

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ ΚΑΡΔΙΤΣΑΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«Παθολογικά Προβλήματα Εκτρεφόμενων Υδροβίων Οργανισμών»



Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

“Διερεύνηση παρουσίας του *Vibrio* spp.
σε μύδια του Θερμαϊκού κόλπου”

Πάυλος Α. Μαρούλης

Κτηνίατρος Α.Π.Θ.

Επιβλέπων: Νικόλαος Σούλτος

DVM, MSc, PhD, Dipl. ECVPH

Αν. Καθηγητής

Εργαστήριο Υγιεινής Τροφίμων Ζ.Π.

Κτηνιατρική Σχολή Α.Π.Θ.

Ιούνιος 2012

Καρδίτσα

Περίληψη

Στην εργασία αυτή κατ' αρχάς παρουσιάζεται συνοπτικά ο ρόλος των μυδιών στη διατροφή του ανθρώπου καθώς και η θέση που η εκτροφή μυδιών (μυδοκαλλιέργεια) κατέχει στην χώρα μας. Ακολούθως περιγράφονται οι κίνδυνοι υγείας που σχετίζονται με την κατανάλωση τους, ενώ η έμφαση δίνεται στην ενδεχόμενη προσβολή του ανθρώπου, υπό τύπου τροφικής δηλητηρίασης ή με την απευθείας μόλυνση ανοικτού τραύματος, από βακτήρια του γένους *Vibrio*, που φυσιολογικά εποικίζουν το νερό αλλά και τους θαλάσσιους οργανισμούς. Από τα διαθέσιμα, στο περιβάλλον, είδη *Vibrio* την δημόσια υγεία απειλούν μόνο τα παθογόνα. Εξ' αυτών τα τρία κυριότερα (*V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* και *V. vulnificus*) περιγράφονται λεπτομερώς. Γίνεται εκτενής αναφορά στα χαρακτηριστικά, στις βιολογικές ιδιότητες, στον μηχανισμό της παθογένειας τους, κατά την προσβολή του ανθρώπινου οργανισμού, καθώς και στα συμπτώματα που παρατηρούνται κατόπιν λοιμώξεων. Στο ειδικό (πειραματικό) μέρος της εργασίας και εστιάζοντας στα ελληνικά δεδομένα αναπτύσσεται η εργαστηριακή διερεύνηση παρουσίας των παθογόνων και μη βακτηρίων του γένους *Vibrio*, στα εδώδιμα μύδια του είδους *Mytilus galloprovincialis*, που καλλιεργούνται σε ορισμένες περιοχές του Θερμαϊκού κόλπου. Για την δειγματοληψία και την προετοιμασία των προς ανάλυση δειγμάτων ακολουθήθηκαν οι οδηγίες που παρέχονται από την σχετική βιβλιογραφία. Η δοκιμή παρουσίας/απουσίας (presence/absence test) βασίστηκε στην πρότυπη μέθοδο ISO/TS 21872 και περιλαμβάνει τον εκλεκτικό εμπλουτισμό του δείγματος, την απομόνωση των βακτηρίων σε ειδικά θρεπτικά υποστρώματα και την ταυτοποίηση τους και τέλος την βιοχημική επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων. Στο τέλος παρουσιάζονται τα ευρήματα της έρευνας και αναλύεται η φυσική σημασία των αποτελεσμάτων.

Περιεχόμενα

Πρόλογος	σελ. 1
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	
1. Εισαγωγή	σελ. 2
1.1. Τα μύδια ως τροφή για τον άνθρωπο	σελ. 2
1.2. Μαγειρική αξιοποίηση των μυδιών	σελ. 3
1.3. Η μυδοκαλλιέργεια στην Ελλάδα	σελ. 7
1.4. Η δυναμικότητα του Θερμαϊκού Κόλπου	σελ. 9
1.5. Έλεγχος, τυποποίηση και εμπορία των μυδιών	σελ. 10
2. Υγιεινή των μυδιών	σελ. 11
2.1. Μύδια και Δημόσια Υγεία	σελ. 11
2.2. Εξυγίανση των μυδιών	σελ. 14
3. Βακτήρια <i>Vibrio</i> spp.	σελ. 15
3.1. Γενικά	σελ. 15
3.2. <i>Vibrio cholerae</i>	σελ. 18
3.3. <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	σελ. 31
3.4. <i>Vibrio vulnificus</i>	σελ. 37
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	
4. Αναζήτηση του <i>Vibrio</i> spp. στα μύδια	σελ. 44
4.1. Υλικά και μέθοδοι	σελ. 44
4.2. Δειγματοληψία	σελ. 48
4.3. Προετοιμασία του δείγματος	σελ. 48
4.4. Συγκέντρωση του δείγματος και δημιουργία εναιωρήματος	σελ. 50
4.5. Πρώτος εκλεκτικός εμπλουτισμός	σελ. 52
4.6. Δεύτερος εκλεκτικός εμπλουτισμός	σελ. 52
4.7. Απομόνωση και ταυτοποίηση	σελ. 53
4.8. Αποτελέσματα της απομόνωσης	σελ. 56
4.9. Βιοχημική ταυτοποίηση	σελ. 60
5. Αποτελέσματα	σελ. 69
6. Συζήτηση	σελ. 71
Παράρτημα Α	σελ. 75
Βιβλιογραφία	σελ. 79
Συμπληρωματική βιβλιογραφία	σελ. 82

Πρόλογος

Η ανά χείρας εργασία αποτελεί την Διπλωματική Διατριβή μου στα πλαίσια του ΠΜΣ «Παθολογικά Προβλήματα Εκτρεφόμενων Υδρόβιων Οργανισμών», που παρακολούθησα στην Κτηνιατρική Σχολή Καρδίτσας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, κατά την ακαδημαϊκή περίοδο 2010-2012. Το πειραματικό μέρος της υλοποιήθηκε στο Εργαστήριο Υγιεινής Τροφίμων του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης.

Από την θέση αυτή ευχαριστώ εκ βαθέων για τον χρόνο και την προθυμία τους τον επιβλέποντα μου, Αν. Καθηγητή Κτηνιατρικής Σχολής ΑΠΘ, κ. Νικόλαο Σούλτο καθώς και τα μέλη της συμβουλευτικής επιτροπής μου, την Αν. Καθηγήτρια Κτηνιατρικής Σχολής ΑΠΘ κα. Ελένη Ιωσηφίδου και τον Λέκτορα Κτηνιατρικής Σχολής ΑΠΘ κ. Ιωάννη Βάτσο.

Ευχαριστώ ακόμη για την ενεργό συμμετοχή τους καθώς και για τις συμβουλές που απλόχερα προσέφεραν τους συναδέλφους κα. Θωμαή Λάζου (Υποψήφια διδάκτωρ Κτηνιατρικής Σχολής ΑΠΘ), κα. Ταξιαρχούλα Μάγρα (Υποψήφια διδάκτωρ Κτηνιατρικής Σχολής ΑΠΘ), κο. Δημήτριο Κομοδρόμο (Κτηνίατρος ΑΠΘ και μεταπτυχιακός φοιτητής) και κο. Βασίλειο Βασιλάκη (Στρατιωτικός Κτηνίατρος ΑΠΘ).

Τέλος είμαι ιδιαίτερα ευγνώμων προς τον συνάδελφο κο. Τιμόθεο Ζουγκουριδίδη (Κτηνίατρος ΑΠΘ, υπάλληλος στη Δ/νση Κτηνιατρικής της Ν.Α. Περίας) ο οποίος μου εξασφάλισε και απέστειλε τα δείγματα που χρησιμοποίησα για το πείραμα μου.

Πάυλος Α. Μαρούλης,

Θεσσαλονίκη, Ιούνιος 2012

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.Εισαγωγή

1.1.Τα μύδια ως τροφή για τον άνθρωπο

Τα μύδια εδώ και χιλιάδες χρόνια αποτελούν τροφή για τον άνθρωπο. Υπάρχουν περί τα 17 είδη εδώδιμων μυδιών, από τα οποία δημοφιλέστερα είναι τα *Mytilus edulis*, *M. galloprovincialis*, *M. trossellus* και *Perna canaliculus* (Zeldes 2010). Μόνο τα μύδια του θαλασσινού νερού θεωρούνται βρώσιμα, υπάρχουν ωστόσο διάσπαρτες αναφορές σχετικά με την κατανάλωση μυδιών του γλυκού νερού (απαντώνται σε λίμνες, ποτάμια, κανάλια) από ιθαγενείς της Β. Αμερικής (*B-55 Environmental Fact Sheet, New Hampshire Dpt. of Environmental Services, 2005*).

Κατά τη διάρκεια του Β' Παγκοσμίου Πολέμου ήταν συνήθης πρακτική να σερβίρονται μύδια, ως κύριο πιάτο, σε εστιατόρια των ΗΠΑ. Το γεγονός αυτό αποδόθηκε στην έλλειψη ερυθρών κρεάτων που σημειώθηκε εκείνη την εποχή (Brown 2000).

Η δημοτικότητα των μυδιών κατά βάση οφείλεται στην υψηλή διατροφική αξία τους, καθώς είναι πλούσια σε βιταμίνες, πρωτεΐνες και ανόργανα άλατα, αλλά και στα ιδιαίτερα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά τους.

Στον πίνακα 1.1 σημειώνεται η εκατοστιαία θρεπτική σύσταση του βρώσιμου περιεχομένου μυδιών που μαγειρεύτηκαν στον ατμό, όπως προκύπτει από τα στοιχεία της ηλεκτρονικής πηγής Self NutritionData (nutritiondata.self.com). Τα 100 gr μυδιών αποδίδουν ενέργεια 172 θερμίδων και επιπλέον περιέχουν βιταμίνες B1 (0,3 mgr), B2 (0,4 mgr) και B12 (24 μg). Τα μύδια υπερέχουν σε ωφέλιμα λιπαρά (866 mg Ωμέγα-3 λιπαρών οξέων), τα οποία προλαμβάνουν τη θρόμβωση, τις καρδιαγγειακές παθήσεις και προκαλούν αισθητή μείωση της LDL (Low Density Cholesterol), της λεγόμενης “κακής”

χοληστερίνης. Αποτελούν την πλουσιότερη ζωική τροφή σε σίδηρο, συνιστούν εξαιρετική πηγή σεληνίου (89,6 µg) και είναι πλούσια σε ψευδάργυρο (2,7 mg) και φολικό οξύ (64 µg).

Τέλος, υποστηρίζεται από πολλούς ότι τα μύδια κατέχουν αφροδισιακές ιδιότητες. Η επίδραση τους στα επίπεδα των σεξουαλικών ορμονών και στην γενετήσια ορμή (libido) δεν έχει μελετηθεί επαρκώς, ωστόσο πιθανολογείται ότι η πλούσια περιεκτικότητα τους σε πρωτεΐνη θα μπορούσε να εξηγήσει τις εν λόγω διεγερτικές ιδιότητες, κατ' αναλογία με άλλες υψιπρωτεϊνικές τροφές. Η παραγωγή της τεστοστερόνης, ειδικά για τους άνδρες, και η παραγωγή των οιστρογόνων, για τις γυναίκες, εκτιμάται ότι επηρεάζονται θετικά από τις χημικές ουσίες D-aspartic acid και N-methyl-D-aspartate, οι οποίες, κατά τα ευρήματα του Fisher (2005), περιέχονται σε υψηλές ποσότητες στα μύδια. Επιπλέον, ο ψευδάργυρος είναι ιχνοστοιχείο απαραίτητο για την προαγωγή της σπερματογένεσης (Hampton 2010).

Πίνακας 1.1: Η διατροφική αξία των μυδιών

ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ	%	ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΕ ΑΝΟΡΓΑΝΑ ΑΛΑΤΑ (mg/100GR)
Νερό	61,2	K: 268
Πρωτεΐνες	23,8	Na: 369
Λίπη	4,5	Ca: 33
Υδατάνθρακες	7,4	Mg: 37
Τέφρα	3,2	P: 285
		Fe: 6,7

Πηγή: nutritiondata.self.com

1.2.Μαγειρική αξιοποίηση των μυδιών

Τα μύδια θεωρούνται εκλεκτής ποιότητας (gourmet) έδεσμα. Η προετοιμασία τους για φαγητό μπορεί να ακολουθήσει μια ποικιλία συνταγών, με δημοφιλέστερους τρόπους μαγειρέματος την άχνιση (ήπια υγρή θερμική επεξεργασία) (εικόνα 1.1), το τηγάνισμα σε βούτυρο ή λάδι, το βράσιμο σε σάλτσα (σαγανάκι), το ψήσιμο, την κάπνιση, την προσθήκη

σε άλλα βασικά τρόφιμα, όπως π.χ. το ρύζι (για την παρασκευή μυδοπίλαφου) και τα ζυμαρικά. Τα μύδια μπορούν ακόμη να καταναλωθούν αυτούσια, χωρίς οποιαδήποτε θερμική επεξεργασία. Σε κάθε περίπτωση θα πρέπει να επιλέγονται μόνο ζωντανά μύδια (αναγνωρίζονται από το ερμητικά κλειστό κέλυφος τους) ή τουλάχιστον κατεψυγμένα, ώστε να εξασφαλίζεται, στον καλύτερο δυνατό βαθμό, η νωπότητα τους, καθώς πρόκειται για τρόφιμο εξαιρετικά ευαίσθητο απέναντι σε ενζυματικής και μικροβιακής αιτιολογίας αλλοιώσεις.

Ανά τον κόσμο υπάρχουν αναρίθμητες προτάσεις μαγειρέματος των μυδιών, άλλες περισσότερο και άλλες λιγότερο γνωστές στο κοινό. Παρακάτω παρατίθενται αντιπροσωπευτικά οι πλέον δημοφιλείς.



