مقاله اماده انتشار می باشد

بررسی آلودگی آبزیان عرضه‌شده در شهرستان اهواز به گونه‌های *ویبریو* و ارزیابی مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌ها

بررسی آلودگی به ویبریو در آبزیان

بهاره سادات عباسی[۱]، ابراهیم رحیمی[*۲]

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد بهداشت مواد غذایی، گروه بهداشت مواد غذایی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

۲- استاد، گروه بهداشت مواد غذایی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

[*]نویسنده مسئول مکاتبات: ebrahimrahimi55@yahoo.com

(تاریخ دریافت: // تاریخ پذیرش: //)

چکیده

گونه‌های بیماری‌زای *ویبریو* به‌طور معمول در محیط‌های دریایی و آب‌های شور ساکن هستند و می‌توانند در غذاهای دریایی وجود داشته باشند و شیوع آن‌ها در فصل تابستان بیشتر است. هدف از پژوهش حاضر بررسی آلودگی آبزیان عرضه‌شده در شهرستان اهواز به گونه‌های *ویبریو* و ارزیابی مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌ها بود. در این مطالعه ۱۶۰ نمونه شامل ۴۰ نمونه میگو و ۱۲۰ نمونه از ماهی شیر، حلوا و شوریده به‌صورت تصادفی از مراکز عرضه شهرستان اهواز نمونه‌گیری و در شرایط سترون به آزمایشگاه انتقال داده شد. برای جستجوی *ویبریو* از روش کشت خطی، گونه‌ها و سویه‌های مختلف از روش PCR و ارزیابی مقاومت آنتی‌بیوتیکی Disk-Diffiusion استفاده شد. نتایج نشان داد آلودگی به انواع *ویبریو* از مجموع ۱۶۰ نمونه، ۴۶ نمونه (۲۸/۷۵ درصد) بود. به‌این‌ترتیب آلودگی در میگو ۱۳ نمونه (۳۲/۵ درصد)، ماهی شیر ۱۱ نمونه (۲۷/۵ درصد)، ماهی شوریده ۱۰ نمونه (۲۵ درصد) و ماهی حلوا ۱۲ نمونه (۳۰ درصد) بود. فراوانی ژن‌های حدت *ctxA* (۵۰ درصد) و *ctxB* (۵۰ درصد)، *tdh* (۴۱/۱۷ درصد)، *trh* (۴۷ درصد) *flaC* (۵۰ درصد) و *vvh* (۴۴/۴۴ درصد) بود. نتایج مقاومت آنتی‌بیوتیکی نشان داد بیشترین مقاومت مربوط به آمپی‌سیلین (۸۹/۱۳ درصد) و کانامایسین (۸۲/۶۰ درصد) و کمترین مقاومت مربوط به امی‌پنم بود. نتایج مطالعه نشان داد انواع فرآورده‌های دریایی می‌توانند منبع مهم آلودگی به *ویبریو* باشند که با رعایت بهداشت و پخت غذاهای دریایی می‌توان از عفونت‌های ناشی از آن‌ها جلوگیری کرد.

واژه‌های کلیدی: *ویبریو کلرآ*، *ویبریو پاراهمولیتیکوس*، *ویبریو آلژینولیتیکوس*، *ویبریو ولنیفیکوس*، مواد غذایی دریایی

مقدمه

تولید جهانی غذاهای دریایی ازجمله ماهی‌های دریایی، صدف‌ها و میگو به‌طور قابل‌توجهی در بسیاری از کشورهای جهان طی پنج دهه گذشته افزایش‌یافته است و مصرف سرانه غذاهای دریایی در بالاترین حد خود قرار دارد. عرضه غذاهای دریایی با میزان سالانه ۳/۲ درصد افزایش‌یافته است که از رشد جمعیت جهان ۱/۶ درصد پیشی گرفته است. تولید غذاهای دریایی برای توسعه جهانی و ملی، تأمین غذای پایدار، امنیت غذایی و کاهش گرسنگی و فقر، امری حیاتی است. غذاهای دریایی دارای مقدار زیادی مواد مغذی هستند و می‌توانند به یک رژیم غذایی سالم و خوشمزه برای انسان کمک کنند. ماهیگیری و آبزی‌پروری ۱۴ تا ۱۶ درصد پروتئین حیوانی مصرفی در سراسر جهان را تأمین می‌کند و بیش از ۱ میلیارد نفر به غذاهای دریایی به‌عنوان منبع اصلی پروتئین خود متکی هستند (Bank *et al.*, 2020).

مصرف غذاهای دریایی به‌عنوان بخشی از یک رژیم غذایی سالم توصیه می‌شود، زیرا این‌ها منابع شناخته‌شده پروتئین هایی باارزش بیولوژیکی بالا، اسیدهای چرب غیراشباع، ویتامین‌ها (A و D) و مواد معدنی مانند کلسیم و فسفر هستند. علاوه بر این، مصرف غذاهای دریایی با خطر کم بیماری قلبی مرتبط است. علیرغم این مزایا، غذاهای دریایی ممکن است دارای میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا و فاسد کننده باشند که از محیط یا به دلیل آلودگی در طول یا پس از فرآوری به وجود آمده‌اند (Baptista *et al.*, 2020).

بر اساس گزارش سازمان جهانی بهداشت (WHO) بیماری‌های منتقله از غذا سالانه مسئول حدود ۶۰۰ میلیون مورد و ۴۲۰۰۰۰ مرگ‌ومیر هستند. داده‌ها از مراکز علوم و فنون ایالات‌متحده نشان داد که غذاهای دریایی بین سال‌های ۱۹۹۸ تا ۲۰۰۷ با ۸۳۸ شیوع و ۷۲۹۸ بیماری مرتبط بوده است. در طول دوره ۲۰۰۱ تا ۲۰۱۰، غذاهای دریایی مسئول ۲۳ درصد موارد گزارش‌شده از غذا بوده است. شیوع بیماری و بین سال‌های ۲۰۱۱ تا ۲۰۱۴ منجر به بیماری ۲۶۰۰۰۰ آمریکایی در برزیل شد، داده‌های اپیدمیولوژیک در مورد بروز یا شیوع بیماری‌های منتقله از طریق غذا کمتر گزارش‌شده است (Barrett *et al.*, 2017). علی‌رغم مزایای تغذیه‌ای، مصرف غذاهای دریایی حاوی میکروارگانیسم-های بیماری‌زا انسانی ممکن است خطر بالقوه بیماری‌های ناشی از غذا را به همراه داشته باشد. باکتری‌های بیماری‌زا، ویروس‌ها، انگل‌ها، مواد شیمیایی، فلزات سنگین و سموم طبیعی در غذاهای دریایی یافت شده‌اند. خطر بیماری ناشی از مصرف غذاهای دریایی به گونه‌های غذاهای دریایی، شرایط محیطی، محل برداشت، پردازش و جابجایی پس از برداشت در طول بازاریابی، شرایط نگهداری و عادات غذایی مانند مصرف غذاهای دریایی خام یا کم فرآوری شده بستگی دارد (Oehlenschläger, 2012). یکی از میکروارگانیسم‌های پاتوژن آلوده‌کننده مواد غذایی دریایی گونه‌های *ویبریو* است.

