذاری شدند، سپس ۱/۵ میلی لیتر از آن به‌مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰ در دقیقه سانتریفوژ شده و بخش سلولی در ۵۶۷ میکرولیتر بافر pH، ۸، ۱ میلی مول EDTA، ۱۰ میلی‌مول Tris-HCl (Merch, Germany Tris-EDTA) حل شد. سپس ۳۰ میکرولیتر سدیم دودسیل سولفات ۱۰ درصد (Merck, Germany) و ۳ میکرولیتر پروتئیناز K، ۲۰ میلی‌گرم در لیتر (Cinnagen, Iran) به آن اضافه و به‌مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از استفاده از ۱۰۰ میکرولیتر نمک (۵ میلی‌مول) و ۸۰ میکرولیتر هگزادسیل تری متیل آمونیوم بروماید/نمک (Sigma, Germany) به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. DNA به‌وسیله فنل: کلروفرم: ایزوآمیل الکل (v/v۲۵:۲۴:۱) استخراج، با ایزوپروپانول (Sigma, Germany) رسوب داده و با الکل ۷۰ درصد شسته شد. پس از خشک شدن در دمای محیط به‌مدت ۳۰ دقیقه در محلول TE (pH Merck, Germany، ۷/۸، ۱۰۰ میلی‌مول EDTA، ۱۰ میلی‌مول Tris-HCl) قرار داده و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. خلوص DNA در هر نمونه در طول موج ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر سنجیده شد. غلظت DNA برای انجام PCR معادل ۵۰ نانوگرم در هر میکرولیتر در نظر گرفته شد. تشخیص قطعی جدایه‌ها با استفاده از پرایمرهای اختصاصی میسر گردید. توالی پرایمرها، ژن هدف و اندازه محصول در جدول ۱ ذکر شده است. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در حجم ۵۰ میکرولیتر شامل ۲ میکرولیتر DNA (۵۰ نانوگرم در میلی‌لیتر)، ۵ میکرولیتر بافر ۱۰X (Triton X-100 ۱ درصد، gelatin ۰/۱ درصد، ۶۰ میلی‌مول $mgCl_2$، ۵۰۰ میلی‌مول KCl، pH=۸/۳، ۱۰۰میلی‌مول Tris-HCl)، ۱ میکرولیتر از هر پرایمر (۵۰ پیکومول بر میکرولیتر)، ۱ میکرولیتر (۱۰ میلی‌مول) dNTP، ۰/۲ میکرولیتر آنزیم Taq DNA polymerase (۵ واحد در میکرولیتر) و ۴۰ میکرولیتر آب مقطر استریل انجام شد. به‌منظور انجام واکنش PCR از دستگاه ترموسایکلر PTC-100 (Eppendorf, Germany) استفاده شد. در نهایت ژل آگارز ۱/۵ درصد پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید در دستگاه الکتروفورز با ولتاژ ۹۰ ولت به‌مدت ۵۰ دقیقه قرار گرفت و پس از تابش UV، باند ظاهر شده در کنار مارکر اندازه‌گیری شد. پس از انجام PCR، باند بدست آمده تعیین توالی گردید و در بانک جهانی ژن (GenBank) بلاست شد تا صحت نتایج مورد تائید قرار گیرد.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۱: توالی پرایمرهای مورد استفاده به‌منظور تشخیص گونه‌های *ویبریو* در سال ۱۳۹۰

گونه باکتری	توالی پرایمر('۳----------'۵)	اندازه باند (bp)	ژن هدف	منبع
V. parahaemolyticus	GCAGCTGATCAAAACGTT GAGT ATTATCGATCGTGCCACTCAC	897 bp	*flaE*	Tarr *et al.*, 2007
V. cholerae	AAGACCTCAACTGGCGGTA GAAGTGTTAGTGATCGCCAGAGT	248 bp	*sodB*	Tarr *et al.*, 2007
V. vulnificus	GTCTTAAAGCGGTTGCTGC CGCTTCAAGTGCTGGTAGAAG	410 bp	*hsp*	Tarr *et al.*, 2007
V. mimicus	CATTCGGTTCTTTCGCTGAT GAAGTGTTAGTG ATTGCTAGAGAT	121 bp	*sodB*	Tarr *et al.*, 2007
V. harveyi	CTTCACGCTTGATGGCTACTG GTCACCCAATGCTACGACCT	235bp	*vhh*	Maiti *et al.*, 2009