Εικόνα 1.1: Αχνιστά μύδια γαρνιρισμένα με λαχανικά. Πηγή: Εικόνες google

Στο Βέλγιο, τα μύδια συχνά σερβίρονται μαγειρεμένα με φρέσκα βότανα και γευστικά λαχανικά, συνοδευόμενα από ένα κομμάτι βούτυρο και λευκό κρασί. Οι πατάτες και η εγχώρια μπίρα θεωρούνται επίσης δημοφιλή συνοδευτικά. Στις Κάτω Χώρες τα μύδια μερικές φορές σερβίρονται τηγανητά, μαζί με ζυμαρικά ή με τριμμένη φρυγανιά, ειδικά στα καταστήματα λιανικής πώλησης φαγητού. Στη Γαλλία, η *“Éclade des Moules”* είναι ένα έδεσμα αποτελούμενο από ψημένα μύδια, δημοφιλές στις παράκτιες περιοχές του Βισκαϊκού Κόλπου. Στην Ιταλία, τα μύδια συχνά αναμειγνύονται με άλλα θαλασσινά ή συνδυάζονται με ζυμαρικά. Στην Ισπανία, καταναλώνονται, ως επί το πλείστον, μαγειρεμένα στον ατμό ή βρασμένα σε λευκό κρασί, μαζί με κρεμμύδι και αρωματικά βότανα, και σερβίρονται με τον ζωμό τους και λίγο χυμό λεμονιού. Σύνηθες είναι επίσης και το *“tigres”* (εικόνα 1.2), ένα είδος κροκέτας, αποτελούμενο από σάρκα μυδιών, γαρίδων και άλλα κομμάτια ψαριών, εμβαπτισμένη σε πηχτή μπεσαμέλ, παναρισμένη και τηγανισμένη μέσα σε καθαρισμένα κελύφη μυδιών. Μύδια χρησιμοποιούνται και σε άλλου είδους πιάτα, όπως πιλάφια και σούπες ή συνήθως συσκευάζονται σε περιέκτη (κονσέρβα) μέσα σε σάλτσα από λάδι, ξίδι, πιπέρι, δάφνη και πάπρικα.



Εικόνα 1.2: “Γεμιστά” μύδια (*tigres*). Πηγή: Εικόνες google

Στην Τουρκία τα μύδια είτε αλευρώνονται και τηγανίζονται (*midye tava*, εικόνα 1.3) ή γεμίζονται με ρύζι και σερβίρονται ως κρύο πιάτο (*midye dolma*, εικόνα 1.4). Συνήθως συνοδεύονται από αλκοολούχα επιτραπέζια ποτά (κυρίως ρακί ή μπίρα). Στην Ιρλανδία μπορεί κανείς να δοκιμάσει μύδια βρασμένα και “σβησμένα” με ξίδι, με τον ζωμό τους να σερβίρεται ως συμπληρωματικό ζεστό ρόφημα. Στην καντονέζικη κουζίνα, τα μύδια μαγειρεύονται σε ζωμό από σκόρδο και μαύρα φασόλια τα οποία έχουν υποστεί ζύμωση. Στη Νέα Ζηλανδία, τοποθετούνται μέσα σε λαδόξιδο στο οποίο έχει προστεθεί τσίλι ή σκόρδο, σχηματοποιούνται σε κροκέτες και τηγανίζονται ή χρησιμοποιούνται ως βάση για παρασκευή κάποιου είδους σούπας. Στην Ινδία τα μύδια είναι δημοφιλή στην Κεράλα, την Μαχαράστρα, την Μπατκάλ, και την Γκόα. Σερβίρονται βρασμένα και ζεστά με καρπούς αρτόδενδρου ή άλλα λαχανικά, γεμιστά με ρύζι και καρυδόπιχα κατεργασμένα με μπαχαρικά. Τα τηγανητά μύδια (“*Kadukka*” στα Μαλαγιαλαμικά) της βόρειας Κεράλα θεωρούνται αγαπημένα, πικάντικη, λιχουδιά.



Εικόνα 1.3: Τηγανητά μύδια (midye tava)



Εικόνα 1.4: Μύδια γεμιστά με πιλάφι (midye dolma)

Πηγή: Εικόνες google

1.3.Η μυδοκαλλιέργεια στην Ελλάδα

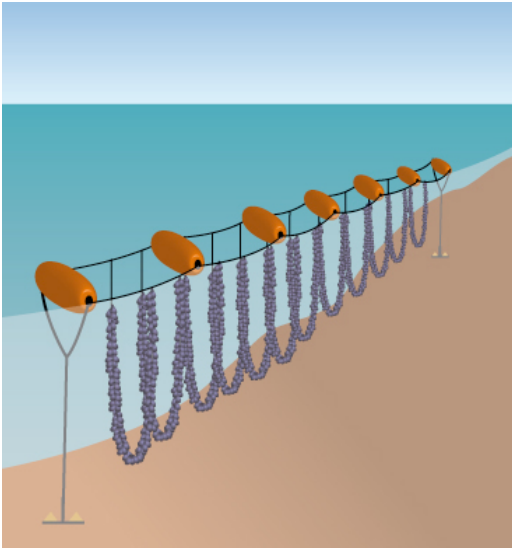
Η κατανάλωση μυδιών κατέχει σημαντική θέση στην προτίμηση των Ελλήνων καταναλωτών. Τα τελευταία χρόνια, τα μεσογειακά μύδια (*Mytilus galloprovincialis*) αποτελούν ένα από τα σπουδαιότερα ελληνικά προϊόντα υδατοκαλλιέργειας. Η μυδοκαλλιέργεια είναι η φυσική ανάπτυξη του μυδιού στον ίδιο θαλάσσιο χώρο όπου αναπτύσσονται και τα “ελεύθερα” μύδια, με τη διαφορά ότι τα μύδια οστρεοκαλλιέργειας εκτρέφονται μόνο σε νερά χαρακτηρισμένα ως κατάλληλα, από πλευράς υγιεινής, δηλαδή σε νερά ελεύθερα ρύπων και βιοτοξινών. Τα μύδια καλλιέργειας είναι από τις πιο υγιεινές, φυσικές, γευστικές και εύπεπτες τροφές που υπάρχουν στον κόσμο. Το κόστος παραγωγής τους είναι σχετικά χαμηλό, γεγονός που τα καθιστά ιδιαίτερα προσιτά στους καταναλωτές.

Ένα μέρος της παραγωγής διατίθεται στην εσωτερική αγορά, ενώ μεγάλο τμήμα της εξάγεται στις αγορές της Ιταλίας, της Ισπανίας και της Γαλλίας. Η αυξανόμενη μάλιστα ζήτηση των μυδιών στην αγορά της Ευρωπαϊκής Ένωσης, σε συνδυασμό με τις κατάλληλες συνθήκες, για την ανάπτυξη και την υγιεινή των μυδιών, που επικρατούν στη χώρα μας, οδήγησε στην αύξηση της δυναμικότητας των εγκαταστάσεων. Η καλλιέργεια των μυδιών γίνεται με τη μέθοδο των πασσάλων, με τα λεγόμενα δηλαδή “κρεβάτια”. Τα τελευταία χρόνια αυξήθηκαν ιδιαίτερα οι πλωτές μυδοκαλλιέργειες (long line, εικόνες 1.5, 1.6 και 1.7) σε βάθη μεγαλύτερα των 6-8 μέτρων.



Εικόνα 1.5: Άποψη εγκατάστασης μυδοκαλλιέργειας, πλωτό σύστημα (longline). Θερμαϊκός Κόλπος.

Πηγή: Εικόνες google



Εικόνες 1.6 & 1.7: Πλωτό σύστημα μυδοκαλλιέργειας τύπου longline. Πηγή: Εικόνες google

Για την υποστήριξη της μυδοκαλλιέργειας δημιουργήθηκαν χερσαίες υποδομές επεξεργασίας μυδιών. Εγκαταστάσεις που αποτελούν μέρος αυτής της υποδομής συναντώνται κατά μήκος της παραλιακής ζώνης του Θερμαϊκού Κόλπου.

Στις νέες μονάδες των οστρακοκαλλιεργητών απασχολούνται πολλές οικογένειες της περιοχής, ενώ οι επενδύσεις που έχουν γίνει επιτρέπουν στους καταναλωτές να απολαμβάνουν φρέσκο μύδι, τυποποιημένο ή μη, που φθάνει στο τραπέζι με τις κατάλληλες εγγυήσεις ποιότητας και καλής υγιεινής κατάστασης. Το μύδι οστρεοκαλλιέργειας μεγαλώνει στους ίδιους φυσικούς χώρους που αναπτύσσεται και το ελεύθερο μύδι, δηλαδή σε απολύτως φυσικές συνθήκες. Η αποφλοιώση γίνεται σε αποφλοιωτήρια που είναι εγκεκριμένα από τις αρμόδιες Υπηρεσίες Αλιείας.

1.4.Η δυναμικότητα του Θερμαϊκού Κόλπου

Στη χώρα μας ο Θερμαϊκός Κόλπος είναι η σημαντικότερη περιοχή παραγωγής και αλιείας μυδιών, δραστηριότητα που χαρακτηρίζεται ως ιδιαίτερα επικερδής, μετά από ιστορία 30 ετών. Στη θαλάσσια περιοχή που ξεκινά ανατολικά του Αξιού και εκτείνεται μέχρι το Κίτρος, βρίσκεται το 85% των μυδοπαραγωγικών εγκαταστάσεων της Ελλάδας, με ανάλογο μερίδιο και στην εθνική παραγωγή. Η ετήσια παραγωγή εκτιμάται σε περίπου

30.000 τόνους. Στο Δήμο Αξιού, υπάρχουν 26 οικογένειες του διαμερίσματος των Κυμίνων και 17 του διαμερίσματος των Μαλγάρων, που έχουν ως βασική οικονομική δραστηριότητα την καλλιέργεια μυδιού, ενώ στο Δήμο Χαλάστρας υπάρχουν 250 οικογένειες που ασχολούνται με την καλλιέργεια του μυδιού και την αλιεία, είτε ως οικογενειακές επιχειρήσεις είτε ως εργαζόμενοι σε αντίστοιχες επιχειρήσεις και αποφλοιωτήρια. Στον Δήμο Αξιού παράγονται συνολικά 7.000 τόνοι ετησίως (5.000 στα Κύμινα και 2.000 στα Μάλγαρα), ενώ στο Δήμο Χαλάστρας παράγονται περίπου 5.000 τόνοι, το μεγαλύτερο ποσοστό των οποίων εξάγεται σε χώρες της Ε.Ε (ΥΠ.Α.Α.Τ., Επιχειρησιακό Πρόγραμμα Αλιείας 2007-2013).

1.5. Έλεγχος, τυποποίηση και εμπορία των μυδιών

Τα Κέντρα Αποστολής Οστρακοειδών έχουν αναλάβει τη διακίνηση των μυδιών και τον συστηματικό τους έλεγχο, όσον αφορά στην υγιεινή κατάσταση των προϊόντων, αποκελυφωμένων ή μη, προτού αυτά διοχετευθούν προς εμπορία. Στην εσωτερική αγορά τα μύδια διατίθενται κυρίως με τη μορφή “ψίχας”, δηλαδή αποκελυφωμένα, και λιγότερο συχνά μαζί με το όστρακο, σε ζώσα κατάσταση. Το φρέσκο μύδι ξεχωρίζει από κλειστό γυαλιστερό όστρακο του, το ευχάριστο θαλασσινό του άρωμα και την αφθονία σε υγρό στο εσωτερικό του. Το 80% των μυδιών με κελύφη εξάγονται κυρίως στην Ιταλία και λιγότερο στην Ολλανδία και Γαλλία.

2.Υγιεινή των μυδιών

2.1.Μύδια και Δημόσια Υγεία

Τα μύδια ανήκουν στα δίθυρα μαλάκια. Τρέφονται με πλαγκτόν και άλλους μικροσκοπικούς οργανισμούς που βρίσκονται σε αιώρηση στο υδάτινο περιβάλλον. Προσλαμβάνουν την τροφή τους αντλώντας (αναρροφώντας) νερό, το οποίο και διηθούν, με τη βοήθεια των βραγχίων τους, σε ποσότητες που αγγίζουν ακόμα και τα επτά λίτρα ανά ώρα. Η κατακρατούμενη τροφή οδηγείται προς το “στόμα” τους. Μαζί με την τροφή στη σάρκα των μυδιών φθάνουν και συσσωρεύονται μια σειρά από χημικούς και βιολογικούς παράγοντες, οι οποίοι μπορούν δυνητικά να απειλήσουν την υγεία του καταναλωτή (Hall and Strichartz, 1990).

Αν και τα μύδια εκτιμώνται ιδιαίτερα ως τρόφιμο, είναι αρκετά πιθανό το ενδεχόμενο δηλητηρίασης του ανθρώπου μετά από κατανάλωση τους, όταν αυτά έχουν διαβιώσει σε περιοχές όπου βρίθουν τοξικοί πλαγκτονικοί οργανισμοί. Για παράδειγμα, τα μύδια θα πρέπει να αποφεύγονται κατά μήκος της Δυτικής Ακτής των Ηνωμένων Πολιτειών, ιδίως κατά τη διάρκεια των θερμότερων μηνών (Ιούνιος μέχρι Σεπτέμβριος). Η δηλητηρίαση αυτή οφείλεται συνήθως σε “άνθιση” των δινομαστιγωτών πρωτοζώων που, μαζί με άλλους μικροσκοπικούς οργανισμούς, συναπαρτίζουν το φυτοπλαγκτόν (ερυθρές παλίρροιες, red tides, εικόνα 2.1). (“Harmful Algal Blooms”, Centers for Disease Control and Prevention, CDC).

