مطالعه فراوانی آلودگی گونه‌های *ویبریو* در ماهیان عرضه شده در شهر اصفهان

عباس کریمی علویجه[1]، علی شریف زاده[2]*

۱. دانش آموخته دانشکده داروسازی، واحد شهرضا، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرضا، ایران.

۲. گروه آموزشی میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

***نویسنده مسئول:** *sharifzadeh@iaushk.ac.ir*

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۷/۳۰ تاریخ پذیرش:۱۳۹۹/۱۰/۳۰

چکیده

هر ساله موارد زیادی از وقوع مسمومیت‌های غذایی ناشی از مصرف مواد غذایی دریایی آلوده به گونه های *ویبریو*، گزارش می‌گردد. هدف از این تحقیق بررسی میزان فراوانی آلودگی ماهیان خام عرضه شده، به گونه های *ویبریو* در شهر اصفهان بود. در این بررسی ماهیان خام خریداری شده از ۶۴ فروشگاه، به آزمایشگاه کنترل کیفی مواد غذایی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرضا انتقال داده شد. نمونه‌ها از نظر شمارش *ویبریو* طبق روش استاندارد ملی ایران مورد آزمایش قرار گرفت. در آزمون مولکولی با استفاده از واکنش زنجیره ای پلیمراز آشیانه ای حضور گونه‌های *پاراهمولیتیکوس*، *کلرا*، *ولنیفیکوس* و *میمیکوس* جنس *ویبریو* مورد بررسی قرار گرفت . نتایج حاکی از آن بود که حدود ۹۵درصد نمونه ها ، آلودگی بیش از حد مجاز به جنس *ویبریو* داشتند. *ویبریو پاراهمولیتیکوس* بیشترین میزان فراوانی (۳۵درصد) را نشان داد، در حالی که *ویبریو میمیکوس* کمترین میزان فراوانی (۱۵ درصد) را در نمونه های مورد بررسی داشت. فراوانی گونه‌های *کلرا* و *ولنیفیکوس* نیز به ترتیب ۲۰ درصد و۳۵ درصدگزارش گردید . فراوانی بالای گونه‌های *ویبریو* در نمونه‌ها تایید کننده عدم رعایت بهداشت در مراکز تهیه و توزیع ماهی و فرآورده های آن است. به نظر می‌رسد جایگاه های عمل‌آوری و نحوه حمل و نقل و توزیع ماهی در اصفهان از بهداشت مناسبی برخوردار نیست.

کلید واژه‌ها: PCR، *ویبریو*، ماهی، آلودگی.

مقدمه

سلامتی غذا از گذشته تا امروز موضوع تحقیقات زیادی بوده است . با روشهای نوینی تلاش شده است تا آلودگی مواد غذایی به عوامل بیماری زا کاهش یابد. با این حال شیوع رو به افزایش مسمومیتهای غذایی یکی از مهمترین مسائل در جوامع بشری به شمار می آید. ماهی و اغذیهٔ دریایی بعد از گوشت قرمز و پرندگان دومین غذای پروتئین جانوری در جهان است. غذاهای دریائی امروزه جایگاه مناسبی را در تغذیه مصرف کنندگان یافته اند. اگرچه مصرف غذاهای با منشاء دریائی میتواند با مخاطراتی نیز همراه باشد که از جمله این مخاطرات میتوان به انتقال عوامل بیماریزای باکتریائی اشاره کرد. منشاء باکتریهای منتقله میتواند عوامل بیماریزای اولیه یا ثانویه باشد که می توانند باکتری بیماریزای ماهی یا پاتوژنهای ثانویه باشند در برخی از کشورها مانند ژاپن، ماهی منبع اصلی پروتئین می باشد از جمله آلودگی های عمده آبزیان می توان به آلودگی با باکتری های جنس ویبریو اشاره کرد (Hang, 2012, Srivastava et al., 2016).

خانواده *ویبریوناسه* شامل جنس‌های *ویبریو*، *آئروموناس*، *پلیزوموناس* و *فتوباکتریوم* است. باکتری‌های این خانواده، در محیطهای آبی فعال بوده و اکثر مبتلایان از طریق مصرف آبزیان آلوده به باکتری‌های این خانواده بصورت خام یا نیم پز دچار بیماری می شوند. باکتری‌ها پس از ورود با عبور از سد دفاعی اسید معده، به بخش مخاطی

دیواره روده چسبیده و با تکثیر باعث ایجاد عفونت روده‌ای با علائمی همچون اسهال، دفع مدفوع آبکی، استفراغ شدید و در برخی موارد فرو رفتگی در ناحیه گونه و چشم می‌شوند. مبتلایان نیاز به درمان‌های سریع با جایگزینی آب و الکترولیت از دست رفته، به همراه آنتی بیوتیک جهت کنترل بیماری دارند (Ansari and Raissy, 2010; Raissy et al., 2012; Mohammed et al., 2018).