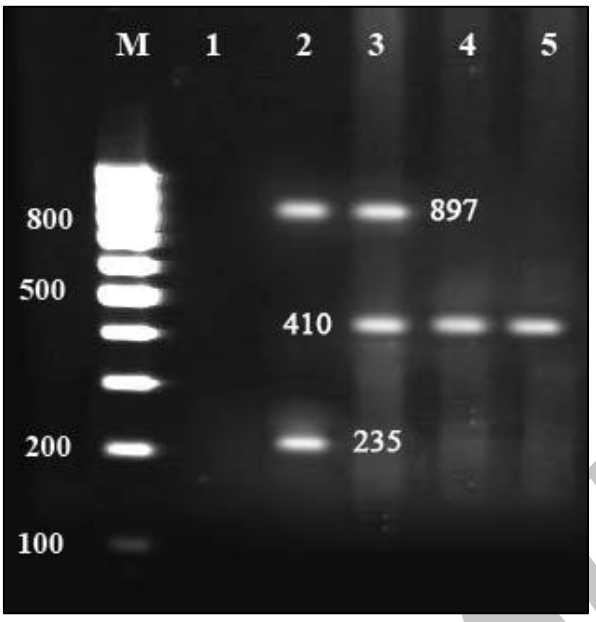
PCR Program: 35 times (92°C, 40 s; 57°C, 1 min; 72°C, 1.5 min); e: 35 times (94°C, 30 s; 57°C, 30 sec; 72°C, 1 min).

نتایج

در مجموع ۶۰ نمونه صدف صید شده از بندرعباس به‌منظور بررسی آلودگی با ۵ گونه مهم *ویبریو* شامل *V. parahaemolyticus*، *V. chlorela*، *V. vulenificus*، *V. mimicus* و *V. harveyi* با استفاده از آزمون‌های بیوشیمیایی و همچنین PCR چندگانه مورد بررسی قرار گرفتند. ۱۱ جدایه ویبریو شامل ۶ مورد *V. harveyi*، ۲ مورد *V. parahaemolyticus* و ۳ مورد *V. vulenificus* شناسایی و سایر گونه‌ها در صدف‌های مطالعه شده مشاهده نگردید. نتایج نشان می‌دهد که ۱۱ عدد از صدف‌های بررسی شده معادل ۱۸/۳ درصد آلوده به یکی از گونه‌های باکتری بوده‌اند. از بین نمونه‌های آلوده، ۶ نمونه به *V. harveyi* (۱۰ درصد)، ۲ نمونه به *V. parahaemolyticus* (۳/۳ درصد) و ۳ نمونه به *V. vulenificus* (۵ درصد) آلوده بودند. باندهای بدست آمده در تصویربرداری از ژل الکتروفورز PCR چندگانه در شکل ۱ نشان داده شده است. تعیین توالی باند بدست آمده و بلاست آن در بانک جهانی ژن نشان دهنده صحت PCR بود.

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۱: باندهای با اندازه ۲۳۵ (*V. harveyi*)، ٤١٠ (*V. vulenificus*) و ۸۹۷ (*V. parahaemolyticus*) در کنار نمونه منفی شماره ۱ و مارکر (M)