Πρόσφατα η παραγωγή του Θερμαϊκού Κόλπου έχει επηρεαστεί αρνητικά σε σημαντικό βαθμό από την άνθιση επιβλαβών αλγών “algae blooms”, που έχουν ως αποτέλεσμα τη συγκέντρωση βιοτοξινών στα οστρακοειδή, σε βαθμό που αυτά καθίστανται μη εμπορεύσιμα. Επιπλέον, υπάρχει μεγάλη αρνητική επίδραση του ευτροφισμού στο μέγεθος, το βάρος και την αυξητική περίοδο των μυδιών. Η περιοχή του Θερμαϊκού κόλπου έχει χαρακτηριστεί, ως προς την ένταση του φαινομένου, από μεσότροφη έως και

εύτροφη (ΕΛΚΕΘΕ, 2001). Όλες οι παράμετροι ανάπτυξης βρίσκονται σε αρνητικό ισοζύγιο λόγω του στρες στο οποίο υποβάλλονται οι οργανισμοί από το δυσμενές θαλάσσιο περιβάλλον του κόλπου (Galinou-Mitsoudi et al 2006).

Οι θαλάσσιες βιοτοξίνες είναι δηλητηριώδεις ουσίες που παράγονται από τα δινομαστιγωτά και μπορούν να συσσωρευτούν στους ιστούς των μυδιών. Οι ουσίες αυτές είναι επικίνδυνες για τον άνθρωπο και, σε περίπτωση που καταναλωθούν, μπορούν να προκαλέσουν από ελαφράς μορφής δηλητηρίαση έως πολύ σοβαρότερες καταστάσεις της υγείας του. Για την προστασία των καταναλωτών έχουν θεσπιστεί ειδικά μέτρα ελέγχου σε ευρωπαϊκό και εθνικό επίπεδο ώστε όλα τα μύδια που διοχετεύονται προς κατανάλωση να ελέγχονται προκαταβολικά ως προς τα επίπεδα βιοτοξινών.



Εικόνα 2.1: Εγκατάσταση ερυθράς παλίρροιας (red tide) στα νερά της παραλιακής ζώνης της Θεσσαλονίκης.

Πηγή: Ελευθεροτυπία 4/11/2011

Το τοξικό φυτοπλαγκτό παράγει μια σειρά ιδιαίτερα παθογόνων βιοτοξινών. Τα μύδια προσλαμβάνουν, παράλληλα με το πλαγκτόν, και τα δινομαστιγωτά μαζί με τις

τοξίνες τους, χωρίς ωστόσο τα ίδια να προσβάλλονται. Όταν όμως τα μύδια καταναλωθούν από τον άνθρωπο, οι βιοτοξίνες προσλαμβάνονται σε αυξημένες συγκεντρώσεις, γεγονός υπεύθυνο για την πρόκληση σοβαρών επιπλοκών της υγείας του. Μια από αυτές είναι γνωστή ως “παραλυτική δηλητηρίαση από όστρακα” (paralytic shellfish poisoning, PSP) ενώ υπάρχουν και η “αμνησιακού χαρακτήρα δηλητηρίαση από όστρακα” (amnesic shellfish poisoning, ASP) καθώς και η “νευροτοξική δηλητηρίαση από όστρακα” (neurotoxic shellfish poisoning, NSP) (Clark et al 1999). Για τον λόγο αυτό, της διάθεσης των μυδιών στην κατανάλωση προηγείται ο συνεχής δειγματοληπτικός έλεγχος τους (καθ’ όλη την διάρκεια του έτους και ανά τακτά χρονικά διαστήματα, συνήθως ανά εβδομάδα). Ο έλεγχος αυτός υλοποιείται από τα αρμόδια “Εργαστήρια Αναφοράς Θαλάσσιων Βιοτοξινών” (π.χ. για την Θεσσαλονίκη ως αρμόδιος φορέας ελέγχου λειτουργεί το σχετικό παράρτημα του Κέντρου Κτηνιατρικών Ιδρυμάτων Θεσσαλονίκης, ΚΚΙΘ). Ο έλεγχος αφορά τα επίπεδα των τοξινών τόσο στα μύδια όσο και στο νερό του περιβάλλοντος των εγκαταστάσεων μυδοκαλλιέργειας.

Ο μηχανισμός σίτισης των μυδιών έχει επιπλέον ως αποτέλεσμα να βιοσυγκεντρώνονται στη σάρκα τους σεβαστές ποσότητες χημικών ρύπων (Widdows και Donkin, 1992), με κυριότερο ίσως εκπρόσωπο τα βαρέα μέταλλα (χαλκός, χρώμιο, νικέλιο, ψευδάργυρος) αλλά και οργανικές χημικές ενώσεις, όπως DDT (διφαινυλοτριχλωροαιθάνιο), PCBs (πολυχλωριωμένα διφαινύλια) και PAHs (πολυαλογονωμένοι υδρογονάνθρακες), π.χ. HCH (εξαχλωροεξάνιο). Οι ουσίες αυτές συνήθως παρουσιάζουν ανησυχητικές συγκεντρώσεις σε υδάτινα περιβάλλοντα που βρίσκονται εγγύς των μεγάλων αστικών κέντρων και των βιομηχανικών περιοχών.

Ενώ για τους προηγούμενους χημικούς και βιολογικούς κινδύνους υπάρχει αρκετή ενημέρωση, ακόμη και στους μη ειδικούς, λίγοι έχουν υπόψη τους τον κίνδυνο που αφορά την μόλυνση του ανθρώπου από τα βακτήρια που εποικίζονται τα μύδια. Τόσο η σάρκα των μυδιών όσο και το ενδοθυρικό υγρό περιέχουν μια σειρά από μικροοργανισμούς του

περιβάλλοντος. Από αυτούς ορισμένοι είναι αβλαβείς για τον άνθρωπο ενώ άλλοι κατατάσσονται στους παθογόνους, όπως ισχύει για την *Salmonella*, την *Shigella*, το *Clostridium*, τους *Enterococci* και τα *Vibrio*, όλα τους μικρόβια που απαντώνται στο υδάτινο περιβάλλον, συνήθως λόγω ανθρωπογενούς δραστηριότητας. Ορισμένα μικρόβια μάλιστα έχει διαπιστωθεί ότι προκαλούν βλάβες ή ακόμη και θνησιμότητα σε συγκεκριμένα είδη μυδιών, όπως συμβαίνει, για παράδειγμα, με την *Pseudomonas fluorescens*, η οποία καταστρέφει το πεπτικό σύστημα του ξενιστή της, που είναι τα μύδια “zebra” και “quagga” (Travis 2002). Στην παρούσα εργασία διερευνάται αποκλειστικά η παρουσία των *Vibrio* spp. σε μύδια του Θερμαϊκού κόλπου.

2.2.Εξυγίανση των μυδιών

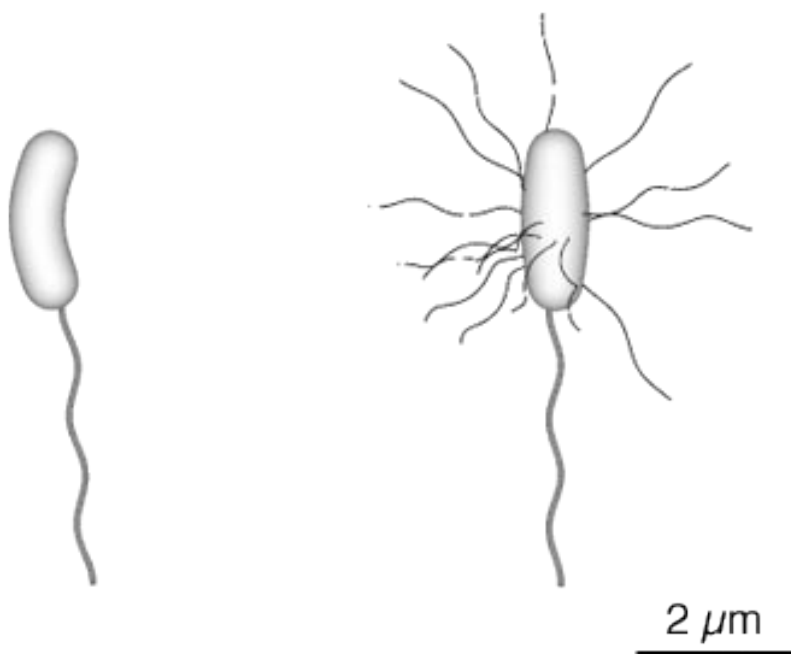
Βάσει της σχετικής Ελληνικής και Κοινοτικής νομοθεσίας, που αποσκοπεί στην προστασία των καταναλωτών, όλες οι ποσότητες μυδιών που προορίζονται για κατανάλωση πρέπει υποχρεωτικά να περνούν από τα Κέντρα Καθαρισμού Οστρακοειδών, προ της διάθεσης τους στην αγορά. Σε αυτές τις εγκαταστάσεις, μέσω κλειστών κυκλωμάτων (δεξαμενές) θαλασσινού νερού και με τη βοήθεια μιας σειράς μηχανικών, βιολογικών, φυσικών και χημικών διεργασιών (μηχανικός διαχωρισμός οργανικών ουσιών, φιλτράρισμα, UV ακτινοβολήση κ .α.), γίνεται επεξεργασία (καθαρισμός) του ανακυκλοφορούντος νερού και με τον τρόπο αυτό, τα μύδια, καθώς διηθούν αλληπάλληλα το νερό, απαλλάσσονται τελικά από τυχόν παθογόνους μικροοργανισμούς και τις τοξίνες αυτών.

3.Βακτήρια *Vibrio* spp.

3.1.Γενικά

3.1.1.Περιγραφή

Τα *Vibrio* spp. συνιστούν ένα γένος gram αρνητικών βακτηρίων, που, όπως φαίνεται στην εικόνα 3.1, διαθέτουν σχήμα κεκαμμένης ράβδου (Thomson et al. 2005). Τα «τυπικά» πρωτοανακαλυφθέντα *Vibrio*, όπως είναι το δονάκιο της χολέρας (*V. cholerae*), διαθέτουν αποκλειστικά ένα ενιαίο πολικό μαστίγιο (μονότριχα βακτήρια) με θήκη. Μερικά είδη, όπως τα *V. parahaemolyticus* και *V. alginolyticus*, έχουν ένα πολικό μαστίγιο με θήκη και πολλά λεπτά μαστίγια που προβάλλουν προς όλες τις κατευθύνσεις (περίτριχα βακτήρια), ενώ άλλα είδη, όπως το *V. fischeri*, διαθέτουν θυσάνους (τούφες) πολικών μαστιγίων με θήκη (λοφιότριχα βακτήρια) (Garrity 2005). Όλα τα μέλη του γένους είναι κινητά.



Εικόνα 3.1: Σχηματική απεικόνιση του βακτηρίου *Vibrio* spp. Αριστερά διακρίνεται η μονότριχη μορφή (παρουσία ενός πολικού μαστιγίου) και δεξιά η περίτριχη μορφή (παρουσία πολλών μαστιγίων γύρω από το σώμα). Πηγή: Wikipedia.

Το όνομα *Vibrio* πρωτοχρησιμοποιήθηκε από τον Ιταλό ανατόμο Filippo Pacini (Skerman et al. 1980), ο οποίος, το 1854, απομόνωσε μικροοργανισμούς, από το έντερο ασθενών με χολέρα, τους οποίους και ονόμασε “vibrions”, εξαιτίας της κινητικότητάς τους, η οποία γίνεται αντιληπτή κατά την μικροσκοπηση. Τα *Vibrio* spp. συνήθως εντοπίζονται στο θαλασσινό νερό, είναι προαιρετικά αναερόβια, οξειδάση θετικά και ασπορογόνα (Madigan and Martinko 2005).

Αρκετά είδη *Vibrio* είναι παθογόνα (Hogan 2010). Από το σύνολο των παθογόνων, για τον άνθρωπο, *Vibrio*, μόνο οκτώ είδη σχετίζονται με τα τρόφιμα και από αυτά τρία είδη (*V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* και *V. vulnificus*) ενοχοποιούνται συχνότερα για την πρόκληση μιας ποικιλίας νόσων, όπως λ.χ. γαστρεντερίτιδες, συνεπεία τροφοδηλητηρίασης, πανδημίες και επιδημίες χολέρας ή σπάνιες συστηματικές νόσοι, δυνητικά θανατηφόρες (Thompson et al. 2004).

Το *V. cholerae* είναι ο αιτιολογικός παράγοντας της χολέρας, μιας διαχρονικής νόσου που πλήττει κυρίως τις αναπτυσσόμενες χώρες του κόσμου. Τα εντεροπαθογόνα είδη *Vibrio* δύνανται να προκαλέσουν τροφική δηλητηρίαση, η οποία συνήθως σχετίζεται με την κατανάλωση ανεπαρκώς μαγειρεμένων θαλασσινών. Οι επιδημίες που οφείλονται στο *V. vulnificus* συνήθως παρατηρούνται σε περιοχές με θερμό κλίμα και σχετίζονται με τη μόλυνση ανοικτών πληγών. Είναι κατά κανόνα μικρές σε έκταση, εν γένει θανατηφόρες και η εμφάνισή τους συχνή. Ένα τέτοιο ξέσπασμα συνέβη στη Νέα Ορλεάνη των Η.Π.Α., αμέσως μετά τον τυφώνα Κατρίνα στις 29 Αυγούστου 2005 (Jablecki et al. 2005), ενώ αρκετά θανατηφόρα περιστατικά εμφανίζονται ετησίως στη Φλόριντα των Η.Π.Α. (*Bureau of Community Environmental Health, Division of Environmental Health, Florida Department of Health, 2005*).