جنس ویبریو خود شامل ۳۶ گونه می باشد که ۱۲ گونه از آنها دارای قابلیت بیماری‌زایی در انسان می‌باشد. از جمله گونه‌های معروف آن می‌توان به *ویبریو کلرا*، *ویبریو پاراهمولیتیکوس*، *ویبریو ولینفیکوس* و *ویبریو میمیکوس* اشاره نمود . در سال ۲۰۱۱ آلودگی با این باکتری در آمریکا به ۸۰۰۰۰ بیماری منتج گردید که در مورد ۵۰۰ نفر به بستری و ۱۰۰ نفر به مرگ منجر گردید (Scallan et al., 2011).

گونه کلرا، عامل بیماری وبا با میزان مرگ و میر ۳۰ الی ۵۰ درصد و دوره نهفتگی چند ساعت تا چند روز می‌باشد (Zereen et al.,2019). گونه *پاراهمولیتیکوس* باعث مسمومیت غذایی با دوره کمون ۹ تا ۲۵ ساعت بوده و دوره بیماری حدود ۸ روز می‌باشد. این مسمومیت با اسهال شدید آبکی عاری از خون و مخاط به همراه درد شکم، استفراغ و تب مشخص می‌شود. گونه پاراهمولیتیکوس مسئول بروز ۷۰-۵۰ درصد از موارد گاستروانتریت و اسهال در کشور های آسیایی است (Heng et al., 2017, Ruichao et al., 2016). گونه ولنیفیکوس به شدت تهاجمی بوده و پس از ایجاد باکتریمی در افراد مستعد اعم از افرادی که دارای زخم-های باز در سطح بدن خود بوده و به نحوی با محیط آلوده دریایی در تماس هستند و یا افراد با ضعف سیستم ایمنی می‌تواند باعث بروز بیماری شده و حتی منجر به مرگ و میر گردد. گونه میمیکوس شباهت‌های ساختاری و عملکردی زیادی به گونه *کلرا* دارد و همانند گونه *کلرا* توانائی رشد در غلظت کم نمک را دارا می‌باشد. توانایی ایجاد بیماریهای روده‌ای و تولید سم از دیگر مشخصه‌های بارز این باکتری است (Jaksic et al., 2002, Thompson et al., 2008).

هدف از این تحقیق بررسی میزان آلودگی آبزیان در مرحله توزیع (آبزیان خام) و معرفی روش های شناسایی سریعتر ملکولی می باشد.

روش کار

جمع آوری نمونه‌ها

این بررسی توصیفی، در بازه زمانی تابستان ۹۸ ، از۶۴ ماهی خام عرضه شده در ۳۱ فروشگاه عرضه کننده ماهی خام در مناطق مرکز ، شمال ،جنوب ، شرق و غرب شهر اصفهان (p=0.02) که به روش نمونه گیری خوشه ای تصادفی انتخاب شده بود ، صورت پذیرفت . در مورد همه نمونه ها، اطلاعاتی همچون تاریخ و زمان نمونه برداری، دمای نمونه، نوع ماهی و محل نمونه برداری ثبت و نمونه ها به سرعت و ظرف کمتر از سه ساعت به آزمایشگاه انتقال می‌یافت. نمونه‌های ماهی از هر دو نوع آزاد و پرورشی عرضه شده تهیه گردید. این نمونه ها شامل قزل-آلا، حلوابندری، صافی، سرخو، حلوا سفید، کیلکا، شیر دریایی، حسون و شوریده بود.

کشت میکروبی

پس از انتقال نمونه ها به آزمایشگاه ، با رعایت اصول نمونه برداری استریل از پوست و عضلات نمونه ها برداشته و پس از همگن کردن نمونه‌ها، ۲۵ گرم از نمونه‌های همگن شده را توزین و در مرحله اول، در ۲۲۵ میلی لیتر از محلول ۳/۵٪ نمک به مدت ۶ ساعت در انکوباتور ۴۲ درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری گردید . در مرحله دوم، یک میلی لیتر از رقت 10^{-1} مرحله قبل برداشته و با تلقیح در لوله های آزمایش حاوی ۹ میلی لیتر محیط کشت آب پپتونه (مرک، آلمان) رقت های 10^{-2} تا 10^{-6} تهیه و این لوله ها به مدت ۱۸ ساعت در انکوباتور ۴۲ درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری گردیدند. در مرحله آخر کشت میکروبی بااستفاده از روش کشت سطحی، از سه رقت آخر

در محیط کشت انتخابی TCBS (مرک ، آلمان) استفاده و سپس پرگنه ها شمارش گردید. پرگنه های ویبریو در سطح این محیط به رنگ زرد تا خاکستری مشاهده می گردید . پرگنه های گونه پاراهمولیتیکوس سبز تا آبی رنگ می باشد . پرگنه های ایجاد شده پس از شمارش به محیط کشت آگار خوندار (مرک، آلمان) به جهت ماندگاری تا زمان فرایند PCR انتقال یافت (Markey et al., 2013, Till, 2014). باروری محیطهای کشت میکروبی در مورد نمونه کنترل مثبت باکتری ویبریو (ATCC 17802) مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران تایید گردید.