بحث و نتیجه‌گیری

باکتری‌های جنس *ویبریو* را در گروه پاتوژن‌ها یا عوامل فرصت‌طلب آب به خصوص در مناطق گرمسیر دسته‌بندی می‌کنند (Feldhusen, 2000). گزارش آلودگی با *ویبریو* در فرآورده‌های دریایی به‌خصوص در نواحی گرمسیر به‌کرات صورت پذیرفته است. گونه‌های مختلف جنس *ویبریو* تا کنون از انواع ماهیان آب شیرین و شور، میگو، خرچنگ، لابستر و صدف در نقاط مختلف جهان گزارش شده‌اند (Hoi *et al.*, 1998; Davies *et al.*, 2001; Ottaviani *et al.*, 2005; Normanno *et al.*, 2006). در ایران نیز گزارشاتی از آلودگی فرآورده‌های دریایی به این باکتری‌ها وجود دارد (Rahimi *et al.*, 2010; Raissy *et al.*, 2012a, 2012b). شیوع گونه *V. harveyi* که در میگو عامل مهم بیماری‌زا محسوب می‌شود، در مزارع پرورش میگو در منطقه حله بوشهر معادل ۲۱/۹ درصد گزارش شده است. در مطالعه مذکور ۷۵ درصد نمونه‌های بررسی شده نیز به گونه *V. alginolyticus* آلوده بوده‌اند (Soltani *et al.*, 2000). میزان آلودگی ماهیان (قزل آلای رنگین کمان و ماهی سفید) در اطراف تهران به *V. parahaemolyticus* در محدوده ۱۰-۵ درصد گزارش شده است (Shirazi *et al.*, 2007). در مطالعه دیگری میزان آلودگی با اغذیه دریایی عرضه شده در اصفهان با گونه‌های *ویبریو* معادل ۳/۹ درصد گزارش شده است (جلالی و همکاران، ۱۳۸۸). نتایج مطالعه حاضر نشان دهنده آلودگی صدف‌های بررسی شده با ۳ گونه *V. harveyi* ، *V. parahaemolyticus* و *V. vulenificus* است. در بررسی حاضر، ۶ نمونه از مجموع ۶۰ صدف بررسی شده (۱۰ درصد) به گونه *V. harveyi* آلوده بودند. این گونه به‌عنوان فلور طبیعی و همچنین عامل بالقوه بیماری‌زا در آبزیان و به‌خصوص میگو شناخته شده است (حقیقی و همکاران، ۱۳۸۱). *V. harveyi* در ایران از دریای خزر و همچنین خلیج فارس گزارش شده است (هلاکو و همکاران، ۱۳۸۴؛ Soltani *et al.*, 2000) و در این مطالعه نیز از صدف گزارش می‌گردد. نتایج بررسی همچنین حاکی از آلودگی صدف‌های بررسی شده به *V. parahaemolyticus* بوده که عامل بالقوه بیماری‌زا در انسان و از عوامل مهم بروز گاستروانتریت است. این باکتری در ۵ درصد نمونه‌های بررسی شده یافت شد.

V. parahaemolyticus یکی از مهم‌ترین عوامل بروز مسمومیت‌های غذازاد محسوب می‌شود. از آن‌جایی‌که بروز آلودگی در بیش‌تر موارد ناشی از خام‌خواری و یا مصرف اغذیه دریایی به‌صورت نیم‌پز بوده است، لذا فرهنگ غذایی جوامع

Archive of SID

www.SID.ir

مختلف در بروز این بیماری نقش به‌سزائی دارد، برای مثال در حالی‌که ۷۰-۵۰ درصد موارد بروز مسمومیت‌های غذایی در ژاپن ناشی از *V. parahaemolyticus* است (Farmer *et al.*, 2003)، بیماری در اروپا به‌ندرت گزارش شده است. اگرچه به‌نظر می‌رسد با گسترش فرهنگ غذایی شرقی و خام‌خواری، موارد بروز بیماری نسبت به قبل بیش‌تر شده است (Lemoine *et al.*, 1999).

گزارشات متفاوتی از آلودگی با *V. parahaemolyticus* در فرآورده‌های دریایی در نقاط مختلف وجود دارد. آلودگی به *V. parahaemolyticus* در اغذیه دریایی جزایر جنوب غربی هندوستان معادل ۷۵ درصد گزارش شده است (Pendru *et al.*, 2008). میزان آلودگی در شهرهای شانگهای و جانگسوی چین ۱۹/۳ درصد گزارش شده است، به‌طوری‌که از ۱۲۹۳ فرآورده دریایی بررسی شده، ۲۵۰ نمونه به این باکتری آلوده بوده‌اند (Yang *et al.*, 2008). در سال‌های اخیر این باکتری مسئول بروز همه‌گیری در کشورهای مختلف بوده است به‌طوری‌که این باکتری در سال‌های ۱۹۹۷ و ۱۹۹۸ به‌عنوان یک خطر مهم در زمینه بهداشت عمومی در کشور ایالات متحده امریکا معرفی شد (FDA, 2000).