Πολλά είδη *Vibrio* (π.χ. *V. harveyi*, *V. anguillarum*, *V. alginolyticus*), τα οποία θεωρούνται σχετικά αβλαβή για τον άνθρωπο, είναι ζωνοσογόνα. Μπορούν, δηλαδή, να προκαλέσουν ασθένειες σε ψάρια και οστρακοειδή και αποτελούν συχνή αιτία

θνησιμότητας των εγχώριων θαλάσσιων οργανισμών (Cairang et al. 2009, Cam et al. 2009, Faury et al. 2004).

3.1.2.Εντόπιση

Τα *Vibrio* spp. αποτελούν το πλέον συχνό γένος βακτηρίων που απαντάται στα υφάλμυρα νερά και γενικά στο υδάτινο περιβάλλον και μολύνουν μια μεγάλη ποικιλία αλιευμάτων. Μπορούν να μεταδοθούν στον άνθρωπο από πολλούς θαλάσσιους οργανισμούς, όπως είναι τα καβούρια και οι γαρίδες. Το *V. cholerae* συνήθως μεταδίδεται μέσω του μολυσμένου νερού (Faruque and Nair 2008).

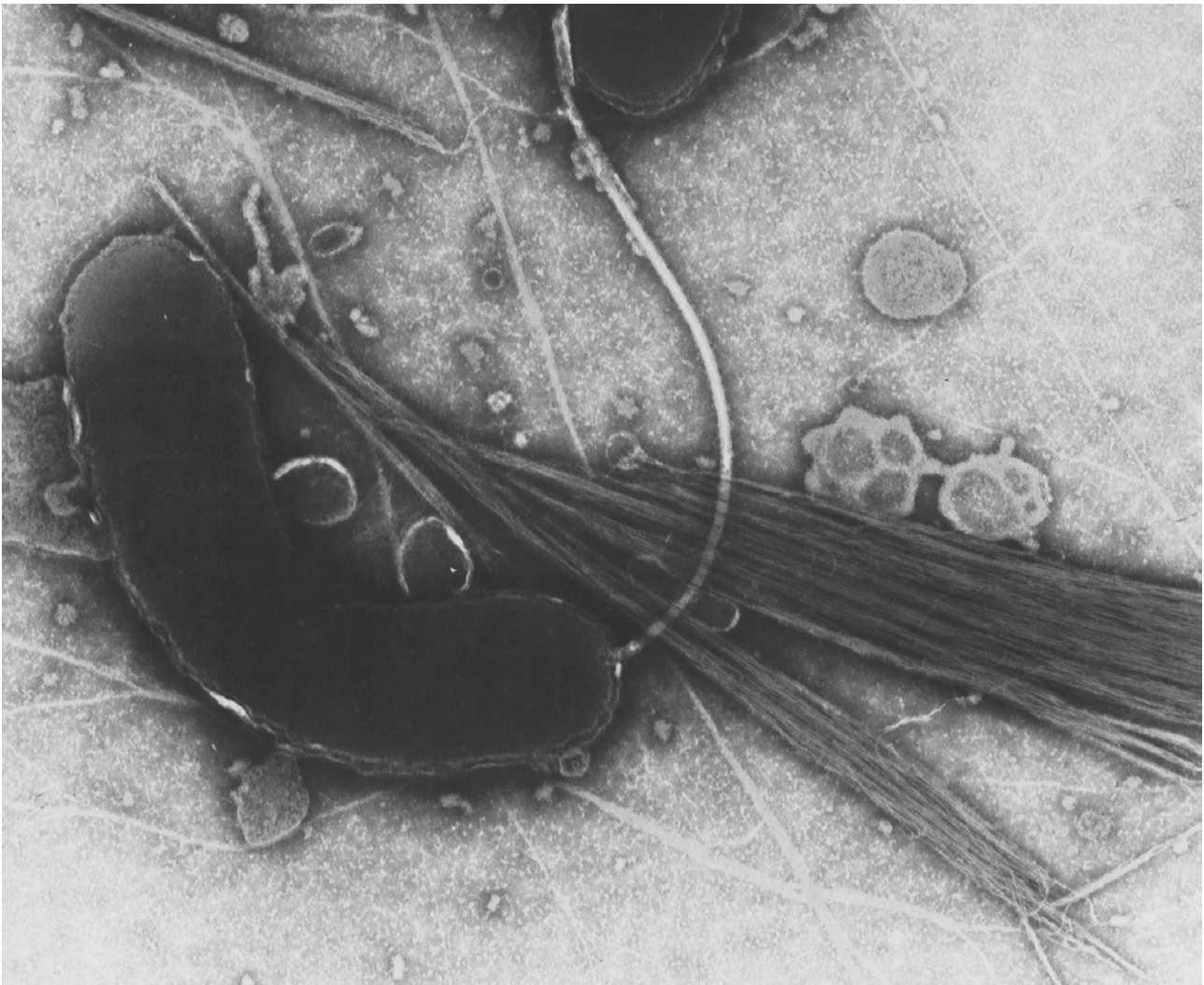
Τα διάφορα είδη του *Vibrio* εντοπίζονται κυρίως σε νωπά και ανεπεξέργαστα ιχθυηρά και οστρακοειδή και απομονώνονται συχνότερα κατά τους θερινούς μήνες. Καταστρέφονται εύκολα με τη θέρμανση, ωστόσο ο κίνδυνος τροφικής δηλητηρίασης υφίσταται, καθώς τα οστρακοειδή, συμπεριλαμβανομένων και των μυδιών, σε αρκετές περιπτώσεις καταναλώνονται, κατά παράδοση, ωμά ή μετά από πολύ ήπια θερμική επεξεργασία.

Αρκετές έρευνες παρουσίας του εν λόγω παθογόνου παράγοντα έχουν κατά καιρούς πραγματοποιηθεί σε θαλάσσιες περιοχές της Ιταλίας (Di Pinto et al. 2008), της Γερμανίας (Lhafi and Kühne, 2007) και της Νορβηγίας (Bauer et al. 2006) και αφορούν την μόλυνση των μυδοκαλλιεργειών από μικροοργανισμούς όπως είναι τα *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* και *V. vulnificus*. Στην Ελλάδα, αντιθέτως, το καθεστώς προσβολής, επί του παρόντος, δεν έχει διερευνηθεί επαρκώς, γεγονός που προσδίδει πρωτότυπο χαρακτήρα στην παρούσα ερευνητική εργασία.

3.2. *Vibrio cholerae*

3.2.1. Περιγραφή

Το *V. cholerae* (εικόνα 3.2), γνωστό και ως *Komnabacillus*, κατά τον Robert Koch, είναι ένα gram αρνητικό, με σχήμα κόμματος (Marrero et al. 2009) βακτήριο, που διαθέτει πολικό μαστίγιο και προκαλεί χολέρα στους ανθρώπους (Ryan and Ray 2004, Faruque and Nair 2008). Το *V. cholerae*, καθώς και άλλα είδη του γένους *Vibrio*, ανήκουν στην “γάμμα” υποδιαίρεση των πρωτεοβακτηρίων. Υπάρχουν δύο κύριοι βιότυποι του *V. cholerae* που προσδιορίζονται από τη δοκιμή αιμοσυγκόλλησης, ο κλασικός και ο EI Tor, αλλά και πολλές ορολογικές ομάδες. Ο κλασικός βιότυπος βρίσκεται μόνο στο Μπαγκλαντές, ενώ ο EI Tor απαντάται σε όλο τον κόσμο (Siddique et al. 1991). Το *V. cholerae* απομονώθηκε για πρώτη φορά, ως παθογενετικό αίτιο της χολέρας, από τον ιταλικής καταγωγής ανατόμο Filippo Pacini, το 1854, αλλά η ανακάλυψή του αυτή δεν έγινε ευρέως γνωστή μέχρι 30 χρόνια αργότερα, όταν ο Robert Koch, ο οποίος εργαζόταν ανεξάρτητα, δημοσιοποίησε το 1880 την δική του ανακάλυψη, το *Vibrio comma*, καθώς και τα μέσα για την καταπολέμηση της νόσου που το μικρόβιο προξενούσε (Bentivoglio and Pacini 2005, Howard-Jones 1984). Τελικώς η έρευνα του Pacini αναγνωρίστηκε και ως επίσημη ταξινομική ονομασία του εν λόγω είδους βακτηρίου ορίστηκε το “*Vibrio cholerae*, Pacini 1854”.



Εικόνα 3.2: *Vibrio cholerae*. Λήψη από Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Διελεύσεως (ΗΜΔ). Πηγή: Wikipedia.

3.2.2.Ορολογική ταξινόμηση

Τα στελέχη του *V. cholerae* ταξινομούνται ορολογικά βάσει του σωματικού αντιγόνου O. Οι ορότυποι O₁ και O₁₃₉ εμπλέκονται στην εκδήλωση του συνδρόμου της χολέρας. Μέχρι στιγμής περισσότεροι από 150 παθογόνοι ορότυποι του *V. cholerae* έχουν ταυτοποιηθεί αντιγονικά και η πλειονότητα τους δεν ανήκει στους οροτύπους O₁ και O₁₃₉ (non O₁/non O₁₃₉ *V. cholerae* strains). Οι συγκεκριμένοι ορότυποι δεν προκαλούν χολέρα αλλά σποραδικά κρούσματα γαστρεντερίτιδας (Morris 1990). Επίσης, η παθογένεια τους δεν αφορά την παραγωγή της χολερικής τοξίνης (cholera toxin, CT).

3.2.3.Χαρακτηριστικές Ιδιότητες

Το *V. cholerae* είναι ένα μεσόφιλο βακτήριο, που αναπτύσσεται σε θερμοκρασίες 10-43 °C, με άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης τους 37 °C. Συνήθως απομονώνεται από νερά θερμοκρασίας 15-35 °C, ενώ σπάνια απαντάται όταν η θερμοκρασία κατέλθει χαμηλότερα των 10 °C. Η ανάπτυξη του ευνοείται σε ήπια αλκαλικό περιβάλλον (έως και pH 9) με ιδανική τιμή 7,6, ενώ τιμές pH μικρότερες του 5 προκαλούν μείωση του πληθυσμού. Σε ότι αφορά την αλατότητα, η ιδανική τιμή για την ανάπτυξη του είναι 0,5% NaCl, με εύρος 0,1-4%..

3.2.4.Επιδημιολογία

Εκτιμάται ότι ετησίως ο αριθμός των κρουσμάτων χολέρας ανέρχεται σε μερικά εκατομμύρια (Sack et al. 2004). Η νόσος μεταδίδεται κυρίως με την κατανάλωση μολυσμένου νερού και τροφής. Σε περιοχές όπου οι συνθήκες υγιεινής υπολείπονται του απαιτούμενου επιπέδου, η μετάδοση της χολέρας γίνεται ταχύτατα από άτομο σε άτομο, συχνά μέσω των λυμάτων και των ακαθαρσιών. Σε αναπτυσσόμενες χώρες και περιοχές, όπου η έλλειψη νερού ποιότητας “ανθρώπινης κατανάλωσης” ανάγεται σε μείζον πρόβλημα, η ανάγκη οδηγεί τους ανθρώπους στην κατανάλωση νερού απαράδεκτης υγιεινολογικής κατάστασης και σε επακόλουθες επιδημίες χολέρας (εικόνα 3.3).



Εικόνα 3.3: Η κατανάλωση νερού κακής υγιεινής κατάστασης, συνήθης πρακτική στις αναπτυσσόμενες χώρες, οδηγεί στην εξάπλωση μεταδοτικών ασθενειών, μεταξύ των οποίων είναι και η χολέρα.

Πηγή: Εικόνες google.

Ο Snow το 1855 εξέδωσε την δεύτερη έκδοση της αρχικής μελέτης του, η οποία αφορά την επιδημιολογία της χολέρας, στην περιοχή Σόχο του Λονδίνου. Μέσω αυτής ο ίδιος κατέδειξε τον ρόλο του νερού στην εξάπλωση της νόσου, αναφερόμενος στην μόλυνση των υδατικών διαθέσιμων από τοξινογόνο στέλεχος *V. cholerae*, εξαιτίας της απόρριψης αστικών λυμάτων στον ποταμό Τάμεση, από τον οποίο και υδροδοτούνταν

διάφορες περιοχές. Ο υπερπληθυσμός, το χαμηλό βιοτικό επίπεδο αλλά και η μετανάστευση συνεισφέρουν στην εξάπλωση της νόσου. Μολυσμένα αλιεύματα (ψάρια και οστρακοειδή) εντοπίζονται στα εκβολικά συστήματα ποταμών που έχουν επιμολυνθεί από ανθρώπινα λύματα, κατά τη διάρκεια επιδημιών, ή σε περιοχές όπου τα τοξινογόνα στελέχη του *V. cholerae* ενδημούν. Εκτός από τα μύδια, κατά καιρούς έχουν ενοχοποιηθεί μια σειρά από άλλα ωμά και επεξεργασμένα προϊόντα, όπως είναι, για παράδειγμα, τα μαριναρισμένα, παστά και καπνιστά ψάρια, οι γαρίδες, τα καβούρια και άλλα οστρακοειδή (στρείδια, κυδώνια, γυαλιστερές). Κρούσματα γαστρεντερίτιδας που αποδίδονται σε non O₁/non O₁₃₉ στελέχη του *V. cholerae* προέρχονται συχνά από κατανάλωση ωμών ή μισοψημένων αλιευμάτων, κυρίως στρειδιών. Άλλα τρόφιμα, π.χ. φρούτα και λαχανικά, συχνά μολύνονται με τον μικροοργανισμό, καθώς έρχονται σε επαφή μαζί του, είτε μέσω του περιβάλλοντος είτε μέσω μολυσμένου νερού, κατά το πλύσιμο και την επεξεργασία τους. Η αυξημένη διακίνηση τροφίμων μεταξύ των χωρών του κόσμου έχει προσδώσει στο πρόβλημα της χολέρας παγκόσμιες διαστάσεις (Lee 2001).