استخراج DNA

در این مرحله از همه باکتری های شناسایی شده در محیط جامدTCBS که در محیط ژلوز خون دار نگهداری می‌گردید، در محیط کشت LB Broth (مرک، آلمان) کشت می گردید. در این مرحله ابتدا با استفاده از کیت (سیناژن، ایران)، DNA استخراج گردید. برای استخراج DNA براساس دستورالعمل شرکت سازنده کیت اقدام گردید. غلظت وکیفیتDNA استخراج شده با استفاده از نانودراپ (ND-1000 PeqLab) مورد ارزیابی قرارگرفت. DNAهای استخراج شده تا زمان مصرف در فریزر -۲۰درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

آزمایشNested PCR

در این تحقیق دو مرحله از فرایند PCR ، یک مرحله برای تعیین جنس باکتری ها و مرحله دوم با استفاده از محصول مرحله اول آزمایش پلیمراز آشیانه ای(Nested PCR) برای تعیین گونه ها انجام گردید. در این آزمایش در مرحله اول قطعات بزرگتری تولید و سپس این قطعات بعنوان الگو برای مرحله دوم بکار می رود . با انجام این روش حساسیت و اختصاصیت آزمایش به طور قابل ملاحظه ای افزایش پیدا می‌کند. پس از آماده سازی پرایمرها و طراحی سیکل‌های حرارتی، فرایند PCR انجام گردید. آزمون PCR در مورد تایید جنس با استفاده از جفت پرایمر اختصاصی ژن‌هایRNA ریبوزومی صورت پذیرفت. پرایمرها توسط شرکت سیناژن (تهران، ایران) سنتز گردیدند. توالی پرایمرهای مورد استفاده و اندازه تقریبی محصول به دست آمده در جدول ۱ آمده است (Maheshwari et al., 2011). برای استفاده از پرایمرها، ابتدا پرایمرهای مورد استفاده طبق دستور العمل شرکت سازنده رقیق واستفاده گردید.

در نهایت جهت انجام فرایند PCR، از مستر های تجاری (Master Mix) شرکت سیناژن (CinnaGen PCR master kit) استفاده گردید . مقدار ۷/۵µl از این مسترها (شامل D.W، PCR بافر، dNTP ، MgCl2، Taq polymerase و Loading buffer می باشد) با µl ۱ از F primer و ۱µl از ۳/۵,R primer از D.W و µl ۲ از DNA در یک تیوب مخلوط و سپس تیوب ها در دستگاه ترموسایکر(اپندروف،آلمان) قرار داده شد. به جهت نداشتن کنترل مثبت در مورد گونه های میمیکوس و ولنیفیکوس، صرفا از گونه پاراهمولیتیکوس (ATCC 17802) جهاد دانشگاهی بعنوان کنترل مثبت استفاده گردید . کلیه مراحل فوق در مورد نمونه کنترل مثبت نیز انجام و در مورد نمونه کنترل منفی نیز از آب مقطر تزریقی بجای DNA استفاده گردید.

چرخه‌های PCR در مورد جنس شامل مراحل دناتوراسیون اولیه (واسرشتگی) در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، و ۳۰ چرخه شامل دناتوراسیون در ۹۲ درجه سانتیگراد به مدت ۴۰ ثانیه، اتصال پرایمرها در ۶۰ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه و امتداد در ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه بود. در نهایت امتداد نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ دقیقه انجام گرفت.