شیوع *V. parahaemolyticus* در ماهی در پرتقال و یونان در سال ۲۰۰۱ به ترتیب معادل ۳۵ و ۱۴ درصد بوده، درحالی‌که مطالعات انجام شده در فرانسه و انگلستان حاکی از عدم وجود نمونه مثبت بوده است (Davies *et al.*, 2001). این گونه در صدف نیز در مناطق مختلف گزارش شده است. میزان آلودگی در اورگون امریکا معادل ۱۵ درصد و در دریای آدریاتیک معادل ۲۴/۳ درصد برآورد شده (Duan and Su, 2006; Ottaviani *et al.*, 2005) که با نتایج مطالعه حاضر تفاوت دارند. میزان آلودگی صدف‌های دوکفه‌ای در ایتالیا به *V. parahaemolyticus*، ۷/۸ درصد گزارش شده که با مطالعه حاضر هم‌خوانی دارد (Normanno *et al.*, 2006).

گونه *V. vulenificus* نیز در ۷/۵ درصد نمونه‌های بررسی شده یافت شد. این باکتری از طریق فرآورده‌های دریایی آلوده وارد بدن انسان شده و منجر به ایجاد گاستروانتریت می‌شود، اگرچه باکتری مذکور از راه زخم‌های جلدی نیز قادر به ایجاد آلودگی است (Oliver, 2005)، احتمال مرگ و میر ناشی از این باکتری حدود ۲۵ درصد و در موارد سپتی‌سمی به ۵۰ درصد می‌رسد (Liu *et al.*, 2006). میزان آلودگی صدف‌ها به این باکتری در ایتالیا ۲/۸ درصد (Normanno *et al.*, 2006) و در آلمان ۳/۵ درصد گزارش شده است (Lhafi and Kuhne, 2007) که میزان کم‌تری را نسبت به این بررسی نشان می‌دهد. از طرف دیگر آلودگی در مناطق دریایی دانمارک حدود ۴۱ درصد گزارش شده است (Hoi *et al.*, 1998).

مقایسه نتایج بررسی‌های مختلف نشان دهنده اختلاف فاحشی در درصد آلودگی به گونه‌های مختلف *ویبریو* در فرآورده‌های دریایی است که این مساله را می‌توان به شرایط اکولوژیک، آلودگی‌های محیطی، تفاوت گونه‌ای و همچنین تفاوت چشمگیر در کیفیت شرایط بهداشتی از زمان صید تا عرضه نسبت داد. در حال حاضر قانون مدونی مبنی بر شرایط کمی یا کیفی آلودگی برخی فرآورده‌های دریایی از جمله صدف در خصوص آلودگی با *ویبریو* وجود ندارد، به‌طوری‌که قوانین تدوین شده در اتحادیه اروپایی نیز صرفاً در برگیرنده گونه‌های *سالمونلا* و *اشرشیا کلی* است و استاندارد مشخصی در خصوص میزان ویبریو تاکنون تدوین نشده است (European Union, 2004 and 2005). لذا تدوین قوانینی در این خصوص در ایران در مورد تمامی گونه‌های آبزی ضروری به‌نظر می‌رسد.

مصرف فرآورده‌های آبزی در ایران در سال‌های اخیر رشد چشمگیری داشته و با توجه به ضرورت ترویج فرهنگ مصرف غذاهای دریایی، ضروری است به موازات اقدامات ترویجی به جنبه‌های بهداشتی محصولات عرضه شده برای مصرف انسانی نیز توجه کرد، به‌خصوص این‌که برخی مطالعات دیگر نیز آبزیان خلیج فارس را واجد گونه‌های *ویبریو* گزارش کرده‌اند (Rahimi *et al.*, 2010; Raissy *et al.*, 2012a, 2012b).

اگرچه عادات غذایی ایرانیان به‌شکل فراگیر در برگیرنده مصرف فراورده‌های آبزی به‌صورت خام ولی مصرف آبزیان به شکل نیم‌پز و یا مصرف سوشی یا صدف که عمدتاً به‌صورت خام صورت می‌پذیرد، نیز طرفداران خاص خود را دارد. مصرف صدف که به‌خصوص در نواحی جنوب کشور و اهل سنت رایج است، می‌تواند زمینه ساز بروز آلودگی با گونه‌های *ویبریو* باشد.