3.2.5. Συμπτωματολογία

Η επώαση του μικροβίου διαρκεί από μερικές ώρες έως πέντε ημέρες από την κατανάλωση νερού ή τροφής που έχουν μολυνθεί με τοξινογόνο στέλεχος O₁/O₁₃₉. Οι μολύνσεις από τον ορότυπο O₁ στην πλειονότητα τους είναι ήπιες ή ακόμη και εντελώς ασυμπτωματικές. Ο χρόνος εμφάνισης των συμπτωμάτων της μόλυνσης εξαρτάται, σε κάποιο βαθμό, από τον πληθυσμό των βακτηρίων που εισέρχονται στον οργανισμό, με τη μολύνουσα δόση να είναι της τάξης των 10⁶ κύτταρων.

Η χολέρα χαρακτηρίζεται από την αιφνίδια εμφάνιση εμέτου και διάρροιας, με χαρακτηριστική μορφή κοπράνων (rice-water stools), η οποία οφείλεται στην αυξανόμενη παραγωγή βλέννας εντός του εντερικού σωλήνα, καθώς η νόσος εξελίσσεται (Cash et al. 1974). Στα επακόλουθα του διαρροϊκού συνδρόμου και της επερχόμενης αφυδάτωσης

κατατάσσονται η καταστολή της νεφρικής λειτουργίας, η εμφάνιση έντονης δίψας, οι κράμπες των άκρων και της κοιλιακής χώρας, οι ηλεκτρολυτικές διαταραχές του αίματος και η κατάρπωση. Συχνά ο βαθμός της αφυδάτωσης είναι τόσο έντονος (εικόνα 3.4), που ο ασθενής ενδέχεται να καταλήξει εντός λίγων ωρών από την πρώτη εμφάνιση των συμπτωμάτων (Seas et al. 2005).



Εικόνα 3.4: Η κλινική εικόνα ενός ασθενούς προσβεβλημένου από χολέρα είναι χαρακτηριστική της έντονης αφυδάτωσης (διακρίνεται από τους βυθισμένους οφθαλμούς) και της βαριάς κατάρπωσης. Πηγή: Wikipedia.

Τα non $\chi_1/\text{no}\text{O}_{139}$ στελέχη του *V. cholerae* είναι υπεύθυνα για την πρόκληση μιας σειράς διαταραχών, από τις οποίες ως συχνότερη θεωρείται η γαστρεντερίτιδα (Morris 1990). Μικρής ή μέτριας σοβαρότητας, η κλινική εικόνα ομοιάζει προς αυτήν της διάρροιας από χολέρα, με ηπιότερη, ωστόσο, ένταση. Η επώαση διαρκεί από 12-24 ώρες (Heymann 2004), ενώ τα συμπτώματα έχουν διάρκεια από μία έως δέκα ημέρες. Στις βαρύτερες περιπτώσεις απαιτείται χορήγηση υποστηρικτικής αγωγής, δηλαδή ενυδάτωση και αναπλήρωση ηλεκτρολυτών, και νοσηλεία. Τα ίδια αυτά στελέχη έχουν απομονωθεί από

περιστατικά σηψαιμίας και περιτονίτιδας. Στα περισσότερα από αυτά η πηγή της μόλυνσης δεν προσδιορίστηκε με σαφήνεια, ωστόσο ορισμένοι ασθενείς, κατά την λήψη του ιατρικού ιστορικού, ανέφεραν πρόσφατη κατανάλωση θαλασσινών ή επαφή με μολυσμένο νερό (Morris 1990).

3.2.6. Παθογένεια

Η μόλυνση από *V. cholerae* O₁/O₁₃₉ αρχίζει με την κατάποση μολυσμένης τροφής ή νερού. Μετά την δίοδο του από τον όξινο φραγμό του στομάχου, ο μικροοργανισμός εποικίζει το επιθήλιο του λεπτού εντέρου, με την βοήθεια παραγόντων προσκόλλησης (TCP, ADF, MFRHA, MSHA κ.α.). Η παραγωγή της χολερικής τοξίνης (CT), αλλά και άλλων τοξινών που εμπλέκονται στον παθογενετικό μηχανισμό της χολέρας, διαταράσσει τη μεταφορά ιόντων από τα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου, με αποτέλεσμα την συσσώρευση υγρού στον εντερικό σωλήνα και την εμφάνιση διάρροιας. Συγκεκριμένα, η εντεροτοξίνη αυτή, μέσω βιοχημικών μεταβολών που επιφέρει στα επιθηλιακά κύτταρα, προκαλεί αυξημένη έκκριση ιόντων Cl⁻ από τα κύτταρα των εντερικών κρυπτών και μείωση της απορρόφησης του NaCl από τις εντερικές λάχνες, με αποτέλεσμα την μετακίνηση ηλεκτρολυτών προς το εσωτερικό του εντέρου (Levine et al. 1983). Λόγω της ώσμωσης, επέρχεται μαζική εισροή νερού στον εντερικό σωλήνα, η οποία διαταράσσει περαιτέρω την απορροφητική ικανότητα του εντερικού βλεννογόνου και οδηγεί σε εμφάνιση διάρροιας.

Έχει βρεθεί ότι, εκτός της CT, τα στελέχη *V. cholerae* O₁/O₁₃₉ παράγουν και άλλες τοξίνες, οι οποίες δρουν τοπικά στον εντερικό βλεννογόνο, αυξάνοντας την διαπερατότητα του επιθηλίου του και προκαλώντας έτσι συσσώρευση υγρού στον ειλεό. Η αιμολυσίνη, η οποία διαφοροποιεί τα EI Tor στελέχη από τον κλασικό τύπο, είναι κυτταρολυτική *in vivo* για τα ερυθρά αιμοσφαίρια και *in vitro* για κυτταροκαλλιέργειες ιστών από θηλαστικά είδη. Ακόμη, διαδραματίζει συμπληρωματικό ρόλο στο μηχανισμό πρόκλησης διάρροιας, καθώς

και για την ίδια έχει αποδειχθεί ότι προάγει την συσσώρευση υγρού στον ειλεό (Ichinose et al. 1987).

Άλλες τοξίνες που παράγονται από τα στελέχη O₁ περιλαμβάνουν έναν αναστολέα των διαύλων νατρίου (Tamplin et al. 1987), μια “νέα τοξίνη χολέρας” (Sanyal et al. 1983) και μια ακόμη τοξίνη, παρόμοια με την ciguatoxin των δινωμαστιγωτών πρωτοζώων. Εκτιμάται ότι οι τοξίνες αυτές είναι υπεύθυνες για την πρόκληση διάρροιας σε περιστατικά προσβολής από στελέχη που δεν παράγουν CT. Τα εν λόγω στελέχη έχει βρεθεί ότι παράγουν επίσης μια θερμοάντοχη τοξίνη, γνωστή ως Nag-ST (Morris et al. 1990), η οποία είναι παρόμοιας δομής με την εντεροτοξίνη των *E. coli*.

3.2.7.Θεραπεία

Τα περισσότερα στελέχη του *V. cholerae* είναι ευαίσθητα σε αντιμικροβιακές ουσίες, όπως η τετρακυκλίνη, η χλωραμφαινικόλη, οι αμινογλυκοσίδες, οι κινολόνες και οι νέας γενιάς κεφαλοσπορίνες. Τα εν λόγω φάρμακα συστήνονται από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (World Health Organization, WHO) για την καταπολέμηση της χολέρας. Η τετρακυκλίνη αποτελεί φάρμακο εκλογής, για το λόγο ότι συνδυάζει πολύ θετικά αποτελέσματα (μείωση του όγκου και της διάρκειας της διάρροιας κατά το ήμισυ, (Greenough et al. 1964), και χαμηλό κόστος, ενώ παράλληλα είναι εύκολα διαθέσιμη στο εμπόριο.

Κατά μια μελέτη αντιμικροβιακής αντοχής, που αφορούσε εννέα είδη *Vibrio* (συμπεριλαμβανομένου και του *V. cholerae*), βρέθηκε ότι τα υπό δοκιμή μικρόβια παρουσιάζουν αντοχή σε σουλφαμεθοξαζόλη, τριμεθοπρίμη και πενικιλίνες (Waldor et al. 1996). Ειδικά για τα *V. cholerae* O₁/O₁₃₉ συχνά αναφέρεται αντοχή σε ένα ευρύ φάσμα αντιμικροβιακών ουσιών. Ως εκ τούτου, κρίνεται αναγκαία η τακτική παρακολούθηση της ευαισθησίας των διαφόρων στελεχών του μικροοργανισμού στα αντιμικροβιακά.

Ενθαρρυντικά αποτελέσματα έδωσε η χρήση κοινών βακτηριοκτόνων ουσιών για την εξουδετέρωση στελεχών του *V. cholerae* (Timenetsky et al. 1992). Στις ουσίες αυτές

συμπεριλαμβάνονται η γλουταραλδεϋδη, η φορμαλδεϋδη, το υπεροξειδίο του υδρογόνου, το υποχλωριώδες νάτριο και η φαινόλη, όλα τους σε συγκεντρώσεις ανάλογες με αυτές που χρησιμοποιούνται για την απολύμανση ιατρικού εξοπλισμού. Ειδικά για τα στελέχη E1 Tor, που θεωρούνται υπεύθυνα για τις αλληπάλληλες επιδημίες χολέρας που ξεκίνησαν το 1991 στο Περού, βρέθηκε ότι δεν επιβίωσαν ούτε σε μία από τις πειραματικές δοκιμές (έκθεση σε βακτηριοκτόνα επί 30 λεπτά και σε θερμ οκρασία 20 °C) που πραγματοποιήθηκαν. Τα ίδια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και παρουσία αλβουμίνης του ορού, μιας προστατευτικής πρωτεΐνης, σε συγκέντρωση 0,1%. Η αποτελεσματικότητα των απολυμαντικών που χρησιμοποιούνται για πλύσιμο με νερό, με σκοπό την αποστείρωση διαφόρων επιφανειών, εξαρτάται από τη συγκέντρωση της πρωτεΐνης και άλλων συστατικών που συνδέονται με χημικό τρόπο με τα αντιμικροβιακά και τα αδρανοποιούν (Lewis και Arens 1995).

3.2.8. Πρόληψη

3.2.8.1. Υγιεινή τροφίμων

Το *V. cholerae* δεν αναπτύσσεται σε θερμοκρασία μικρότερη των 10 °C. Αυτό σημαίνει ότι η αποθήκευση των τροφίμων (εν προκειμένω των μυδιών) στις συνήθεις θερμοκρασίες συντήρησης (2-6 °C) αποτρέπει την αύξηση του βακτηριακού πληθυσμού των *Vibrio* σε αυτά. Σε περιπτώσεις μάλιστα μακρόχρονης συντήρησης έχει παρατηρηθεί ακόμη και ήπια μείωση του βακτηριακού φορτίου, όχι όμως σε σημείο να επιφέρει την εξυγίανση του τροφίμου. Η κατάψυξη προκαλεί μείωση του αριθμού των *Vibrio* στα τρόφιμα, της τάξεως των 3-4 δεκαδικών λογαρίθμων ή ακόμη μεγαλύτερη. Βρέθηκε, ωστόσο, ότι για τη μείωση αυτή δεν είναι υπεύθυνη καθαυτή η χαμηλή θερμοκρασία αλλά στην πράξη ο κύκλος κατάψυξης-απόψυξης και συγκεκριμένα το stress που υφίστανται τα βακτηριακά κύτταρα κατά τις ακραίες θερμοκρασιακές μεταβολές (Oliver et. al. 1991).

Επίσης παίζει ρόλο και ο βαθμός προστασίας που παρέχεται από το τρόφιμο προς το μικρόβιο, απέναντι στο ψύχος, ο οποίος ποικίλλει ανάλογα με την σύσταση του τροφίμου.

Το *V. cholerae* θεωρείται θερμοευαίσθητο μικρόβιο. Η ανάπτυξη του μπορεί να πραγματοποιηθεί έως τους 45 °C, η περαιτέρω άνοδος της θερμοκρασίας όμως οδηγεί σε μείωση του πληθυσμού. Ολοκληρωτική καταστροφή επιτυγχάνεται σε συνθήκες βρασμού (100 °C) ή ακόμη και κατόπιν θέρμανσης στους 60 °C για μερικά λεπτά. Με την παστερίωση (57,2 °C επί 30 λεπτά) επιτυγχάνεται μείωση του πληθυσμού κατά 4-5 λογαριθμικές μονάδες. Εξυπακούεται ότι τρόφιμα μαγειρεμένα και κατά συνέπεια εξυγιανθέντα, δεν επιτρέπεται να έρθουν σε επαφή με τα ωμά.

Σε ότι αφορά την υγρασία, η τιμή του συντελεστή ενεργού ύδατος (a_w) ενός τροφίμου πρέπει να είναι ίση ή μεγαλύτερη του 0,93, ώστε να καταστεί δυνατή η ανάπτυξη του *V. cholerae*. Προσοχή πρέπει να δίνεται στην επιφανειακή υγρασία των ολικώς αποξηραμένων ή ημιαποξηραμένων τροφίμων, καθώς η παρουσία της επιδρά θετικά στην ανάπτυξη του βακτηρίου. Το νάτριο είναι απαραίτητο για την ανάπτυξη του *V. cholerae*, ως μέγιστη δε ανεκτή αλατότητα θεωρείται η τιμή 5% NaCl w/v.