جدول ۱ توالی پرایمر های جنس وگونه های ویبریو (Maheshwari et al.,2011)

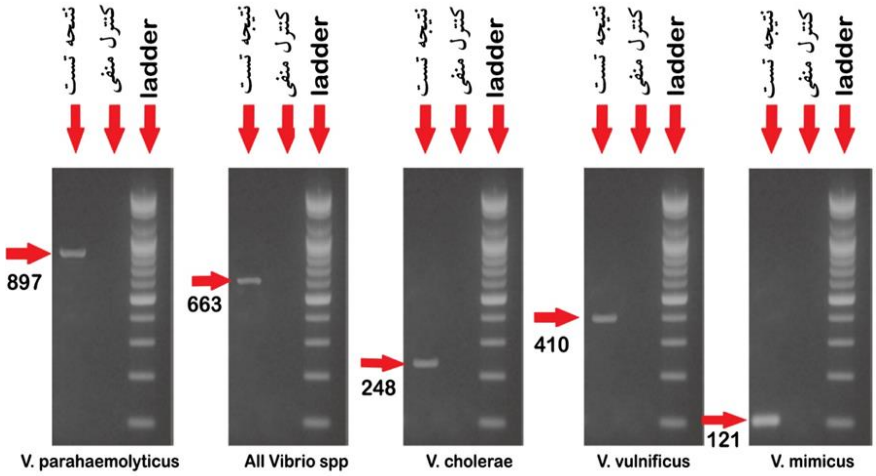
نام باکتری	ژن مربوطه	پهنای باند	توالی و جهت پرایمر
All *Vibrio* spp.	V.16S	663	CGGTGAAATGCGTAGAGA- F TTACTAGCGATTCCGAGTTC-R
V. vulnificus	Vv.hsp Vvhsp	410	GTCTTAAAGCGGTTGCTGC- F CGCTTCAAGTGCTGCTGGTAGAAGR
V. parahaemolyticus	Vp.flaE	897	GCAGCTGATCAAAACGTTGAGT- F ATTATCGATCGTGCCACTCAC- R
V. mimicus	Vm.sodB Vm.sodB	121	CATTCGGTTCTTTCGCTGAT-F GAAGTGTTAGTGATTGCTAGAGATR
V. cholera	Vc.sodB Vc.sodB	248	AAGACCTCAACTGGCGGTA-F GAAGTGTTAGTGATCGCCAGAGT-R

پس از انجام PCR، به‌منظور مشخص کردن اندازه محصولات تولیدشده، ازروش الکتروفورز استفاده شده و محصولات روی ژل آگارز یک درصد حاوی اتیدیوم بروماید‌منتقل و به همراه مارکرهایDNA در ۹۰ ولت به مدت ۳۰ دقیقه الکتروفورز گردیدند. اندازه باندهای حاصل از تکثیرژن های مختلف بااستفاده از مارکرهای 100bp (SM0241-Fermentase,Germany) تعیین گردید .

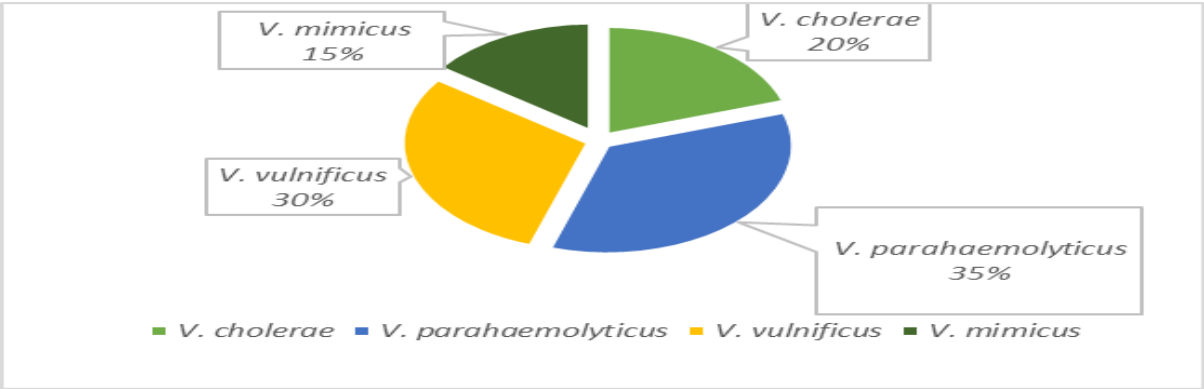
نتایج

درنهایت پرگنه ها در کشت ثانویه بر اساس شماره نمونه، نام ماهی و رنگ پرگنه در محیط کشت TCBS شمارش و پس از مقایسه با استاندارد ، میزان آلودگی بیش از حد مجاز نمونه ها تعیین گردید . براین اساس، ۹۵/۶۶ درصد نمونه ها آلودگی بیش از حد مجاز را دارا بودند و تنها در ۴/۳۴ درصد نمونه‌ها آلودگی ویبریایی کمتر از حد استاندارد بود.