بیش از ۱۰۰ گونه باکتری *ویبریو* که در آب دریا، اقیانوس‌ها و دهانه رودخانه‌ها وجود دارند، در سراسر جهان شناسایی‌شده‌اند. در میان تمام گونه‌های *ویبریو*، مهم‌ترین گونه‌ها شامل ویبریو کلرآ (*V. cholerae*)، ویبریو پاراهمولیتیکوس (*V. parahaemolyticus*)، ویبریو آلژینولیتیکوس (*V. alginoliticous*) و ویبریو ولنیفیکوس (*V. vulinificus*) هستند؛ شیوع گونه‌های بیماری‌زا ویبریو اخیراً به دلیل گرم شدن دمای سطح دریا افزایش‌یافته است که به‌نوبه خود منجر به افزایش جهانی موارد ویبریوز شده است، بدیهی است که عفونت‌های *ویبریو* در طول تابستان و اوایل پاییز رخ می‌دهد که مربوط به گرم‌تر شدن دمای آب دریا است (Lee *et al.*, 2019).

گونه‌های ویبریو باکتری‌های گرم منفی هستند که می‌توانند در آب‌های دریایی، ساحلی معتدل و گرمسیری در سراسر جهان یافت شود و یکی از شایع‌ترین پاتوژن‌های غذایی است و معمولاً منجر به گاستروانتریت خود محدود شونده می‌شود، اما در بیماران نقص ایمنی یا کسانی که از قبل شرایطی مانند بیماری کبد یا دیابت دارند می‌تواند کشنده باشد. *ویبریو پاراهمولیتیکوس* علت اصلی گاستروانتریت باکتریایی مرتبط با مصرف غذاهای دریایی در بسیاری از کشورها ازجمله ایالات‌متحده و کشورهای مختلف آسیایی است. عفونت‌های *ویبریو* پاراهمولیتیکوس می‌تواند هزینه‌های پزشکی قابل‌توجهی را به همراه داشته باشد. غذاهای دریایی آلوده به *ویبریو پاراهمولیتیکوس* باعث حدود ۲۱ میلیون دلار هزینه سالانه مربوط به سلامت در ایالات‌متحده شده است (Chen *et al.*, 2023). *آن‌ها* ترجیحاً در آب‌های دریایی گرم با شوری کم رشد می‌کند. مطالعات نشان داده است که این پاتوژن در دمای کمتر از ۱۰ درجه سلسیوس نابود می‌شود یا حداقل غیرفعال می‌شود. مصرف غذاهای دریایی خام یا پخته نشده یکی از علل شایع شیوع *ویبریو* پاراهمولیتیکوس است (Taylor *et al.*, 2018). ژن *tdh* (thermostable direct hemolysin) انواع مختلفی از فعالیت‌های بیولوژیکی مانند فعالیت همولیتیک، سمیت سلولی، سمیت قلبی و سمیت انتروتوکسیک را اعمال می‌کند. *tdh* یک سم منفذ ساز است که منافذی به قطر ۲ نانومتر را روی غشای گلبول قرمز ایجاد می‌کند، اندازه منافذ نسبتاً بزرگ به آب و یون‌ها اجازه می‌دهد تا از طریق غشاء جریان پیدا کنند؛ و سبب اسهال شدید شود. *trh* ((thermostable related hemolysin)) یک سم حساس به حرارت است و ازنظر ایمونولوژیکی شبیه *tdh* است، هر دو ژن، *trh* و *tdh* تقریباً ۷۰ درصد مشابهت دارند و در غشاهای سلول میزبان قرار می‌گیرند و آن‌ها را مختل می‌کنند (Cai and Zhang, 2018)

ویبریو کلرآ ارگانیسم عامل بیماری وبا است که معمولاً انسان را از طریق خوردن آب و غذای آلوده، بیمار می‌کند، با کمک سموم TCP (Toxin Co-Regulated Pilus) روی سطح پرزهای روده کوچک کلنی تشکیل داده و سپس سم وبا (cholera toxin) (CT) ترشح می‌کند. ایجاد اسهال آبکی و استفراغ که منجر به کم آبی شدید و حتی مرگ می‌شود از پیامدهای ویبریو کلرآ است. با توجه به ویژگی‌های سرولوژیکی آنتی‌ژن‌های O سطحی آن، *ویبریو کلرآ* بیش از ۲۰۰ سروتیپ دارد که در آن‌ها فقط سروتیپ O1 باعث همه‌گیری وبا می‌شود. بر اساس ژنوتیپ، O1 بیشتر به بیوتیپ کلاسیک و نوع El Tor طبقه‌بندی می‌شود. بیوتیپ کلاسیک عامل ایجاد شش اپیدمی اول وبا بود (Qin *et al.*, 2020).

سم اصلی مسئول بیماری حاد اسهالی وبا، توسط ژن‌های *ctxA* و *ctxB* کدگذاری می‌شود (Pant *et al.*, 2020).

ویبریو ولنیفیکوس عضوی از جنس ویبریو است. بیشتر گونه‌های *ویبریو* در انسان غیر بیماری‌زا هستند. بااین‌حال *ویبریو ولنیفیکوس* یکی از سویه‌های بیماری‌زای گونه‌های *ویبریو* است. در لاتین، اصطلاح vulnificus به معنای زخم است و *ویبریو ولنیفیکوس* می‌تواند باعث عفونت‌های تهدیدکننده زندگی در بیماران شود. میزان مرگ‌ومیر عفونت‌های این گونه در ایالات‌متحده تقریباً ۳۳ درصد است. این باکتری اولین بار توسط مراکز کنترل و پیشگیری از بیماری‌ها در سال ۱۹۶۴ جدا شد و نام فعلی آن در سال ۱۹۷۹ داده شد. در موجودات متعددی ازجمله صدف، خرچنگ، میگو و انواع ماهی‌ها یافت می‌شود (Phillips and Satchell, 2017). *vvH* (*Vibrio vulnificus* Hemolysin) که ابتدا به‌عنوان همولیزین توصیف شد، باعث همولیز گلبول‌های قرمز می‌شود که گلبول‌های قرمز انسان حساس‌ترین آن‌ها هستند. *ویبریو ولنیفیکوس* نشان داده است که *vvH* کافی در روده کوچک تولید می‌کند تا تهاجم به جریان خون را تسریع کند؛

هنگامی‌که *ویبریو ولنیفیکوس* وارد جریان خون می‌شود، *vvH* با گلبول‌های قرمز، گلبول‌های سفید خون و سلول‌های اندوتلیال عروقی تعامل می‌کنند، و در واقع *vvH* می‌تواند به رشد باکتری در خون انسان کمک کند که باعث سپتی‌سمی (Septicemia) می‌شود (Yuan *et al.*, 2020).