Το ουδέτερο pH στα τρόφιμα επίσης ευνοεί την αύξηση του βακτηρίου, ενώ θεωρείται ότι η μείωση του πληθυσμού ξεκινά σε τιμές pH<5. Για τον λόγο αυτό οι όξινες σάλτσες που χρησιμοποιούνται κατά την παρασκευή τροφίμων (συνήθως αυτές που βασίζονται σε χυμ ό τομάτας) μπορούν να αναστείλουν την ανάπτυξη του μικροοργανισμού, καθώς έρχονται σε επαφή μαζί του.

Ένας ακόμη παράγοντας που λειτουργεί ευνοϊκά ως προς την ανάπτυξη των *Vibrio* είναι και η υψηλή περιεκτικότητα ενός τροφίμου σε πρωτεΐνη. Για τον λόγο αυτό τα υψιπρωτεϊνικά τρόφιμα απαιτούν επιπρόσθετη προσοχή ως προς τους χειρισμούς και την αποθήκευση/συντήρησή τους.

Καθοριστικό ρόλο για την κατάσταση της υγιεινής των τροφίμων διαδραματίζουν επίσης οι χειρισμοί, η προέλευση των πρώτων υλών και η προσωπική υγιεινή κατά την

επεξεργασία και/ή τον χειρισμό και την διάθεση των τροφών. Όσοι ασχολούνται επαγγελματικά με την επεξεργασία, μεταποίηση και προετοιμασία των τροφίμων θα πρέπει να τηρούν αυστηρούς κανόνες υγιεινής, ώστε να εξασφαλίζεται η καλή κατάσταση υγιεινής των προϊόντων και κατά συνέπεια η ασφάλεια των καταναλωτών (*“Βασικοί Κανόνες Υγιεινής για την Ασφάλεια των Τροφίμων”*, εκπαιδευτικό εποπτικό υλικό (DVD) του ΕΦΕΤ).

Πολλές χώρες, προκειμένου να μειώσουν τους κινδύνους διάδοσης τροφιμογενών ασθενειών, έχουν καθιερώσει την εφαρμογή συστημάτων HACCP στις βιοτεχνίες/βιομηχανίες τροφίμων, ώστε η παραγωγή και η διακίνηση τους (from farm to fork), να ακολουθεί μια ασφαλή, για τον καταναλωτή, οδό. Αντίστοιχα, κατά την εισαγωγή τροφών απαιτούν από τα προϊόντα να φέρουν τις σχετικές προδιαγραφές ασφαλείας.

3.2.8.2.Υγιεινή του πληθυσμού

Η πρόληψη της εξάπλωσης της χολέρας, η οποία παραμένει σοβαρότατο πρόβλημα στις υπανάπτυκτες χώρες του κόσμου, χαρακτηρίζεται από υψηλή δυσκολία και δαπάνη. Το πλέον σημαντικό μέτρο είναι η απολύμανση του πόσιμου νερού και η εξυγίανση των τροφίμων. Στις τριτοκοσμικές χώρες, η κακή κατάσταση ή ακόμη και η παντελής έλλειψη δικτύου υδρεύσεως πολλαπλασιάζει τον κίνδυνο μόλυνσης που σχετίζεται με την κατανάλωση νερού.

Για τον λόγο αυτό κρίνεται σκόπιμη η εκπαίδευση του πληθυσμού, ώστε ο κόσμος να συνηθίσει κατ' αρχάς στην πρακτική να βράζει (αποστειρώνει) το νερό που πρόκειται να καταναλώσει. Η χλωρίωση επιπλέον κάθε σημείου υδροδότησης, ακόμη και των οικιακών πηγών, θα μπορούσε να συνδράμει προς τον ίδιο σκοπό. Στην εικόνα 3.5 διακρίνεται μία ενημερωτική αφίσα, που σχεδιάστηκε με την χορηγία μιας λέσχης αυτοκινητιστών, η οποία αναφέρεται στα προληπτικά μέτρα υγιεινής που πρέπει να λαμβάνονται, προκειμένου να παρεμποδισθεί η διάδοση της χολέρας στις ενδημικές χώρες.

Εξίσου αναγκαία θεωρείται και η ορθότερη διαχείριση των ανθρώπινων λυμάτων, ώστε αυτά επ' ουδενί να μην έρχονται σε επαφή με τις εστίες του πόσιμου νερού. Σε πολλά κράτη, δυστυχώς, η οικονομική στενότητα δεν επιτρέπει την σχεδίαση και εφαρμογή ενός αποτελεσματικού αποχετευτικού συστήματος. Έτσι η χολέρα γίνεται πολύ εύκολα ενδημική σε περιοχές με προβληματική διάθεση και επεξεργασία των λυμάτων. Αυτό κατέστη εμφανές στις χώρες της Λατινικής Αμερικής, με αποκορύφωμα την επιδημία του 1991.

A FleetWatch INITIATIVE

URGENT ALERT!

CHOLERA CRISIS!

The cholera outbreak, which started in August 2008 and has killed over 3 000 people and infected almost 60 000 others in Zimbabwe, has now swept across the entire region affecting Botswana, Mozambique, South Africa and Zambia, with millions of people now living under the threat of contracting the deadly disease.

Cholera Danger areas

We urge you to take note of the information below and distribute this poster to all company personnel, especially employees and drivers who travel into neighbouring states or into areas in South Africa affected by the disease. It is also available on e-mail should you wish to print extra for your drivers. Call 011 794 2490/1

What is Cholera?

- Cholera is a sickness caused by germs that attack a person's stomach resulting in a rapid loss of body water through vomiting/diarrhoea.

How do we know that someone has cholera?

- The first sign of cholera is a runny stomach (diarrhoea).
- The person loses a lot of water very quickly, feels weak and complains of cramps in their arms and legs.
- Eventually the skin becomes cold and wrinkled.

Where do cholera germs come from?

- The germs live in the intestines of some people. Sometimes the germs make them sick and sometimes not.

How do the germs spread from one person to another?

- Cholera is spread by poor hygiene. When infected people go to the toilet the germs come out with the stool.
- If infected people go to the toilet in the bush the stool gets onto a person's hands or gets washed into a river which is then used for drinking water or to wash food.
- The germs can spread to other people when they drink the water or eat the food, which may look OK, but contains germs. Once inside the body, it can make that person sick.

How can we stop cholera?

There are a few things that people can do so that germs do not spread from one person to another:

- Toilets should be kept clean.
- Toilets should be far away from any river or stream used for drinking or washing.
- Wash your hands each time you have been to the toilet.

POINTS TO REMEMBER

- Don't wash fruit and vegetables in rivers or dams. Use only clean or treated water.
- Only eat food that is well cooked and eat it while it is still hot.
- Avoid eating fish, or shellfish from rivers or dams from areas where the cholera bacteria might be.
- Always peel fruit and vegetables you bought on the road side as you don't know where they were washed.
- Always wash your hands after using the toilet, especially before and after working with food...

HOW TO MAKE SURE WATER IS SAFE

Boil water for ten minutes and leave to cool

OR

Add one teaspoon of JIK to 25 litres of water

HOW TO TREAT CHOLERA

Replace fluid and salts lost through diarrhea and vomiting with the following simple mixture:

Mix one litre of clean, boiled water with 8 level teaspoons of sugar and 1/2 level teaspoon of salt

Start to give the infected person as much of this mixture as possible, at least two cups after each stool and seek professional medical attention immediately.

IMPORTANT

If you think you may have contracted cholera, the most important thing to do is to stay hydrated, drink as much clean water as possible - it will save your life. Go see a doctor immediately for the prescribed antibiotics.

A SIMPLE RULE TO REMEMBER IS

"BOIL IT, COOK IT, PEEL IT OR FORGET IT"

Destined to Lead. SOCIAL RESPONSIBILITY.

Scania's strong belief in social responsibility is derived from one act of kindness at a time.

SCANIA
Scania Southern Africa
Awards: Best of Africa, Best of Africa, Best of Africa
South Africa, Tanzania, Zambia, Zimbabwe

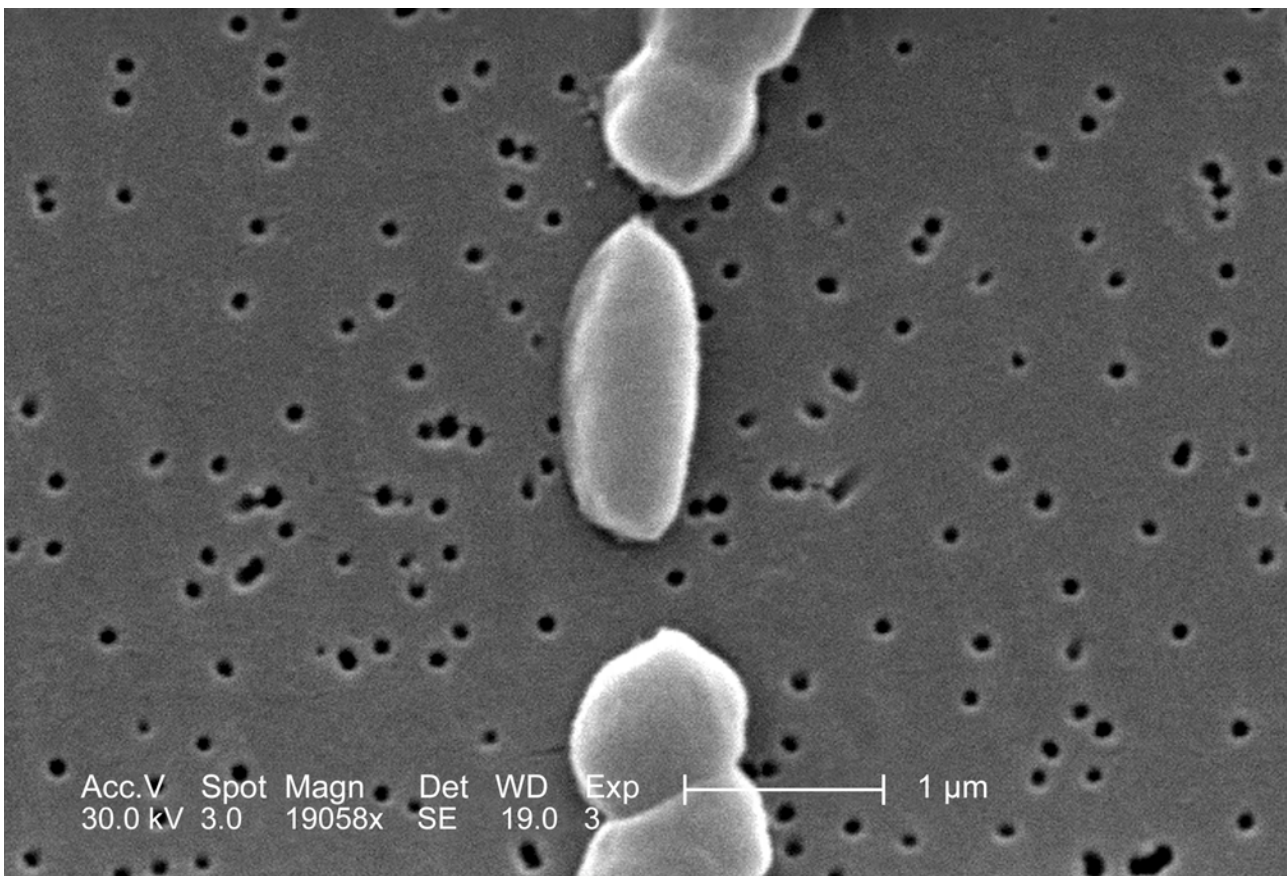
Εικόνα 3.5: Επιμορφωτική αφίσα (poster) που αποσκοπεί στην ενημέρωση του πληθυσμού για τον κίνδυνο προσβολής από χολέρα.

Πηγή: <http://www.fleetwatch.co.za/magazines/Feb2009/PicsFeb2009/Cholera%20poster%20Feb09.jpg>

3.3. *Vibrio parahaemolyticus*

3.3.1. Περιγραφή

Το *V. parahaemolyticus* (εικόνα 3.6) είναι ένα καμπυλόμορφο, ραβδόσχημο, gram αρνητικό βακτήριο το οποίο απαντάται σε υφάλμυρα νερά και προκαλεί γαστρεντερικές διαταραχές στον άνθρωπο (Κέντρο Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων, Centers for Disease Control and Prevention, CDC). Το *V. parahaemolyticus* δίνει θετική την αντίδραση της οξειδάσης, είναι προαιρετικά αερόβιο και ασπορογόνο. Όπως και άλλα είδη του γένους *Vibrio*, το μικρόβιο αυτό είναι κινητό, με ενιαίο, πολικής θέσης μαστίγιο (Ryan and Ray 2004).



Εικόνα 3.6: *Vibrio parahaemolyticus*. Λήψη από Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σαρώσεως (ΗΜΣ).

Πηγή: Wikipedia.

Παρά το ότι η λοίμωξη μπορεί να συμβεί διά της κοπρανοστοματικής οδού (κατανάλωση τροφών μολυσμένων από ακαθαρσίες φορέων του *V. parahaemolyticus*), η

κατάποση βακτηρίων, παρόντων σε ωμά ή ανεπαρκώς μαγειρεμένα θαλασσινά (συνήθως στρείδια), είναι η κυρίαρχη αιτία της οξείας γαστρεντερίτιδας που προκαλείται από το *V. parahaemolyticus* (Finkelstein 1996). Επίσης εμφανίζονται μολύνσεις τραυμάτων, οι οποίες όμως είναι πολύ λιγότερο συχνές. Ο μηχανισμός της παθογένειας των λοιμώξεων από *V. parahaemolyticus* δεν έχει ακόμη διευκρινιστεί πλήρως (Baffone et al. 2005).