در مرحله دوم برای تایید تشخیص جنس ویبریو درمرحله نخست وسپس شناسایی گونه های غالب آزمایشات مولکولی صورت پذیرفت. جنس *ویبریو* دارای باند ۶۶۳ بازی، گونه *پاراهمولیتیکوس باند* ۸۹۷ بازی، گونه *کلرا* باند ۲۴۸ بازی، گونه *ولنیفیکوس* باند ۴۱۰ بازی و درنهایت گونه *میمیکوس* باند ۱۲۱ بازی را قابل تشخیص نمودند. نتایج آزمایش مولکولی در تصویر۱ آمده است. در نهایت از میان ویبریوهای جداشده، فراوانی آلودگی به گونه‌های مختلف ویبریو تعیین گردید که در تصویر ۲ آمده است.



تصویر ۱ - باند های ایجاد شده در فرایند الکتروفورز



تصویر۲- درصد آلودگی نمونه ها به گونه های مختلف *ویبریو* بر اساس روش Nested PCR

با استفاده از نسخه ۲۲ نرم افزار آماری spss و آزمون آماری مربع کای بین متغیر های منطقه نمونه برداری، نوع ماهی، سیستم پرورش و آلودگی نمونه ها اختلاف آماری معنا داری مشاهده نگردید ($p<0.05$) .

بحث

بر اساس نتایج این بررسی و مطابق با دستورالعمل‌های استاندارد ملی ایران که تعداد باکتری‌های *ویبریو پاراهمولیتیکوس* باید از 10^4 عدد در هر گرم اغذیه دریایی کمتر باشد (استاندارد ملی ایران، شماره ۲۳۹۴)، ۹۵/۶۶ درصد نمونه‌های برداشته شده براساس نتایج کشت میکروبی دارای آلودگی بیش از حد استاندارد بوده است . هم چنین براساس نتایج این بررسی از میان ویبریوهای جداشده میزان آلودگی به گونه‌های پاراهمولیتیکوس ، کلرا ، میمیکوس و ولنیفیکوس به ترتیب ۳۵ ، ۲۰ ، ۱۵ و ۳۰ درصد تعیین گردید. مطالعات مشابه دیگری نیز در این زمینه در دنیا صورت پذیرفته است از جمله نتیجه تحقیقی که از تمام ۷۳ نمونه آب دریا، گونه‌های مختلف *ویبریو* جدا شده است (Jaksic et al., 2002). بررسی‌ها حاکی از آن است که برخی گونه‌های ویبریو در مناطق خاصی به شکل اندمیک حضور داشته و قدرت تحمل بالای نمک در این باکتری سبب شده تا جزوفلور میکروبی آب های شور باشد (Su et al, 2007). بررسی ۲۱۵ نمونه میگو از مزارع پرورشی نیز ، میزان آلودگی به جنس *ویبریو* را ۷۶ درصد شناسایی نموده است (Talukder et al., 2019). بررسی دیگری در تایلند نیز نشان داد که میزان شیوع گونه‌های ویبریو کلرا و ویبریو پاراهمولیتیکوس در غذاهای دریایی به ترتیب ۱۰۰ درصد و ۸۰ درصد بوده است که به مراتب از نتایج بررسی حاضر بیشتر است (Senachai et al., 2013). هرچند که در بررسی‌های فوق فراوانی آلودگی در مورد جنس با نتایج تحقیق حاضر نسبتا همخوان است ولی اختلاف در فراوانی آلودگی را می‌توان به نوع نمونه‌ها (ماهی خام)، فصل نمونه‌گیری، شرایط اکولوژیک، آلودگی محیطی، تفاوت گونه‌ای و هم چنین تفاوت چشمگیر در کیفیت شرایط بهداشتی از زمان صید تا عرضه نسبت داد. علاوه بر علل آلودگی اولیه که اشاره گردید، آلودگی‌های ثانویه نیز می‌توانند نقش مهمی در افزایش میزان شیوع گونه‌های ویبریو داشته باشد. دست‌های آلوده کارکنان مراکز عرضه ماهی خام، عدم رعایت بهداشت فردی و تماس فراورده‌های دریایی صید شده با سطوح آلوده از موارد اصلی آلودگی‌های ثانویه به حساب می‌آیند. از طرفی به احتمال زیاد فرایند برودتی مناسبی نیز بر روی این فراورده‌ها انجام نگرفته است.

در خصوص فراوانی گونه ها نیز براساس بررسی های مشابه فراوانی آلودگی، ۳۲ درصد *ویبریو پاراهمولیتیکوس*، ۷ درصد *ویبریو الجینولیتیکوس* و ۳۹ درصد گونه *ولنیفیکوس* در ماهی گزارش شده است (Wey et al.,