در سطح جهانی، مقاومت آنتی‌بیوتیکی منجر به مرگ سالانه حدود ۷۰۰۰۰۰ انسان می‌شود که انتظار می‌رود تا سال ۲۰۵۰ به ۱۰ میلیون نفر برسد. آنتی بیوتیک‌ها به طور گسترده‌ای برای درمان ویبریوز در انسان و دام‌های آبزی پروری استفاده می‌شود. به عنوان مثال، فلورفنیکول و اکسولینیک اسید عمدتاً برای کنترل ویبریوز در ماهی استفاده می‌شود. کینولون‌ها و فلومکین به طور گسترده برای درمان ویبریوز کلاسیک و آب سرد استفاده می‌شوند. با این حال، استفاده گسترده از آنتی‌بیوتیک‌ها منجر به باقی‌مانده‌های دارویی می‌شود و در نتیجه باعث ایجاد مقاومت آنتی‌بیوتیکی و در نتیجه آلودگی غذا، آب و رسوبات می‌شود. بنابراین، تجزیه و تحلیل مقاومت دارویی عوامل بیماری‌زا در یک منطقه خاص برای تدوین سیاست‌های کاهش آنتی‌بیوتیک محلی و برنامه‌های موثر استفاده از آنتی‌بیوتیک ضروری است (Deng *et al.*, 2020). با توجه به مخاطرات ذکر شده در خصوص آلودگی به *ویبریو* و تهدیدهای این گونه باکتری‌ها بر سلامت انسان، هدف از پژوهش حاضر بررسی شیوع گونه‌های *ویبریو* در انواع ماهی عرضه‌شده در شهرستان اهواز و مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌ها است.

مواد و روش‌ها

-نمونه‌گیری

۱۶۰ نمونه شامل ۴۰ نمونه از هر کدام از ماهی‌های شوریده، حلوا، شیر و میگو به صورت تصادفی از بازار ماهی شهرستان اهواز طی ماه‌های تیر و مرداد سال ۱۴۰۳ به صورت تصادفی اخذ و بلافاصله در مجاورت یخ، به آزمایشگاه بهداشت مواد غذایی انتقال داده شد.

-روش جستجوی ویبریو

با رعایت اصول نمونه‌برداری استریل از محوطه بطنی نمونه‌ها برداشته و پس از همگن کردن نمونه‌ها، ۲۵ گرم از نمونه های همگن شده، توزین و در مرحله اول، در ۲۲۵ میلی لیتر از محلول ۳/۵ درصد نمک به مدت ۶ ساعت در انکوباتور ۴۲ درجه سلسیوس، گرمخانه‌گذاری شدند. در مرحله دوم، یک میلی لیتر از رقت 10^{-1} مرحله قبل برداشته و با تلقیح در لوله‌های آزمایش حاوی ۹ میلی لیتر محیط کشت آب پپتونه رقت‌های 10^{-2} تا 10^{-6} تهیه و این لوله‌ها به مدت ۱۸ساعت در انکوباتور ۴۲ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری شدند. در مرحله آخر کشت میکروبی با استفاده از روش کشت سطحی، از سه رقت آخر در محیط کشت انتخابی TCBS (Thiosulfate citrate Bile Salt agar) (Mirmedia, Iran) استفاده و سپس پرگنه‌ها شمارش شدند (Wei *et al.*, 2014)

-استخراج DNA و واکنش PCR

DNA ژنومی با استفاده از کیت استخراج DNA شرکت سیناژن ایران و با توجه به دستورالعمل شرکت سازنده، از پر گنه‌های تیپیک رشد کرده، استخراج شد. تمامی نمونه‌های DNA تا زمان انجام PCR، در فریزر۲۰- درجه سلسیوس نگه‌داری شدند. توالی پرایمرهای مورد استفاده برای جداسازی گونه‌های *ویبریو* در جدول (۱) نشان داده شده‌اند. به منظور انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز از دستگاه Master Cycler Gradiant (Eppendorf, Germany) در قالب برنامه‌های Multiplex PCR و Single PCR استفاده شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز جهت ردیابی گونه‌های باکتری *ویبریو* در حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر شامل ۵ میکرولیتر بافر 10 X، ۱/۵ میلی‌مول کلرید منیزیم، ۲۵۰ میکرومول دئوکسی نوکلئوتید تری فسفات، ۲۰۰ میکرومول dNTP، ۰/۵ میکرومول از هر کدام از پرایمرهای رفت و برگشت، ۵ میکرولیتر از هر نمونه DNA و ۱/۲۵ واحد آنزیم DNA Taq Polymerase، انجام پذیرفت. برنامه حرارتی مورد استفاده به منظور تکثیر گونه‌های باکتریایی مورد نظر به روش مولتی‌پلکس شامل: ۷ دقیقه ۹۴ درجه سلسیوس، ۱ دقیقه ۹۴ درجه سلسیوس، ۱ دقیقه ۶۰ درجه سلسیوس، ۱ دقیقه ۷۲ درجه سلسیوس (۳۵ سیکل دمایی) و یک مرحله نهایی ۵ دقیقه ۷۲ درجه سلسیوس، بود.

جدول (۱)، لیست پرایمرهای *انواع ویبریو* در پژوهش حاضر

نوع باکتری	توالی پرایمر	طول باند	دما (سلسیوس)	منابع
ویبریو کلرآ (ompW)	F: CACCAAGAAGGTGACTTTATTGTG R: CGTTAGCAGCAAGTCCCCAT	۴۲۷	۶۰	(Wei et al., 2014)
ctxA	F: CGGGCAGATTCTAGACCT R: CGATGATCTTGGAGCATTCCCAC	۵۶۴	۵۷	(Thong et al., 2022)
CtxB	F: GGTTGCTTCTCATCATCGAACCAC R: GATACACATAATAGAATTAAGGATG	۴۶۰	۵۶	
ویبریو آلژینولیتیکوس (gyrB)	F: GAGAACCCGACAGAAGCGAAG R: CCTAGTGCGGTGATCAGTGTTG	۳۳۷	۶۰	(Wei et al., 2014)
flaC	F:TAAGGATCCATGGCTGTAACAGTTAGT R: CCTCTCGAGTTACTGCAATAGTGACA	۷۵۰	۵۹	(Chen et al., 2019)
ویبریو پاراهمولیتیکوس	F: GAAAGTTGAACATCATCAGCACGA R: GGTCAGAATCAAACGCCG	۲۷۱	۶۰	(Wei et al., 2014)
tdh	F: GTAAAGGTCTCTGACTTTTGGAC R: TGGAATAGAACCTTCATCTTCACC	۲۷۰	۶۰	Park and Zhang, (2024)
Trh	F: TTGGCTTCGATATTTTCAGTATCT R: CATAACAAACATATGCCCATTTCCG	۴۸۶	۵۷	
ویبریو ولنیفیکوس	F: TTCCAACTTCAAACCGAACTATGA R: ATTCCAGTCGATGCGAATACGTTG	۲۰۵	۶۰	(Wei et al., 2014)
vvh	F: TCCATTCGCCAGCAGTTA R: AGTTTCACGCCCATCTCA	۳۷۵	۵۵	(Zhu et al., 2021)
16S rRNA	F: CCTGGTAGTCCACGCCGTAA R: CGAATTAAACCACATGCTCCA	۱۶۸	۶۰	(Wei et al., 2014)

-الکتروفورز محصولات PCR

در نهایت محصولات PCR با استفاده از ژل آگارز ۱/۵ درصد رنگ‌آمیزی‌شده با اتیدیوم بروماید، الکتروفورز شدند. برای این منظور، ۱۰ میکرولیتر از محصول PCR را با ۲ میکرولیتر رنگ نشانگرLoading buffer مخلوط و به داخل چاهک ژل منتقل گردید. الکتروفورز نمونه‌ها در ولتاژ ثابت ۹۰ ولت به مدت ۲۵ دقیقه انجام گرفت و در نهایت محصول الکتروفورز توسط دستگاه قرائت‌کننده ژل مورد بررسی قرار گرفت.