Το *V. parahaemolyticus* είναι υπεύθυνο για το 70% των περιστατικών διάρροιας που οφείλονται στην κατανάλωση θαλασσινών. Τα κρούσματα εντοπίζονται κατά μήκος παράκτιων περιοχών καθώς επίσης και στα εκβολικά συστήματα ποταμών, κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού και στις αρχές του φθινοπώρου, όταν οι υψηλότερες θερμοκρασίες του νερού ευνοούν την ανάπτυξη των βακτηρίων (DePaola et al. 1990). Η ευρεία εξάπλωση και οι μεγάλοι πληθυσμοί του βακτηρίου στα οστρακοειδή και στα μαλάκια, κατά τη διάρκεια των εποχικών εξάρσεων, καθώς και ο δυνητικός ρόλος των εντόμων στη μετάδοση του μικροοργανισμού, προκαλούν έντονο προβληματισμό. Στα αλιεύματα που συχνότερα εμπλέκονται στη μόλυνση περιλαμβάνονται το καλαμάρι, το σκουμπρί, ο τόνος, οι σαρδέλες, τα καβούρια, οι γαρίδες αλλά και δίθυρα μαλάκια, όπως είναι τα στρείδια και τα κυδώνια (Su και Liu 2007).

Η πλειονότητα των στελεχών του *V. parahaemolyticus* που απομονώνονται από τα αλιεύματα είναι αβλαβή για τον άνθρωπο. Η αντιδιαστολή των παθογόνων στελεχών από τα απαθγόνα στηρίζεται στην ιδιότητα των πρώτων (συνήθως κλινικά στελέχη) να προκαλούν αιμόλυση σε αιματούχα θρεπτικά υποστρώματα με υψηλή συγκέντρωση NaCl (φαινόμενο Kanagawa) (Joseph et al. 1982). Πρόσφατα και με αφορμή την παρατήρηση ότι πολλά Kanagawa αρνητικά στελέχη είναι παθγόνα έχουν ανακύψει αμφιβολίες σχετικά με την χρηστική αξία της ιδιότητας αυτής. Οι δοκιμές σε πειραματόζωα, αν και είναι αποτελεσματικότερες ως προς τον έλεγχο της παθογένειας των διαφόρων στελεχών, απαιτούν ειδικό εξοπλισμό, χαρακτηρίζονται από αυξημένο κόστος και επίσης αποφεύγονται για ανθρωπιστικούς λόγους που σχετίζονται με την ευζωία των ζώων. Η

χρήση μοριακών βιολογικών τεχνικών αποδεικνύεται ως το πιο αξιόπιστο μέσο για την ανίχνευση των παθογόνων στελεχών του *V. parahaemolyticus*. Σε αυτές τις μεθόδους κατατάσσονται η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) και ο μοριακός υβριδισμός και οι δύο εκ των οποίων στοχεύουν στην ανίχνευση γονιδίων του γενώματος των βακτηρίων, τα οποία κωδικοποιούν τον σχηματισμό της αιμολυσίνης.

Όπως συμβαίνει και με άλλα gram αρνητικά βακτήρια που αναπτύσσονται στις εκβολές ποταμών ή στη θάλασσα, το *V. parahaemolyticus* είναι πιθανόν να διανύει κάποιο στάδιο αδράνειας. Το γεγονός αυτό σε πολλές περιπτώσεις καθιστά το βακτήριο μη ανιχνεύσιμο. Επίσης, σε ότι αφορά τα μορφολογικά χαρακτηριστικά τους, τα στελέχη εμφανίζουν μεταξύ τους αρκετές παραλλαγές, με αποτέλεσμα να συγχέονται ακόμη και με απαθογόνα στελέχη.

Μέχρι τα τέλη της δεκαετίας του 1960, όταν το *V. parahaemolyticus* ανιχνεύθηκε στις Η.Π.Α., είχαν παρατηρηθεί, ανά τον κόσμο, σποραδικά κρούσματα τροφολοιμώξεων. Στην Ιαπωνία ωστόσο, το *V. parahaemolyticus* αποτελεί τον συχνότερο αιτιολογικό παράγοντα πρόκλησης τροφολοιμώξεων (Rachid et al. 1992). Στις Η.Π.Α. τα θαλασσινά καταναλώνονται από το 50% των ανθρώπων και ως επί το πλείστον κατόπιν μαγειρέματος ενώ αντίθετα στην Ιαπωνία σερβίρονται είτε ωμά είτε μισομαγειρεμένα και αποτελούν την κυριότερη πηγή πρωτεΐνης ζωικής προελεύσεως για τον εντόπιο πληθυσμό.

3.3.2.Ορολογική ταξινόμηση

Ορολογικά τα *V. parahaemolyticus* διαχωρίζονται, βάσει του σωματικού (O) και του πολυσακχαριδικού (K) αντιγόνου τους, σε 11 και 71 οροτύπους O και K αντίστοιχα. Παρότι η πλειονότητα των στελεχών που απομονώνονται από κλινικά περιστατικά ταξινομείται στην κατηγορία O, δεν έχει αποδειχθεί κάποια αποκλειστική σχέση μεταξύ οροτύπου και παθογένειας.

Μία ακόμη ταξινόμηση των *V. parahaemolyticus* γίνεται σε σχέση με την ικανότητα ή μη ορισμένων στελεχών να παράγουν την αιμολυσίνη Kanagawa, γνωστή και ως TDH, η δράση της οποίας χαρακτηρίζεται ως παθογόνος. Η παραγωγή της αιμολυσίνης από τα βακτήρια ανιχνεύεται με τη χρήση του Wagatsuma agar.

3.3.3.Χαρακτηριστικές ιδιότητες

Το *V. parahaemolyticus* μπορεί να αναπτυχθεί παρουσία 1-8% NaCl αλλά παρουσιάζει άριστη ανάπτυξη σε εύρος 2-4% και δεν επιβιώνει σε απεσταγμένο νερό. Η ανάπτυξη του αναστέλλεται σε επίπεδα NaCl άνω του 10%, ιδιότητα που το διαφοροποιεί από το επίσης παθογόνο *V. alginolyticus*. Η βέλτιστη τιμή a_w για την ανάπτυξη του είναι 0,992, παρουσία NaCl, ενώ η ελάχιστη ανεκτή είναι 0,948. Το βακτήριο επιβιώνει σε εύρος pH από 4,8 έως 11, με άριστη περιοχή την ζώνη 7,6-8,6. Έχει παρατηρηθεί ότι ο πληθυσμός του μικροοργανισμού σε ορισμένα έτοιμα μαγειρεμένα θαλασσινά (π.χ. γαρίδες σε σάλτσα τομάτας με pH 3,5) είναι κατά πολύ μικρότερος απ' ό τι στα αντίστοιχα προϊόντα για την προετοιμασία των οποίων δεν έχει χρησιμοποιηθεί όξινη σάλτσα.

Το *V. parahaemolyticus* είναι ευαίσθητο στο ψύχος και η μακρόχρονη συντήρηση των τροφίμων σε θερμοκρασία 4 °C επηρεάζει αρνητικά την επιβίωση του βακτηρίου και συνεπώς το βακτηριακό φορτίο αυτών. Η ελάχιστη θερμοκρασία ανάπτυξης του στα τρόφιμα είναι 9,5-10 °C ενώ στο θαλάσσιο περιβάλλον το εύρος ανάπτυξης του κυμαίνεται από 10 °C έως 44 °C, με άριστη περιοχή τις θερμοκρασίες 30-35 °C. Ο χρόνος γενεάς του, κάτω από ιδανικές συνθήκες ανάπτυξης, ανέρχεται σε 9-13 λεπτά.

3.3.4.Συμπτωματολογία

Το *V. parahaemolyticus* προσβάλλει τον άνθρωπο προκαλώντας σε αυτόν κυρίως γαστρεντερίτιδα. Η περίοδος επώασης είναι περίπου 24 ώρες. Η κλινική εικόνα της λοίμωξης συντίθεται από συμπτώματα όπως διάρροια, κοιλιακές κράμπες, ναυτία, έμετος

και πυρετός. Σε σοβαρότερες περιπτώσεις παρατηρούνται υδαρής διάρροια με βλέννα ή αίμα και τεινεσμοί. Στην Ιαπωνία, όπου κατά καιρούς υπήρξαν θανατηφόρα περιστατικά, έχουν επίσης αναφερθεί καρδιακές αρρυθμίες. Τα συμπτώματα εμφανίζονται 4-96 ώρες μετά από την κατανάλωση μολυσμένων θαλασσινών και συνήθως υποχωρούν εντός της παρέλευσης 72 ωρών, αλλά ενδέχεται να διαρκέσουν έως και δέκα ημέρες σε ανοσοκατεσταλμένα άτομα. Η νόσος συνήθως είναι αυτοϊώμενη και η εξέλιξη της διαρκεί 3-4 ημέρες.

Επιπλέον, το κολύμπι ή η εργασία σε μολυσμένα νερά μπορεί να επιτρέψει την είσοδο του μικροβίου από τα μάτια ή τα αυτιά (Penland et al. 2000), καθώς και από πληγές ή πάσης φύσεως λύσεις συνεχείας του δέρματος και των βλεννογόνων. Μετά τον τυφώνα Κατρίνα (Ανατολική Ακτή ΗΠΑ, Αύγουστος 2005), υπήρξαν 22 περιπτώσεις λοιμώξεων τραυμάτων από *Vibrio*, τρεις από τις οποίες προκλήθηκαν από *V. parahaemolyticus* και δύο εκ των οποίων απέβησαν θανατηφόρες.

3.3.5. Παθογένεια

Σε ότι αφορά τον παθογενετικό μηχανισμό του *V. parahaemolyticus* κυρίαρχο ρόλο κατέχει η θερμοάντοχη αιμολυσίνη TDH. Πρόκειται περί πρωτεΐνης μοριακού βάρους 42.000 daltons, με δράση καρδιοτοξική, κυτταροτοξική και θανατηφόρα σε ποντίκια εργαστηρίου, κατόπιν ενδοπεριτοναϊκής έγχυσης σε αυτά ποσότητας 1,5 μg. Σημαντική για τον παθογόνο μικροοργανισμό είναι η *in vivo* δυνατότητα προμήθειας σιδήρου, τον οποίο εξασφαλίζει, προκαλώντας λύση των ερυθροκυττάρων. Η αιμολυσίνη, η οποία εκκρίνεται από το μικρόβιο, δεσμεύεται στην επιφάνεια των ερυθρών αιμοσφαιρίων και στη συνέχεια επιφέρει την λύση τους. Η παραγωγή της εξαρτάται από το pH και είναι εφικτή μόνο στην περιοχή 5,5-5,6. Η δράση της ενισχύεται παρουσία ιόντων ασβεστίου. Πιθανολογείται ότι η αιμολυσίνη εμπλέκεται στην πρόκληση καρδιακών αρρυθμιών σε ορισμένους ασθενείς. Αντιθέτως δεν έχει εξακριβωθεί το κατά πόσο ευθύνεται για την πρόκληση διάρροιας.

Έχουν ανακαλυφθεί αρκετές, συγγενείς προς την TDH, τοξίνες με διαφορετική ηλεκτροφορητική ικανότητα αλλά πανομοιότυπη αντιγονικότητα και μικρές αποκλίσεις ως προς την αιμολυτική ικανότητα. Οι τοξίνες αυτές (TRH, TDH related haemolysin) παράγονται τόσο από Kanagawa θετικά όσο και από αρνητικά στελέχη.

Το *V. parahaemolyticus* παράγει επίσης ένζυμα με αιμολυτική δράση καθώς και έναν εντεροτοξικό παράγοντα. Έχει περιγραφεί η ικανότητα προσκόλλησης του βακτηρίου στα επιθηλιακά κύτταρα καθώς και η ικανότητα αιμοσυγκόλλησης.

3.3.6. Πρόληψη

Ισχύουν οι προαναφερθείσες (για το *V. Cholerae*) γενικές και ειδικές αρχές προστασίας. Επιπλέον, πολλές από τις πρόσθετες αντιμικροβιακές ουσίες που χρησιμοποιούνται στα τρόφιμα αναστέλλουν αποτελεσματικά την ανάπτυξη του *V. parahaemolyticus*. Σε αυτές συγκαταλέγονται το σορβικό κάλιο, το βενζοϊκό νάτριο κ.α. Η κατεργασία προϊόντων, όπως η καβουρόψιχα, με αυτό τον τρόπο μειώνει τα επίπεδα του μικροοργανισμού στο τρόφιμο και αυξάνει την ευαισθησία του στη θέρμανση.

3.3.7. Θεραπεία

Δεδομένου ότι η συντριπτική πλειοψηφία των τροφολοιμώξεων από *V. parahaemolyticus* είναι αυτοπεριοριζόμενες, η θεραπεία συνήθως δεν κρίνεται αναγκαία. Σε σοβαρές περιπτώσεις όμως ενδείκνυται η ενδοφλέβια χορήγηση υγρών και ηλεκτρολυτών (Ryan and Ray 2004).