Archive of SID

www.SID.ir

در این میان باید به نقش صدف‌ها به واسطه ارزش صادراتی نیز توجه خاص داشت.

سپاسگزاری

نگارندگان مراتب تشکر و قدردانی خود را از معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد در خصوص حمایت مالی این مطالعه ابراز می‌دارند. همچنین از جناب آقای ارگنجی، پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس و *دریای* عمان که تشخیص گونه‌های صدف را به‌عهده داشته‌اند، سپاسگزاری می‌گردد.

منابع

حقیقی، م. ع.، حقیقی، ل.، نبی پور، ا.، جعفری، س. م. و آژرون، ا.، ۱۳۸۱. جداسازی ویبریوها از روده و هپاتوپانکراس میگوی پنائید خلیج فارس. طب جنوب، سال پنجم، شماره دوم، صفحات ۱۱۲-۱۱۷.

شیرازی، م. ح.، رنجبر، ر.، سالاری، م. ح.، باقری تیرتاش، ی.، نجفی، ع. و صادقی فرد، ن.، ۱۳۸۵. جداسازی *ویبریو پاراهمولیتیکوس* از ماهیان پژوهشی و آب حوضچه‌های پرورش ماهی اطراف تهران و تعیین مقاومت ضد میکروبی آن‌ها. بیماری‌های عفونی و گرمسیری ایران، شماره سی و پنجم، صفحات ۶۵-۶۸.

هلاکو، ا.، میرمظفری، ن. و فروهش تهرانی، ه.، ۱۳۸٤. انتشار گونه‌های *ویبریو* در آب‌های دریای خزر. مجله دانشکده علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی گناباد، شماره سوم، صفحات ۲۰-۱۶.

Amaro, C., Fouz, B., Biosca, E. G., Marconoales, E. and Collado, R., 1997. The lipopolysacharide O side chain of *Vibrio vulnificus* serogroup E is a virulence determinant for eels. Infection and Immunity, 65: 2475-2479.

Bockemuhl, J., 1992. Vibrionaceae. In: Mikrobiologische Diagnostik, Burkhardt, F. (ed.) Georg Thieme Verlag, Stuttgart, PP. 102–108.

Davies, A. R., Capell, C. and Jehanno, D., 2001. Incidence of food borne pathogens on European fish. Food control, 12: 67-71.

Duan, J. and Su, Y. C., 2006. Occurrence of *Vibrio parahaemolyticus* in two Oregon oyster-growing bays. Journal of Food Science, 70: 58-63.

European Union, 2004. Regulation (EC) No. 853/2004 of the European Parliament and of the Council, of 29 April 2004, laying down specific hygiene rules for food of animal origin. Official Journal of the European Union.

European Union, 2005. Regulation (EC) No. 2073/2005 of 15 November 2005 on microbial criteria for foodstuff. Official Journal of the European Union.

Feldhusen, F., 2000. The role of seafood in bacterial foodborne diseases. Microbes and Infection, 2: 1651-1660.

Farmer, J. J., Janda, J. M. and Birkhead, K., 2003. *Vibrio*, *In:* Manual of clinical microbiology Murray, P. R., Baron, E. J., Jorgensen, J. H., Pfaller, M. A. and Yolken R. H., (eds.), 8th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C. PP. 706-718.

Fujino, T., Okuno, Y., Nakada, D., Aoyama, A., Fukai, K., Mukai, T. and Ueho, T., 1951. On the bacteriological examination of shirasu food poisoning. J. Japanese Association of Infectious Diseases, 35: 11-12.

Hoi, L., Larsen, J. L., Dalsgaard, I. and Dalsgaard, A., 1998. Occurrence of *Vibrio vulnificus* biotypes in Danish marine environments. Applied Environmental Microbiology, 64: 13-17.

Hosseini, H., Cheraghali, M., Yalfani, R. and Razavilar, V., 2004. Incidence of *Vibrio* spp. in shrimp caught off the south coast of Iran. Food Control, 15: 187-190.