-سنجش مقاومت آنتی‌بیوتیکی

تست‌آنتی‌بیوگرام به روش Diffusion disk انجام شد. بعد از تهیه سوسپانسیون میکروبی مطابق با محلول استاندارد ۱/۵ مک‌فارلند، در محیط کشت مولر هینتون آگار کشت داده شد و پس از آن دیسک‌های آنتی‌بیوگرام روی محیط کشت قرار گرفت و پس از گذشت ۲۴ ساعت نسبت حساسیت و مقاومت آن‌ها اقدام شد. دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی شامل آمپی‌سیلین، جنتامایسین، تتراسایکلین، تری‌متوپریم، کانامایسین، کلرامفنیکل و ایمی‌پنم بود (Heidarzadi *et al.*, 2021).

-تجزیه و تحلیل آماری

داده‌های حاصل از آزمایش‌های انجام شده در نرم افزار Microsoft Office Excel (۲۰۱۶) گردآوری شده و توسط نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۱ آنالیز شدند. روش آماری تجزیه و تحلیل داده‌ها، آزمون مربع‌کای و تست دقیق فیشر بود.

یافته‌ها

مطابق نتایج به دست‌آمده از پژوهش حاضر در جدول (۲)، میزان شیوع گونه‌های مختلف *ویبریو* در آبزیان مختلف که به صورت کشت خطی تشخیص داده شده بود، از مجموع ۱۶۰ نمونه، ۴۶ نمونه بود. به این ترتیب میزان شیوع آلودگی به *ویبریو* در میگو ۱۳ نمونه (۳۲/۵ درصد)، ماهی شیر ۱۱ نمونه (۲۷/۵ درصد)، ماهی شوریده ۱۰ نمونه (۲۵ درصد)، ماهی حلوا ۱۲ نمونه (۳۰ درصد) بود. بر اساس ردیابی توسط تست PCR؛ میزان آلودگی به *ویبریو کلرآ* در ۲/۵ درصد، *ویبریو آلژینولیتیکوس* ۱۰ درصد، *ویبریو پاراهمولیتیکوس* ۱۰/۶۳ درصد و *ویبریو ولنیفیکوس* ۵/۶۳ درصد بود.

جدول (۲)-، نتایج شیوع آلودگی به گونه‌های *ویبریو* در آبزیان عرضه‌شده در شهرستان اهواز (کشت خطی و PCR)

آبزیان	تعداد	میزان آلودگی	*ویبریو کلرآ*	*ویبریو آلژینولیتیکوس*	*ویبریو پاراهمولیتیکوس*	*ویبریو ولنیفیکوس*
میگو	۴۰	۱۳[a] نمونه (۳۲/۵ درصد)	۲ نمونه (۵ درصد)	۴ نمونه (۱۰ درصد)	۵ نمونه (۱۲/۵ درصد)	۲ نمونه (۵ درصد)
ماهی شیر	۴۰	۱۱[ab] نمونه (۲۷/۵ درصد)	۱ نمونه (۲/۵ درصد)	۳ نمونه (۷/۵ درصد)	۵ نمونه (۱۲/۵ درصد)	۲ نمونه (۵ درصد)
ماهی شوریده	۴۰	۱۰[bc] نمونه (۲۵ درصد)	-	۳ نمونه (۷/۵ درصد)	۴ نمونه (۱۰ درصد)	۳ نمونه (۷/۵ درصد)
ماهی حلوا	۴۰	۱۲[a] نمونه (۳۰ درصد)	۱ نمونه (۲/۵ درصد)	۶ نمونه (۱۵ درصد)	۳ نمونه (۷/۵ درصد)	۲ نمونه (۵ درصد)
مجموع	۱۶۰	۴۶ نمونه (۲۸/۷۵ درصد)	۴ نمونه (۲/۵ درصد)	۱۶ نمونه (۱۰ درصد)	۱۷ نمونه (۱۰/۶۳ درصد)	۹ نمونه (۵/۶۳ درصد)

در هر سطر، اعداد برچسب خورده با حروف انگلیسی متفاوت، با ۰/۰۱ > Pvalue با هم تفاوت معنی‌دار آماری دارند.

مطابق تست PCR انجام گرفته روی نمونه‌های مثبت، فراوانی ژن حدت *ctxA* (۲ نمونه، ۵۰ درصد) و *ctxB* (۲ نمونه، ۵۰ درصد) در *ویبریو کلرآ* و *tdh* (۷ نمونه، ۴۱/۱۷ درصد)، *trh* (۸ نمونه، ۴۷ درصد) در *ویبریو پاراهمولیتیکوس*،

فراوانی ژن *flaC* در *ویبریو آلژینولیتیکوس* (۸ نمونه، ۵۰ درصد) و در نهایت برای ژن *vvh* *ویبریو ولنیفیکوس* (۴ نمونه، ۴۴/۴۴ درصد) بودند (جدول ۳).

جدول (۳)- فراوانی ژن های حدت *ویبریو پاراهمولیتیکوس* و *ویبریو کلرآ* جدا شده از آبزیان عرضه‌شده شهرستان اهواز

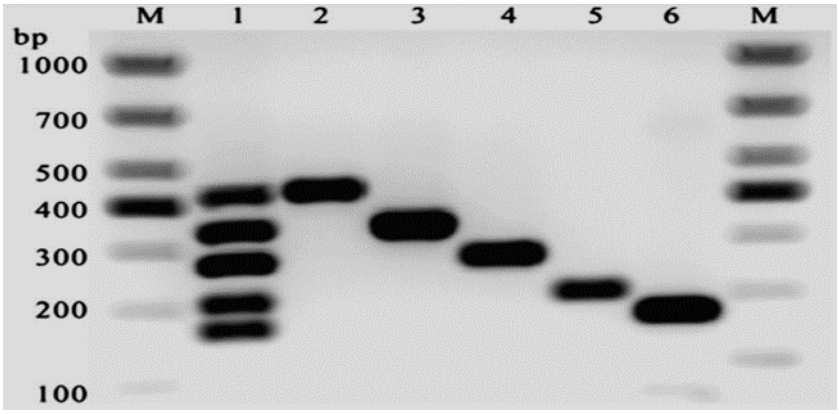
جدایه باکتریایی	میزان آلودگی	*Tdh*	*trh*
ویبریو پاراهمولیتیکوس	۱۷ نمونه	۷ (۴۱/۱۷ درصد)	۸ (۴۷ درصد)
ویبریو کلرآ	میزان آلودگی ۴ نمونه	*ctxA* ۲ (۵۰ درصد)	*ctxB* ۲ (۵۰ درصد)
ویبریو آلژینولیتیکوس	میزان آلودگی ۱۶ نمونه	*flaC* ۸ (۵۰ درصد)	
ویبریو ولنیفیکوس	میزان آلودگی ۹ نمونه	*vvh* ۴ (۴۴/۴۴ درصد)	

بررسی وضعیت مقاومت آنتی‌بیوتیکی نشان داد از مجموع ۴۶ نمونه مختلف *ویبریو*، بیشترین مقاومت بر علیه *ویبریو* مربوط به آمپی‌سیلین (۸۹/۱۳ درصد) و کانامایسین (۸۲/۶۰ درصد) و کمترین مقاومت مربوط به امی‌پنم بود (جدول ۴).