2014). در تحقیق دیگر نیز در بین موارد ماهی آلوده، ۲۹/۲ درصد *ویبریو پاراهمولیتیکوس*، ۲۱/۹ درصد گونه *هاروی وآلجینولیتیکوس*، ۹/۷۵ درصد *گونه انگوایلاریوم* و ۱۷درصد نمونه ناشناس گزارش گردید (Tarr et al., 2007). در داخل کشور نیز ، رحیمی و همکاران در سال۹۳ فراوانی آلودگی به ویبریو را در گونه های میگو تازه و نمک سود شده بندر گناوه ۲۱/۶۶ درصدگزارش نمودند. فراوانی گونه‌های کلرا، ولنیفیکوس، پاراهمولیتیکوس و هاروی در این تحقیق به ترتیب ۱/۶۶، ۸/۳۳، ۶/۶۶ و ۵ درصد بوده است (Hosseini et al., 2014). رئیسی و همکاران نیز در سال ۲۰۱۲ ، فراوانی آلودکی صدف را ۵ درصد (Raissy et al., 2012) و در سال ۲۰۱۴ فراوانی آلودگی ماهی را ۲۶/۸ درصد برآورد نمودند (Raissy et al., 2014). جلالی نیز در سال ۱۳۸۸ فراوانی آلودگی به گونه پاراهمولیتیکوس و سایر گونه ها را به ترتیب ۱/۵ و ۲/۴ درصد گزارش نمود (Jalali et al., 2010). شیرازی و همکاران نیز در مطالعه دیگری در ماهی سفید و قزل آلای رنگین کمان، میزان آلودگی ویبریایی را ۱۰-۵ درصد گزارش نمودند (Shirazi et al., 2007). صفرپور نیز در تحقیق مشابهی از بین ۲۰۰ نمونه، فراوانی آلودگی به گونه های *ویبریو* و گونه *پاراهمولیتیکوس* را به ترتیب ۵ و ۲۱ درصد و میزان آلودگی به جنس را ۳۴/۵ درصد گزارش نمود (Safarpoor et al., 2014).

هرچند که نسبتا فراوانی آلودگی در مورد گونه‌ها نیز با نتایج سایر محققین همخوانی دارد ولی تفاوت فراوانی آلودگی در تحقیقات متفاوت می‌تواند دلایلی از جمله نوع نمونه، روش پرورش، گونه *ویبریو*، تعداد نمونه، روش انجام آزمایش، منطقه جغرافیایی، فصل و نوع روش آزمایش کشت یا مولکولی باشد. از آنجا که در این تحقیق برای شناسایی گونه‌ها از روش مولکولی استفاده گردید، امکان مثبت شدن نمونه‌های غیر فعال دور از انتظار نبوده که می‌تواند منجر به بالاتر بودن نتایج تحقیق حاضر نسبت به نتایج برخی از محققین باشد.

هم‌چنین عدم وجود اختلاف معنادار بین منطقه نمونه برداری، میزان آلودگی و نوع ماهی که در این تحقیق بعنوان یک متغیر بررسی گردید، به دلیل منبع و خاستگاه مشترک ماهیان توزیعی در سطح شهر اصفهان می‌باشد.

نتایج بررسی حاضر نشان دهنده شیوع بالای جنس *ویبریو* و گونه *پاراهمولیتیکوس* در نمونه های ماهی خام مراکز عرضه آبزیان شهرستان اصفهان می‌باشد. ویبریو *پاراهمولیتیکوس* اساسی‌ترین باکتری بیماری‌زای منتقله از طریق غذا در آبزیان می‌باشد (Lee et al, 2019). به هرحال هر چند که طبخ ماهی بار میکروبی آلودگی ویبریایی را کاهش می‌دهد ولی به جهت اهمیت بیماری-زایی ویبریوها و با نیم نگاهی به استانداردهای ملی ایران(۲۳۹۴،۹۶۶۷،۹۸۹۹) که حد مجاز گونه *پاراهمولیتیکوس* را ۱۰/۰۰۰ عدد در هر گرم براساس استاندارد FDA یا صفر در مورد گونه *کلرا* اعلام می دارد، این درصد فراوانی بالا زنگ خطر جدی برای بهداشت عمومی جامعه محسوب می‌گردد. لازم است سازمان‌های نظارتی ذیربط در این خصوص مراقبت بیشتری داشته باشند. پر واضح است که آلودگی ویبریایی می‌تواند برای مصرف کنندگان حتی قبل از پخت نیز در قالب آلودگی متقاطع باعث آلودگی سایر فرآورده های غذایی گردد. به همین جهت رعایت بهداشت فردی در مورد کارکنان مراکز تولید و عرضه آبزیان و هم چنین مصرف کنندگان آبزیان به جهت اجتناب از آلودگی متقاطع کاملا ضروری به نظر می رسد . ضمن آنکه برای افرادی که در تماس مستقیم با آلودگی می‌باشند نیز خطر آلودگی مستقیم در صورت نفوذپذیری پوست و مخاطات دور از انتظار نیست (Hedayathosseini et al.,2004, Kim et al., 2015).