Lemoine, T., Germanetto, P. and Giraud, P., 1999. Toxi-infection alimentary collective a *Vibrio parahaemolyticus*. Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire, 10: 37-38.

Lhafi, S. K. and Kuhne, M., 2007. Occurrence of *Vibrio* spp. in blue mussels (*Mytilus edulis*) from the German Wadden Sea. International Journal of Food Microbiology, 116: 297-300.

Liu J. W., Lee I. K., Tang H. J., Ko, W. C., Lee, H. C., Liu, Y. C., Hsueh, P. R. and Chuang, Y. C., 2006. Prognostic factors and antibiotics in *Vibrio vulnificus* septicemia. Archives of Internal Medicine, 166: 2117-23.

Maiti, B., Shekar, M., Khushiramani, R., Karunasagar, I. and Karunasagar, I., 2009. Evaluation of RAPD-PCR and protein profile analysis to differentiate *Vibrio harveyi* strains prevalent along the southwest coast of India. Journal of Genetics, 88: 273-279.

Mead, P. S., Slutsker, L., Dietz, V., Mccaig, L. F., Bresee, J. S., Shapiro, C., Griffin, P. M. and Tauxe, R. V., 1999. Food-related illness and death in the United States. Emerging Infectious Diseases, 5: 607-625.

Archive of SID

www.SID.ir

some *Vibrio* strains isolated from seafood. Iranian Journal of Fisheries Sciences, 11: 618-626.

Raissy, M. Moumeni, M. Ansari, M. and Rahimi, E., 2012b. Occurrence of *Vibrio* Spp. in lobster and crab from the Persian Gulf. Food Safety, 32: 198-203.

Shirazi, M. H., Ranjbar, R., Salari, M. H., Bagheri Tirtash, Y., Najafi, A. and Sadeghifard, N., 2007. Isolation of *Vibrio parahaemolyticus* from fish in Tehran and their antimicrobial resistance. Iranian Journal of Infectious Diseases and Tropical Medicine, 11: 65-68.

Soltani, M., Kakoolaki, S. and Avakh Kismi, M., 2000. Isolation and identification of dominant *Vibrio* species in farmed prawn of Heleh station, Bushehr. Journal of Veterinary Research, 55: 29-32.

Tarr, C. L., Patel, J. S., Puhr, N. D., Sowers, E. G., Bopp, C. A. and Strockbine, N. A., 2007. Identification of *Vibrio* isolates by a multiplex PCR assay and rpob sequence determination. Journal of Clinical Microbiology, 45: 134-140.

Yang, Z.Q., Jiao, X. A., Zhou, X. H., Cao, G. X., Fang, W. M. and Gu, R. X., 2008. Isolation and molecular characterization of *Vibrio parahaemolyticus* from fresh, low-temperature preserved, dried, and salted seafood products in two coastal areas of eastern China. International Journal of Food Microbiology, 125: 279-285.

Normanno, G., Parisi, A., Addante, N., Quaglia, N. C., Dambrosio, A., Montagna, C. and Chiocco, D., 2006. *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus* and microorganisms of fecal origin in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) sold in the Puglia region (Italy). International Journal of Food Microbiology, 106: 219-22.

Oliver, J. D., 2005. Wound infections caused by *Vibrio vulnificus* and other marine bacteria. Epidemiology and Infection, 133: 383-91.

Ottaviani, D., Santarelli, S., Bacchiocchi, S., Masini, L., Ghittino, C. and Bacchiocchi, I., 2005. Presence of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* strains in mussels from the Adriatic Sea, Italy. Food Microbiology, 22: 585-590.

Pendru, R., Sadananda, A., Amarbahadur, B., Iddya, K. and Indrani, K., 2008. Detection and molecular characterization of *Vibrio arahaemolyticus* isolated from seafood harvested along the southwest coast of India. Food Microbiology, 25: 824-830.

Rahimi, E., Ameri, M., Doosti, A. and Gholampour, A. R., 2010. Occurrence of toxigenic *Vibrio parahaemolyticus* strains in shrimp in Iran. Foodborne Pathogen and Diseases, 7:1107-11.

Raissy, M., Moumeni, M., Ansari, M. and Rahimi, E., 2012a. Antibiotic resistance pattern of

Archive of SID

www.SID.ir