جدول (۴)- وضعیت جدایه‌های *ویبریو* نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف (درصد)

آنتی‌بیوتیک	حساس	نیم‌حساس	مقاوم
AM	۰ (۰)	۵ (۱۰/۸۷)	۴۱ (۸۹/۱۳)
GM	۱۴ (۳۰/۴۳)	۱۷ (۳۶/۹۵)	۱۵ (۳۲/۶۲)
TE	۱۳ (۲۸/۲۶)	۹ (۱۹/۵۶)	۲۴ (۵۲/۱۸)
TMP	۲۷ (۵۸/۶۹)	۱۲ (۲۶/۰۸)	۷ (۱۵/۲۱)
KN	۳ (۶/۵۳)	۵ (۱۰/۸۷)	۳۸ (۸۲/۶۰)
CM	۴۳ (۹۳/۴۷)	۱ (۲/۲۲)	۲ (۴/۳۱)
IM	۴۵ (۹۷/۷۸)	۱ (۲/۲۲)	۰

AM: Ampicillin, GM: Gentamicin, TE: Tetracycline, TMP: Trimethoprim, KN: Kanamycin, CM: Chloramphenicol, IM: Imipenem



شکل (۱)- نتایج Multiplex PCR و Single PCR. M، نشانگر وزن مولکولی؛ چاهک ۱، Multiplex PCR . چاهک ۲، ژن *ompW* با اندازه ۴۲۷ جفت باز برای *V. cholerae*. چاهک ۳، ژن *gyrB* با اندازه ۳۳۷ جفت باز برای *V. alginolyticus*. چاهک ۴، ژن *collagenase* با اندازه ۲۷۱ جفت باز برای *V. parahaemolyticus*. چاهک ۵، ژن *vvhA* با اندازه ۲۰۵ جفت باز برای *V. vulnificus*. چاهک ۶، ژن *16s r RNA* با اندازه ۱۶۸ جفت باز برای IAC.

شکل (۲)- نتایج Single PCR. M، نشانگر وزن مولکولی؛ چاهک ۱، ژن *ctxA* با اندازه ۵۶۴ جفت باز برای *V. cholerae*. چاهک ۲، ژن *ctxB* با اندازه ۴۶۰ جفت باز برای *V. cholerae*. چاهک ۳، ژن *Flac* با اندازه ۷۵۰ جفت باز برای *V. alginolyticus*. چاهک ۴، ژن *vvh* با اندازه ۳۷۵ جفت باز برای *V. vulnificus*. چاهک ۵، ژن *trh* با اندازه ۴۸۶ جفت باز برای *V. parahaemolyticus*.

بحث و نتیجه‌گیری

با توجه آمار زیاد صید ماهی و میگو از خلیج فارس، دریای عمان و فزونی مصرف فرآورده‌های دریایی توسط مردم، سببی شده تا اهمیت بهداشتی مواد غذایی دریایی بیش از پیش مورد توجه قرار گیرد. در همین راستا، نتایج پژوهش حاضر نشان داد میزان آلودگی به گونه‌های مختلف *ویبریو* در ماهی و میگوهای عرضه‌شده در شهرستان اهواز، ۴۶ نمونه (۲۸/۷۵ درصد) بود که *ویبریو پاراهمولیتیکوس* (۱۰/۶۳ درصد) و *ویبریو آلژینولیتیکوس* (۱۰ درصد) بیشترین میزان آلودگی را داشتند. در پژوهشی با هدف تعیین آلودگی ماهی‌های عرضه‌شده در شهرستان قشم به ویبریو گزارش شد، بیشترین آلودگی در بین ویبریوها مربوط به پاراهمولیتیکوس بود، که هم‌راستا با پژوهش حاضر است (Rahimi *et al.*, 2023). در پژوهشی روی آلودگی میگوها، ۲۶۴ نمونه میگو از مزارع پرورش میگو نمونه‌گیری، و میزان آلودگی به

گونه‌های ویبریو ۶۷ نمونه (۲۵/۳۸ درصد) بود که با نتایج پژوهش حاضر همسو است (Dubey *et al.*, 2021). مطالعه‌ای با هدف بررسی گونه‌های بیماری‌زا *ویبریو* انجام شد. نتایج نشان داد ۳۰ درصد از دوکفه‌ای‌ها و ۲۰ درصد از ماهی و میگو به گونه‌های *ویبریو* آلوده بودند. ۴۳ درصد از محصولات به *ویبریو پاراهمولیتیکوس* آلوده بودند *ویبریو کلرآ* ۲۶ درصد آلودگی داشت و *ویبریو ولنیفیکوس* نیز ۵ درصد را به خود اختصاص دادند. بالاترین میزان مقاومت برای آمپی‌سیلین مشاهده شد، که در خصوص *ویبریو ولنیفیکوس* با نتایج مطالعه حاضر مطابقت دارد؛ همچنین بیشترین میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی مربوط به آمپی‌سیلین و کانامایسین بود (Castello *et al.*, 2022). در مطالعه‌ای در چین روی آلودگی موادغذایی دریایی به *ویبریو* دریافتند که از مجموع ۱۰۰ نمونه اخذ شده، ۲۳ درصد آلودگی وجود داشته، که با نتایج این پژوهش مطابق است (Yang *et al.*, 2020). مطالعه‌ای در کره جنوبی بر روی ۷۴ نمونه میگو، مشخص شد که ۳۰/۴ درصد به انواع *ویبریو* آلوده بودند که با نتایج مطالعه حاضر مطابق است (Mok *et al.*, 2021). پژوهشی در مالزی با هدف تعیین میزان آلودگی به *ویبریو پاراهمولیتیکوس* انجام شد و نتایج نشان داد از مجموع ۴۰۰ نمونه فرآورده‌های دریایی ۱۲/۶ درصد به *پاراهمولیتیکوس* آلودگی مثبت داشتند، که با یافته‌های مطالعه حاضر در خصوص *ویبریو پاراهمولیتیکوس* مطابقت دارد (Al-Othrubi *et al.*, 2014). مطالعه‌ای در ایران روی تشخیص مولکولی گونه‌های ویبریو در ماهی و میگو صیدشده خلیج فارس نشان دادند که ۲۵ نمونه (۲۲/۱ درصد) شامل ۱۸ ماهی و ۷ میگو حاوی گونه ویبریو بودند، که با تحقیق حاضر مطابق است (Raissy *et al.*, 2015). مطالعه‌ای در چین نشان داد از مجموع ۶۷ نمونه ماهی، ۱۲ درصد به *ویبریو پاراهمولیتیکوس* آلوده بودند و تمامی سویه های مورد مطالعه به آمپی‌سیلین و اگزاسیلین (۱۰۰ درصد) مقاوم بودند که مطابق با مطالعه حاضر است (Kim *et al.*, 2014).