در نهایت پیشنهاد می‌گردد به جهت اهمیت این آلودگی، از روش PCR به جهت کنترل آلودگی ویبریایی در فرآورده‌های غذایی دریایی استفاده گردد.

منابع

۱. سازمان ملی استاندارد ایران . (۱۳۷۸) استاندارد شماره ۲۳۹۴. چاپ اول.

۲. حسینی سحر، صفرپوردهکردی فرهاد، رحیمی ابراهیم، شاکریان امیر. (۱۳۹۳). مطالعه میزان شیوع گونه های ویبریو و فراوانی ژنهای حدت در ویبریو پاراهمولیتیکوس های جداسازی شده از میگوهای تازه و نمک سود شده در بندرگناوه. جلد۴، شماره۲، صفحه ۱۷-۲۷ .

۳. جلالی محمد، مهدوی منیژه، جوادی عباسعلی، خوروش فرزین، عطایی بهروز، عابدی داریوش .(۱۳۸۸). آلودگی ویبریو پاراهمولیتیکوس در اغذیه دریایی شهر اصفهان. مجله بیماریهای عفونی و گرمسیری ایران. جلد۱۴، شماره۴۶ ، صفحه۳۷-۳۳.

4. Ansari, M. and Raissy, M. 2010. In vitro susceptibility of commonly used antibiotics against Vibrio spp. isolated from Lobster (*Panulirus homarus*). Afr J. Microbiol Res. 4(23), 2629-2631.
5. Elmahdi S, DaSilva LV, Parveen S. 2016. Antibiotic resistance of Vibrio parahaemolyticus and Vibrio vulnificus in various countries: A review. Food Microbiol. 57, 128-34.
6. Hang L. 2012. Community compositions of Vibrio in freshwater products and pathogenic analysis. Dissertation for Master degree, Yangzhou: Yangzhou University, 19–35.
7. Heng SP, letschumanan V, deng CU, Abmutalib NS, Khan TM, Chuah LH, Chan K.G., Goh B.H, Pusparajah P., Lee L.H. 2017. Vibrio vulnificus: An Environmental and Clinical Burden**.** Front Microbiol. 8(997): 73-81.
8. Jaksic S, Uhitil S, Petrak T, Bazuli D, KarolyiLG**.** 2002. Occurrence of Vibrio spp. in sea fish, shrimps and bivalve molluscs from Adriatic Sea. Food Cont. 13, 491-493.
9. Lee y, Choi y, Lee S, H Lee H, Kim S, Ha J, Lee J , H Oh H, Y Kim Y, Yoon Y. 2019. Occurrence of pathogenic Vibrio parahaemolyticus in seafood distribution channels and their antibiotic resistance profiles inS.Korea.Let Appl Microbiol. 68(2), 128-133.
10. 1Lopatek M, Wieczorek K, Osek J. 2018. Antimicrobial Resistance, Virulence Factors, and Genetic Profiles of Vibrio parahaemolyticus from Seafood. Appl Environ Microbiol. 84(16), 1-10
11. MarkeyB,LeonardF,ArchambaultM,Cullina neA,MaguireD.2013.Clinical Veterinary micro
12. Shirazi MH, Ranjbar R, Salari MH, Bagheri Y, Najafi A and Sadeghifard N. 2007. Isolation of Vibrio parahaemolyticus from fish in Tehran and their antimicrobial resistance. Iran J Infect Diseases Trop Med. 11(35), 65-68.
13. Srivastava A, Singh AN, Singh M. 2016. Antibacterial activity of spices against Vibrio species isolated from pond water. European J Exp Biol. 6(2), 21–25.
14. Su YC, Liu C. 2007. Vibrio parahaemolyticus: A concern of seafood safety. Food Microbiol. 24(6),549- 558
15. Talukder B, Chakma F, Sabuj AAM, Haque ZF, Rahman MT, Saha S.2019. Identification, prevalence and antimicrobial susceptibility of major pathogenic bacteria in exportable shrimp (Penaeus monodon) of southern Bangladesh. Int J Fish Aquat Stud. 7(1), 9669.
16. Tarrc L, Pate JS, Puhr ND, Sowers EG, Bopp CA, Strockbine NA.2007. Identification of Vibrio Isolates by a Multiplex PCR Assay and rpoB Sequence Determination, J Clinic Microbiol. 45(1), 134-140.
17. Thompson CC, Thompson FL,Vicente AC. 2008.Identification of Vibrio cholerae and Vibrio mimicus by multilocus sequence analysis (MLSA). Int J Syst Evol Microbiol. 58(3), 617-621.