در پژوهشی روی آلودگی ماهی و میگو به *ویبریو* مشخص شد که از ۱۷۵ نمونه، *ویبریو پاراهمولیتیکوس* در ۵/۶۷ درصد و *ولونیفیکوس* ۱/۸۶ درصد مثبت بود، که پائین‌تر از نتایج به دست‌آمده از پژوهش حاضر است (Deepak *et al.*, 2022). در مطالعه‌ای روی آلودگی به ماهی‌های صیدشده در چین گزارش دادند، *ویبریو پاراهمولیتیکوس* ۱۶/۶۸ درصد آلوده بودند که بیشترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی مربوط به آمپی‌سیلین بود ، که از نظر فراوانی به *ویبریو پاراهمولیتیکوس* با مطالعه حاضر هم‌سو نبوده، اما از نظر مقاومت آنتی‌بیوتیکی مطابق با مطالعه حاضر است (Chen *et al.*, 2021). پژوهشی با هدف تعیین *ویبریو* در ماهی‌ها و میگوهای نمونه‌گیری شده خلیج فارس انجام شد که از مجموع ۸۹ نمونه نه نمونه (۱۰/۱۱ درصد) آلوده به *ویبریو* را یافتند که پنج مورد از آن‌ها *ویبریو پاراهملیتیکوس* بود، که پائین‌تر از تحقیق حاضر است (Haghnegahdar and Baserisalehi, 2016).

مطالعه‌ای روی میزان آلودگی به *ویبریو* در ماهی‌های عرضه‌شده در اصفهان انجام شد که نتایج حاکی از آن بود که *ویبریو پاراهمولیتیکوس* بیشترین میزان فراوانی (۳۵ درصد) 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 و ۳۵ درصدگزارش گردید، که بسیار فراتر از نتایج به دست‌آمده از این مطالعه است (Karimi Alavigeh and Sharifzadeh, 2021). پژوهشی بر روی آلودگی مواد غذایی دریایی به *ویبریو ولنیفیکوس* گزارش دادند که از مجموع ۴۰ نمونه، ۶ نمونه (۱۵ درصد) آلودگی داشته که با نتایج این مطالعه مشابهتی ندارد (Wangman *et al.*, 2021). در

پژوهشی با هدف شیوع آلودگی به *ویبریو آلژینولیتیکوس* در غذاهای دریایی، گزارش شد که از ۹۲ نمونه ماهی، ۵۲ نمونه (۵۳/۰۶ درصد) آلودگی دارد ، که با نتایج حاصل از تحقیق حاضر مطابقتی ندارد (Sadat *et al.*, 2021). تحقیقی در مصر روی الودگی ماهی‌ها به *ویبریو آلجینولیتیکوس* انجام شد که از مجموع ۴۵ نمونه ۲۳/۳ درصد آلودگی داشت که مطابقتی با پژوهش حاضر ندارد (Abdelsalam *et al.*, 2021). در مطالعه‌ای در مالزی با هدف شیوع *ویبریو آلجینولیتیکوس* در ماهی‌های عرضه شده نشان دادند که ۱۰۰ درصد نمونه‌های گرفته شده در یک مزرعه دارای الودگی به *ویبریو آلژینولیتیکوس* بودند که بسیار فراتر از نتایج به دست‌آمده از پژوهش حاضر است (Mohamad *et al.*, 2019). مطالعه‌ای روی آلودگی *ویبریو پاراهمولیتیکوس* در میگو نشان دادند که ۵/۹ درصد سویه *پاراهمولیتیکوس* در میگوهای مورد آزمایش شناسایی شد، که با مطالعه حاضر اختلاف قابل توجهی دارد (He *et al.*, 2019). پژوهشی در ایران، روی میزان آلودگی گونه‌ها *ویبریو* در میگو دریافتند که از مجموع ۳۰ نمونه، ۸۴ درصد *ویبریو* جداسازی شده است. محققان دریافتند که ۲۴ درصد *ویبریو آلژینولیتیکوس*، بیشترین درصد فراوانی را داشته است که مطابقتی با نتایج به دست‌آمده از پژوهش حاضر ندارد (Shakouri and Rahimigharahmirshamlou, 2016). پژوهشی در ایران با هدف تعیین فراوانی آلودگی به ویبریو در آبزیان عرضه‌شده در بندر گناوه، میزان آلودگی را ۲۱/۶۶ درصد گزارش نمودند. فراوانی گونه‌های کلرا، ولنیفیکوس، پاراهمولیتیکوس و هاروی در این تحقیق به ترتیب، ۱/۶۶، ۳۳/۸، ۶/۶۶ و ۵ درصد بود که هم‌راستا با مطالعه حاضر است (Rahimi *et al.*, 2014). مطالعه‌ای با هدف ارزیابی آلودگی به گونه‌های ویبریو در ایران انجام شد که گزارش دادند میزان آلودگی از مجموع ۷۴۰ نمونه، ۱۰/۶۷ درصد به ویبریو آلوده بودند؛ که شیوع آلودگی به ویبریو کلرآ ۱۸/۹۸ درصد، پاراهمولیتیکوس ۴۱/۷۷ درصد و ولنیفیکوس ۱۳/۹۲ درصد بود (Zangoeifard *et al.*, 2020).

فراوانی بالای گونه‌های *ویبریو* در در مطالعات فوق و عدم نزدیکی میزان آلودگی آن‌ها با پژوهش حاضر، تایید کننده عدم رعایت بهداشت در مراکز تهیه و توزیع ماهی و فرآورده‌های دریایی است. اختلاف در فراوانی آلودگی‌ها را می‌توان به نوع نمونه‌ها، فصل نمونه‌گیری، شرایط اکولوژیک، آلودگی محیطی، تفاوت گونه‌ای و هم چنین تفاوت چشمگیر در کیفیتِ شرایط بهداشتی از زمان صید تا عرضه نسبت داد. علاوه بر علل آلودگی اولیه که اشاره گردید، آلودگی‌های ثانویه هم می‌توانند نقش پررنگی 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 است. از طرفی به احتمال زیاد فرایند برودتی مناسبی نیز بر روی این فراورده‌ها انجام نگرفته است. روش انجام آزمایش، منطقه جغرافیایی، فصل و نوع روش آزمایش کشت یا مولکولی باشد می‌تواند تاثیر زیادی در تعیین میزان آلودگی داشته باشد. در همین راستا، از آنجا که در این تحقیق برای شناسایی گونه‌ها از روش PCR 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.

آنتی‌بیوتیک‌ها به طور گسترده برای پیشگیری یا درمان بیماری‌های باکتریایی در آبزی پروری مورد استفاده قرار می‌گیرند که در نتیجه باعث افزایش مقاومت آنتی بیوتیکی و مقاومت چند دارویی در باکتری‌ها می‌شود و درمان عفونت‌ها

را دشوار می‌کند. استفاده از آنتی‌بیوتیک‌هایی که مقاومت بالا یا متوسط برای آنها مشاهده شده است (از جمله آمپی-سیلین، کنامایسین وانکومایسین، آموکسی‌سیلین، میدکامایسین، فورازولیدون، توبرامایسین، ریفامپیسین، جنتامایسین و تتراسایکلین) توصیه می‌شود کاهش یابد، در حالی که آنتی بیوتیک هایی که مقاومت و حساسیت پایینی برای آنها گزارش شده است (از جمله اریترومایسین، تری‌متوپریم–سولفامتوکسازول، داکسی‌سایکلین، کلرامفنیکل، فلورفنیکول، نورفلوکساسین و سیپروفلوکساسین) برای مهار بیماری‌های باکتریایی ناشی از *ویبریو* پیشنهاد شده است (Blanco *et al.*, 2016).

نتایج پژوهش حاضر ممکن است برای ارزیابی بیماری‌زایی *ویبریو* و سوء استفاده از آنتی بیوتیک‌ها مفید باشد. انتظار می‌رود نهادهای ذیربط، بتوانند راهنمایی‌هایی را برای کاهش شیوع ویبریو در مواد غذایی دریایی و افزایش درمان بیماری در آینده در آبزی پروری ارائه دهند و به عنوان مبنایی نظری برای توسعه روش‌های کنترل بیماری پایدار عمل کنند؛ بنابراین پیشنهاد می‌شود در آبزی پروری، به ویژه در استخرهای پرورش ماهی و میگو استفاده از آنتی بیوتیک‌ها، کاهش یابد و با توجه به آلودگی ۲۸/۷۵ درصدی انواع آبزیان به گونه‌های بیماری‌زای *ویبریو*، استفاده از خام‌خواری ممنوع شود. حفظ زنجیره سرد برای جلوگیری از رشد ویبریو در غذاهای دریایی مهم است. این امر به ویژه برای غذاهای دریایی که به صورت خام مصرف می شوند بسیار مهم است.

سپاسگزاری

بدین وسیله از کلیه همکاران گروه بهداشت مواد غذایی دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد که نهایت همکاری را در انجام این پروژه را داشتند تشکر به عمل می‌آید.

تعارض منافع

نویسندگان تعارض منافعی برای اعلام ندارند.

منابع

- Abdelsalam, M., Ewiss, M. Z., Khalefa, H. S., Mahmoud, M. A., Elgendy, M. Y. and Abdel-Moneam, D. A. (2021). Coinfections of Aeromonas spp., Enterococcus faecalis, and Vibrio alginolyticus isolated from farmed Nile tilapia and African catfish in Egypt, with an emphasis on poor water quality. Microbial Pathogenesis, 160 (12): 105-112.
- Al-Othrubi, S. M. Y., Kqueen, C. Y., Mirhosseini, H., Hadi, Y. A., and Radu, S. (2014). Antibiotic resistance of Vibrio parahaemolyticus isolated from cockles and shrimp seafood marketed in Selangor, Malaysia. Clinical Microbiology, 3(3): 148-159.
- Bank, M. S., Metian, M., and Swarzenski, P. W. (2020). Defining seafood safety in the Anthropocene. Environmental Science & Technology, 54(14): 8506-8508.
- Barrett, K. A., Nakao, J. H., Taylor, E. V., Eggers, C., and Gould, L. H. (2017). Fish-associated foodborne disease outbreaks: United States, 1998–2015. Foodborne Pathogens and Disease, 14(9): 537-543.
- Blanco, P., Hernando-Amado, S., Reales-Calderon, J. A., Corona, F., Lira, F., Alcalde-Rico, *et al*. (2016). Bacterial multidrug efflux pumps: much more than antibiotic resistance determinants. Microorganisms, 4(1): 14-25.

- Cai, Q., and Zhang, Y. (2018). Structure, function and regulation of the thermostable direct hemolysin (TDH) in pandemic Vibrio parahaemolyticus. Microbial pathogenesis, 123(12): 242-245.
- Castello, A., Alio, V., Sciortino, S., Oliveri, G., Cardamone, C., Butera, G., *et al.* (2022). Occurrence and molecular characterization of potentially pathogenic Vibrio spp. in seafood collected in Sicily. Microorganisms, 11(1): 53-67.
- Chen, C., Kang, C., Rong, N., Wu, N., Chen, C., Wu, S., *et al*. (2019). Evaluation of immunogenicity, protective immunity on aquaculture pathogenic Vibrio and fermentation of Vibrio alginolyticus flagellin FlaC protein. Iranian Journal of Biotechnology, 17(3): 226-240.
- Chen, H., Dong, S., Yan, Y., Zhan, L., Zhang, J., Chen, J., *et al.* (2021). Prevalence and population analysis of Vibrio parahaemolyticus isolated from freshwater fish in Zhejiang province, China. Foodborne Pathogens and Disease, 18(2): 139-146.
- Chen, L., Wang, J., Chen, J., Zhang, R., Zhang, H., Qi, X., *et al*. (2023). Epidemiological characteristics of Vibrio parahaemolyticus outbreaks, Zhejiang, China, 2010–2022. Frontiers in Microbiology, 14(5): 117-129.
- Deepak, S. J., Porteen, K., Elango, A., Senthilkumar, T. M. A., Babu, R. N., and Sureshkannan, S. (2021). Isolation and Characterization of Vibrio spp. from Sea Food And Environmental Samples in and around Chennai City. Indian Journal Veterinary Science, 50(1): 38-44.
- Deng, Y., Xu, L., Chen, H., Liu, S., Guo, Z., Cheng, C., *et al.* (2020). Prevalence, virulence genes, and antimicrobial resistance of Vibrio species isolated from diseased marine fish in South China. Scientific reports, 10(1): 143-159.
- Dubey, S., Singh, A., Kumar, B. N., Singh, N. K., and Tyagi, A. (2021). Isolation and characterization of bacteriophages from inland saline aquaculture environments to control Vibrio parahaemolyticus contamination in shrimp. Indian Journal of Microbiology, 61(19): 212-217.
- Haghnegahdar, S., and Baserisalehi, M. (2016). Determination of Phylogenetic Relationship Among Vibrio Parahaemolyticus Isolates from Persian Gulf and the Evaluation of their Susceptibility to Antibiotics. Armaghane Danesh, 21(6): 605-616.
- He, Y., Wang, S., Zhang, J., Zhang, X., Sun, F., He, B., *et al*. (2019). Integrative and conjugative elements-positive Vibrio parahaemolyticus isolated from aquaculture shrimp in Jiangsu, China. Frontiers in microbiology, 107(7): 157-164.
- Heidarzadi, M. A., Rahnama, M., Alipoureskandani, M., Saadati, D., and Afsharimoghadam, A. (2021). Salmonella and Escherichia coli contamination in samosas presented in Sistan and Baluchestan province and antibiotic resistance of isolates. Food Hygiene, 11(2): 81-92. [In Persian]
- Karimi Alavigeh, A., and Sharifzadeh, A. (2021). Study on the Frequency of Vibrio species in fish from Isfahan. Journal of Food Microbiology, 8(4): 47-55. [In Persian]
- Kim, T. O., Eum, I. S., Jo, S. M., Kim, H. D., and Park, K. S. (2014). Antimicrobial-resistance profiles and virulence genes of Vibrio parahaemolyticus isolated from seawater in the Wando area. Korean Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 47(3): 220-226.
- Lee, S. H., Lee, H. J., Myung, G. E., Choi, E. J., Kim, I. A., Jeong, Y. I., *et al.* (2019). Distribution of pathogenic Vibrio species in the coastal seawater of South Korea (2017–2018). Osong Public Health and Research Perspectives, 10(6): 337-350.
- Mohamad, N., Mohd Roseli, F. A., Azmai, M. N. A., Saad, M. Z., Md Yasin, I. S., Zulkiply, N. A., *et al.* (2019). Natural concurrent infection of Vibrio harveyi and V. alginolyticus in cultured hybrid groupers in Malaysia. Journal of Aquatic Animal Health, 31(1): 88-96.
- Mok, J. S., Cho, S. R., Park, Y. J., Jo, M. R., Ha, K. S., Kim, P. H., *et al.* (2021). Distribution and antimicrobial resistance of Vibrio parahaemolyticus isolated from fish and shrimp aquaculture farms along the Korean coast. Marine Pollution Bulletin, 171(7): 112-120.
- Oehlenschläger, J. (2012). Seafood: nutritional benefits and risk aspects. International Journal for Vitamin and Nutrition Research, 82(3): 168-176.
- Pant, A., Das, B., and Bhadra, R. K. (2020). CTX phage of Vibrio cholerae: Genomics and applications. Vaccine, 38, A7-A12.