18. Tille P.2014. Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology, 14th edition. Elsevier. pages: 175-202.
19. Maheshwari M, Krishnaiah N, Ramana DBV.2011. Evaluation of Polymerase Chain Reaction for the detection of Vibrio cholerae in Contaminants. Ann Biol Res. 2(4), 212-217.
20. Mohammed Y, Aboderin AO, Okeke IN, Olayinka AT. 2018. Antimicrobial resistance of Vibrio cholera from sub-Saharan Africa: a systematic review. Afr J Lab Med. 7(2), 1–7.
21. Obaidat MM, Salman AEB, Roess AA. Virulence and Antibiotic Resistance of Vibrio parahaemolyticus Isolates from Seafood from three developing countries and of worldwide environment seefood and clinical isolates from2000 to 2017 .80(12), 2060-2067
22. Raissy M, Moumeni M, Ansari M and Rahimi E. 2012. Antibiotic resistance pattern of some Vibrio strains isolated from seafood, Iran J Fish Sci. 11(3), 618-626.
23. Raissy, M. Moumeni, M. Ansari, M and Rahimi, E. 2012. Occurrence of *Vibrio* spp. in Lobster and Crab from the Persian Gulf, J Food Saf. 32(2), 198-203.
24. Ruichao L, Chiou J, Chan EW, Chen S. A 2016. Novel PCR-Based Approach for Accurate Identification of Vibrio parahaemolyticus, Front Microbiol. 7(44), 23-29.
25. Safarpoor Dehkordi F, Hosseini S , Rahimi E , Momeni M , Yahaghi E , Khodaverdi E.2014. Study the distribution of virulence genes of Vibrio parahaemolyticus isolated from fish, lobster and crab caught from Persian Gulf. Iran J Med Microbiol. 8(2),1-7.
26. Scallan, E., Hoekstra, R.M., Angulo, F.J., Tauxe, R.V., Widdowson, M.A., Roy, S.L., et al. 2011. Foodborne illness acquired in the United States-major pathogens. Emerg Infect Dis, 17(1), 7-15.
27. Senachai P, Chomvarin C, Namwat W, Wongboot W, Wongwajana S, Tangkanakul W. 2013. Application of tetraplex PCR for detection of Vibrio cholerae, V. parahaemolyticus, V. vulnificus and V. mimicus in cockle. Southeast Asian J Trop Med Publ Health. 44(2), 249- 58.
28. Wey S, Zhao H, XianY, Ahossain M, Wu X. 2014. Multiplex PCR assays for the detection of Vibrio alginolyticus, Vibrio parahaemolyticus, Vibrio vulnificus, and Vibrio cholerae with an internal amplification control, Diag Microbiol Infect Dis.79, 115-118.
29. Zereen F, Akter S, Abdus Sobur M, Hossain MT, Rahman T. 2019. Molecular detection of Vibrio cholera from human stool collected from SK Hospital, Mymensingh, and their antibiogram. J Adv Vet Anim Res. 6(4), 451-455.

Study on the Frequency of *Vibrio* species in fish from Isfahan

Karimi Alavijeh A[1], Sharifzadeh A[2*]

1. Graduate of Pharmacy Shahreza Branch, Islamic Azad University, Shahreza, Iran

2. Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

***Corresponding author:** *sharifzadeh@iaushk.ac.ir*

Received: October 21, 2020 Accepted: January 19, 2021

Abstract

Annually, numerous reports of food poisoning following the consumption of seafood contaminated with *Vibrio* species have been reported. The present survey was carried out to evaluate the frequency rate of *Vibrio* species in seafood products from the fish samples in Isfahan, Iran. In this survey, 64 fresh fish samples were purchased from market in Isfahan and transferred to the Food Quality Control Laboratory, Islamic Azad University of Shahreza. According to Iran's National Standard methods, samples were tested for *Vibrio parahaemolyticus*. Positive samples were evaluated for the presence of bacterial species using Nested Polymerase Chain Reaction. The presences of *V. parahaemolyticus*, *V. cholera*, *V. vulnificus*, and *V. mimicus* were studied. Results showed that 95% of samples were contaminated with *Vibrio* species. In studied samples, *V. parahaemolyticus* had the highest frequency rate (35%), while *V. mimicus* had the lowest frequency rate (15%). The frequency of *V. cholera* and *V. vulnificus* were 20% and 35%, respectively. The results of microbial investigations of raw fish collected from different markets of Isfahan cannot be defined satisfactorily. The high prevalence of *Vibrio* species in samples confirmed the lack of hygienic conditions in fish production and distribution centers. It seems that processing plants as well as transportation methods are not of appropriate sanitary conditions.

Keywords: PCR, *Vibrio*, Fish, Contamination.

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International license (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/). Non-commercial uses of the work are permitted, provided the original work is properly cited

Copyright © 2021 Shahrekord Branch, Islamic Azad University.