- Phillips, K. E., and Satchell, K. J. (2017). Vibrio vulnificus: from oyster colonist to human pathogen. PLoS Pathogens, 13(1): 140-149.
- Qin, Z., Yang, X., Chen, G., Park, C., and Liu, Z. (2020). Crosstalks between gut microbiota and Vibrio cholerae. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 10(5): 58-72.
- Rahimi, E., Heidarzadi, M. A., and Dehkordi, N. (2023). Determining the prevalence of Vibrio species in fish and shrimp caught in Qeshm City, Iran. Food Hygiene, 13(4): 22-33. [In persian]
- Raissy, M., Rahimi, E., Azargun, R., Moumeni, M., Rashedi, M., and Sohrabi, H. R. (2015). Molecular detection of Vibrio spp. in fish and shrimp from the Persian Gulf. Journal of Food Biosciences and Technology. 17(2): 49-52.
- Raissy, M., Moumeni, M., Ansari, M., and Rahimi, E. (2012). Antibiotic resistance pattern of some Vibrio strains isolated from seafood, Iran Journal Fisheries Sciences, 11(3): 618-626.
- Sadat, A., El-Sherbiny, H., Zakaria, A., Ramadan, H., and Awad, A. (2021). Prevalence, antibiogram and virulence characterization of Vibrio isolates from fish and shellfish in Egypt: A possible zoonotic hazard to humans. Journal of applied microbiology, 131(1): 485-498.
- Shakouri, A., and Rahimigharahmirshamlou, G. (2016). Monitoring of abundance and diversity of Vibrio sp. bacteria in whole shrimp culture period in Gwater shrimp Complex. Journal of Aquatic Ecology, 6(3): 102-114.
- Taylor, M., Cheng, J., Sharma, D., Bitzikos, O., Gustafson, R., Fyfe, M., *et al.* (2018). Outbreak of Vibrio parahaemolyticus associated with consumption of raw oysters in Canada, 2015. Foodborne Pathogens and Disease, 15(9): 554-559.
- Thong, K. L., Tham, K. B. L., Ngoi, S. T., Tan, S. C., Wanyussof, W. N., Ahmad, H, *et al*. (2022). Molecular characterization of Vibrio cholerae O1 El Tor strains in Malaysia revealed genetically diverse variant lineages. Transboundary and Emerging Diseases, 69(4): 693-703.
- Wangman, P., Surasilp, T., Pengsuk, C., Sithigorngul, P., and Longyant, S. (2021). Development of a species-specific monoclonal antibody for rapid detection and identification of foodborne pathogen Vibrio vulnificus. Journal of Food Safety, 41(6): 129-139.
- Wei, S., Zhao, H., Xian, Y., Hussain, M. A., and Wu, X. (2014). Multiplex PCR assays for the detection of Vibrio alginolyticus, Vibrio parahaemolyticus, Vibrio vulnificus, and Vibrio cholerae with an internal amplification control. Diagnostic microbiology and infectious disease, 79(2): 115-118.
- Yang, X., Zhang, X., Wang, Y., Shen, H., Jiang, G., Dong, J., *et al*. (2020). A real-time recombinase polymerase amplification method for rapid detection of Vibrio vulnificus in seafood. Frontiers in Microbiology, 11(5): 586-598.
- Yuan, Y., Feng, Z., and Wang, J. (2020). Vibrio vulnificus hemolysin: biological activity, regulation of vvhA expression, and role in pathogenesis. Frontiers in Immunology, 11(18): 599-610.
- Zhu, P., Cui, Y., Pang, J., Xiong, Z., Huang, Z., Guo, S., *et al.* (2021). Sensitively and quickly detecting Vibrio vulnificus by real time recombinase polymerase amplification targeted to vvhA gene. Molecular and Cellular Probes, 57(11): 101-117.
- Zangoei-Fard, S., Rahimi, E., and Shakerian, A. (2020). Incidence and phenotypic pattern of antibiotic resistance of Vibrio species isolated from seafood samples caught from the Persian Gulf. Egyptian Journal of Veterinary Sciences, 51(3): 337-347.

Investigation of contamination of aquatic animals supplied in Ahvaz county to *Vibrio* species and evaluation of antibiotic resistance of isolates

Investigation of *Vibrio* contamination in aquatic animals

Sadat Abbasi, B[1], Rahimi, E[2*]

1- M.Sc Graduate of Food Hygiene, Department of Food Hygiene, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran
2- Professor, Department of Food Hygiene, Islamic Azad University, Shahrekord Branch, Shahrekord, Iran.
[*]Corresponding author:ebrahimrahimi55@yahoo.com
(Received: //Accepted: //)

Abstract

Pathogenic Vibrio species typically inhabit marine and brackish water environments and can be found in seafood, with a higher prevalence in the summer. The present study aimed to investigate the contamination of aquatic animals supplied in Ahvaz county to *Vibrio* species and evaluate the antibiotic resistance of the isolates. In this study, 160 samples, including 40 shrimp samples and 120 samples of lionfish, halva, and salted fish, were randomly sampled from the supply centers of Ahvaz city and transferred to the laboratory under sterile conditions. To search for *Vibrio*, the linear culture method, different species and strains, the PCR method, and disk-diffusion antibiotic resistance evaluation were used. The results showed that 46 samples (28.75%) were *Vibrio* types out of 160 samples. In this way, there were 13 samples (32.5%) of shrimp, 11 samples (27.5%) of mackerel, 10 samples (25%) of Tigertooth croaker, and 12 samples (30%) of *Pampus argenteus*. The frequency of virulence genes was *ctxA* (50%) and *ctxB* (50%), *tdh* (41.17%), *trh* (47%), *flaC* (50%) and *vvh* (44.44%). The results of biotic resistance showed resistance to ampicillin (89.13%) and kanamycin (82.60%), and the lowest resistance was related to imipenem. The study results showed that a variety of seafood products can be an important source of *vibrio* consumption, which can be avoided by observing hygiene and cooking seafood.

Conflict of interest: None declared.

Keywords: *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio vulnificus*, seafood