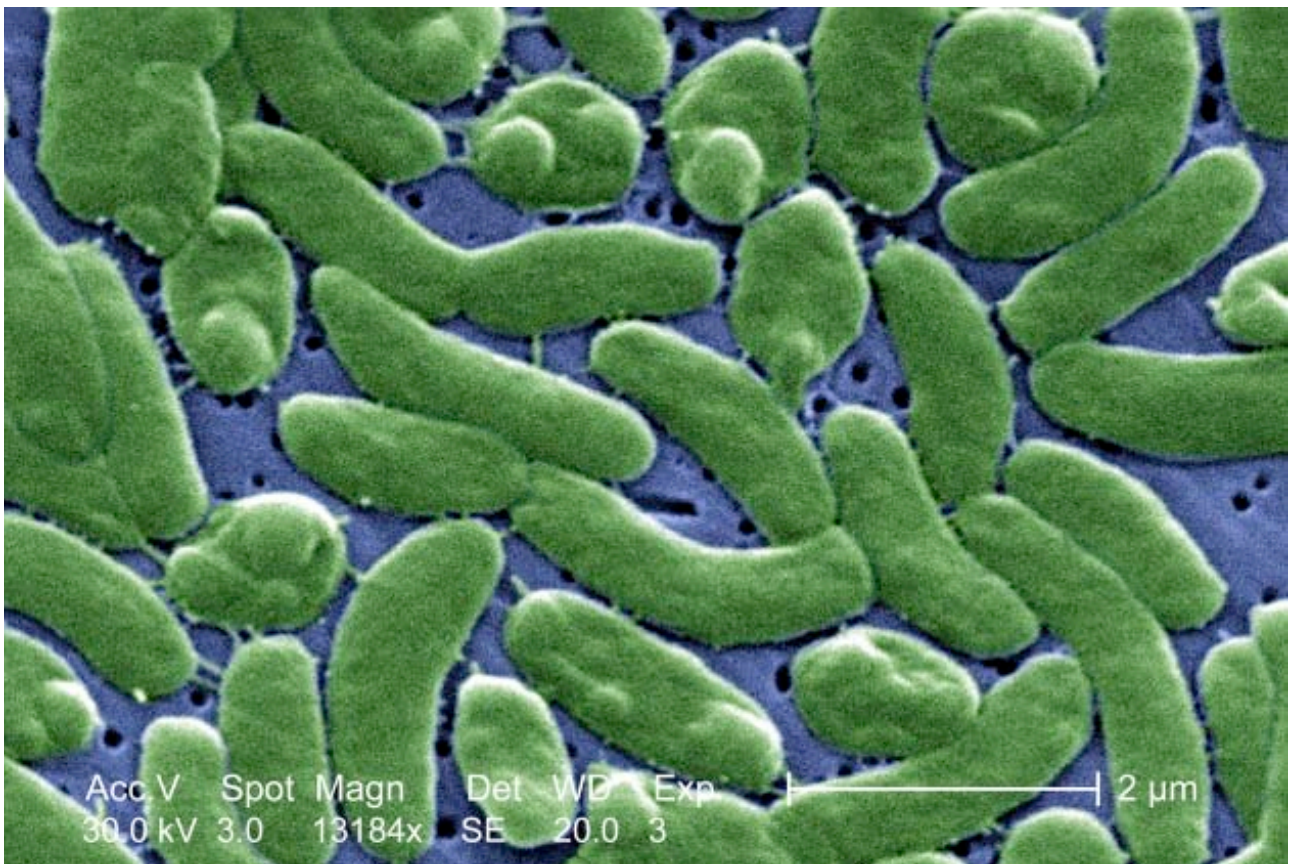
Σε ειδικές περιπτώσεις, το θεραπευτικό σχήμα εκλογής για την αντιμετώπιση λοιμώξεων από *V. parahaemolyticus* περιλαμβάνει την χρήση χλωραμφαινικόλης, τετρακυκλίνης, αμινογλυκοσιδών, κεφαλοσπορινών 3^{ης} γενεάς, αζτρεονάμης, ιμιπενέμης και κινολονών. Ιδιαίτερα οι τελευταίες βρέθηκε ότι χαρακτηρίζονται από την μεγαλύτερη,

συγκριτικά με άλλες αντιμικροβιακές ουσίες, ισχύ εναντίον του βακτηρίου. Οι πενικιλίνες και οι παλαιότερες κεφαλοσπορίνες, αντιθέτως, κρίνονται ως αναποτελεσματικές.

3.4. *Vibrio vulnificus*

3.4.1. Περιγραφή

Το *V. vulnificus* (εικόνα 3.7) ανήκει στα gram αρνητικά, κινητά, κυρτά και ραβδόμορφα βακτήρια του γένους *Vibrio*. Πρωτοαπομονώθηκε το 1964 ενώ η πρώτη μελέτη ταξινόμησης του συντάχθηκε το 1976 από ερευνητές του CDC, οι οποίοι περιέγραψαν περί τα 38 στελέχη. Αναφέρθηκε για πρώτη φορά ως "λακτόζη θετικό *Vibrio*" από τους Hollis et al. (Journal of Clinical Microbiology 1976). Στη συνέχεια έλαβε το όνομα *Beneckea vulnifica* από τους Reichelt et al. (Αρχεία Μικροβιολογίας 1976) και τέλος μετονομάστηκε σε *V. vulnificus* από τον Farmer (Farmer 1979). Παρόν στα θαλάσσια περιβάλλοντα, π.χ. εκβολές ποταμών, υφάλμυρες λίμνες ή παράκτιες περιοχές, το *V. vulnificus* σχετίζεται με το *V. cholerae*, τον αιτιολογικό παράγοντα της χολέρας (Oliver and Kaper 2001, Oliver 2005). Η μόλυνση από *V. vulnificus* οδηγεί σε ταχέως αναπτυσσόμενη κυτταρίτιδα ή σε σηψαιμία (James and Berger 2006).



Εικόνα 3.7: *Vibrio vulnificus*. Λήψη από Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σαρώσεως (ΗΜΣ). Τεχνική ψευδούς χρώσεως. Πηγή: Wikipedia.

Το *V. vulnificus* προκαλεί λοίμωξη η οποία συχνά ακολουθεί την κατανάλωση θαλασσινών, κυρίως ωμών ή μισομαγειρεμένων στρειδιών. Τα βακτήρια μπορούν επίσης να εισέλθουν στο σώμα μέσω ανοιχτών πληγών, κατά την κολύμβηση σε μολυσμένα νερά (Oliver 2005) ή μέσω τραυμάτων που προκαλούνται από τις άκανθες των πτερυγίων ορισμένων ιχθύων, όπως είναι, για παράδειγμα, η tilapia.

Το *V. vulnificus* συνήθως βρίσκεται στις βορειοδυτικές περιοχές του Ειρηνικού Ωκεανού. Απαντάται επίσης, σε χαμηλές συγκεντρώσεις, στα νερά της Μεσογείου θάλασσας και ειδικότερα στα στενά της Μεσσήνης, και η απομόνωση του διά συμβατικών μεθόδων (καλλιέργεια σε θρεπτικά υποστρώματα) περιορίζεται κυρίως κατά τις θερμές περιόδους (Gugliandolo et al. 2005; Maugeri et al. 2006).

3.4.2.Χαρακτηριστικές ιδιότητες

Το *V. vulnificus* έχει παρόμοιες απαιτήσεις, για την ανάπτυξη του, με αυτές του *V. parahaemolyticus*. Είναι επίσης αλόφιλο, ωστόσο διαφέρει κυρίως στην αντοχή του στο NaCl, η οποία είναι μικρότερη και κυμαίνεται από 0,1% έως 5%. Για τον λόγο αυτό, σε νερά χαμηλής σχετικά αλατότητας παρατηρείται αύξηση του πληθυσμού των *V. vulnificus* σε βάρος των *V. parahaemolyticus*, στα οστρακοειδή (Wright et al. 1996, 2007).

Αναπτύσσεται βέλτιστα στους 37 °C, αν και μπορεί να επιβιώσει σε θερμοκρασίες 8-43 °C. Σε ωμά οστρακοειδή δεν αναπτύσσεται σε θερμοκρασία χαμηλότερη των 13 °C και για τον λόγο αυτό καθίσταται υψίστης σημασίας η άμεση ψύξη των αλιευμάτων, μετά από την συλλογή τους. Οι τιμές pH 5-10 επιτρέπουν την ανάπτυξη του βακτηρίου, η οποία ιδανικά πραγματοποιείται σε pH 7,8.

3.4.3.Παθογένεια

Ο παθογενετικός μηχανισμός δράσης του *V. vulnificus* είναι πολυπαραγοντικός, καθώς εμπλέκονται η παραγωγή κάψας και μιας σειράς ενζύμων (κυτολυσίνη, πρωτεάση, ελαστάση και φωσφολιπάση). Οι παράγοντες αυτοί απαντώνται σε όλα τα κλινικά και ελεύθερα στο περιβάλλον στελέχη (Strom και Paranjpye, 2000), γεγονός που συνηγορεί υπέρ της θέσης ότι πρακτικά όλα τα στελέχη είναι δυνητικά παθογόνα.

Η πολυσακχαριδική κάψα που παράγεται από ορισμένα στελέχη του *V. vulnificus* κατέχει ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στο μηχανισμό πρόκλησης νόσου. Οι Simpson et al. (1987) μελέτησαν 38 κλινικά και περιβαλλοντικά στελέχη, παθογόνα και μη, για να διαπιστώσουν ότι τα μεν πρώτα σχημάτιζαν αδιαφανείς αποικίες (παρουσία κάψας) τα δε δεύτερα σχημάτιζαν διαφανείς αποικίες (απουσία κάψας). Επιπλέον, παρατήρησαν ότι από βακτηριακά κύτταρα που διέθεταν κάψα μπορούσαν να προκύψουν νέα κύτταρα χωρίς κάψα, τα οποία επίσης στερούνταν παθογένειας. Η κάψα προσδίδει ανθεκτικότητα στα βακτήρια απέναντι στην φαγοκυττάρωση.

Ο δεύτερος παράγοντας παθογένειας του *V. vulnificus*, η ενδοτοξίνη LPS, είναι υπεύθυνη για την εμφάνιση συμπτωμάτων όπως πυρετός, οίδημα, αιμορραγία και κυρίως υπόταση, που συνθέτουν την εικόνα του τοξαιμικού σοκ κατά τη σηψαιμική λοίμωξη από το βακτήριο. Οι McPherson et al. (1991) βρήκαν ότι η ενδοφλέβια χορήγηση της LPS σε ποντίκια οδηγεί σε μείωση της αρτηριακής πίεσης τους εντός 10 λεπτών, ενώ σε προχωρημένες καταστάσεις επέρχεται κρίσιμη ελάττωση του καρδιακού ρυθμού και εν τέλει θάνατος, εντός 30-60 λεπτών. Οι Simonson και Siebeling (1988) ταυτοποίησαν πέντε οροτύπους LPS, χρησιμοποιώντας μονοκλωνικά αντισώματα. Βρήκαν ότι το 25% των κλινικής προέλευσης στελεχών έφεραν από ένα έως πέντε αντιγόνα LPS, ενώ μόνο το 0,3% των περιβαλλοντικών στελεχών είχαν αυτό το χαρακτηριστικό.

Εκτός της κάψας και της LPS, το *V. vulnificus* παράγει μια σειρά εξωκυτταρικών προϊόντων όπως αιμολυσίνη, πρωτεάση, ελαστάση, κολλαγενάση, λιπάση, φωσφολιπάση, υαλουρονιδάση κ.α. Κανείς ωστόσο από τους προαναφερθέντες δυνητικά παθογόνους παράγοντες δεν έχει αποδειχτεί πως συμμετέχει ενεργά στην παθογένεια της μόλυνσης από το βακτήριο.

Περισσότερη έμφαση έχει δοθεί σε μια ισχυρή θερμοάντοχη αιμολυσίνη/κυττολυσίνη που εντοπίστηκε και η οποία έχει λυτική δράση εναντίον των κυττάρων των θηλαστικών (Yamanaka et al. 1990), αυξάνει υπέρμετρα την διαπερατότητα των κυττάρων ενώ έχει παρατηρηθεί ότι έχει θανατηφόρο δράση στα ποντίκια, προκαλώντας σε αυτά αιμορραγικές νεκρωτικές αλλοιώσεις, οίδημα και καταστροφή του μυϊκού ιστού. Επίσης, έχει περιγραφεί μια ελαστολυτική πρωτεάση, η οποία στερείται μεν αιμολυτικής ικανότητας πλην όμως ασκεί καταστρεπτική δράση επί της αλβουμίνης του ορού, της IgG, των παραγόντων C3 και C4 του συμπληρώματος και της ελαστίνης.

Το βακτήριο διαπερνά τον εντερικό φραγμό και ακολούθως εισέρχεται στην κυκλοφορία του αίματος, προκαλώντας σηψαιμία και διάχυτη φλεγμονή του συνδετικού ιστού, του δέρματος και του υποδόριου ιστού.

Τα επίπεδα Fe στο αίμα επηρεάζουν την παθογένεια του *V. vulnificus*, το οποίο χρησιμοποιεί το ιχνοστοιχείο αυτό στις μεταβολικές λειτουργίες του. Συγκεκριμένα το βακτήριο παράγει και εκκρίνει κάποιες ουσίες, ονόματι “σιδηροφόρα”, οι οποίες απομακρύνουν την αδιάλυτη στο αίμα μορφή του σιδήρου (Fe^{+3}) και ενισχύουν την πρόσληψη της έτερης μορφής του στοιχείου, ώστε να αξιοποιηθεί, εν συνεχεία, από το βακτήριο.

3.4.4.Συμπτωματολογία

Τα συμπτώματα περιλαμβάνουν εμετό, διάρροια, κοιλιακό άλγος και φυσαλιδώδη δερματίτιδα, η οποία μερικές φορές συγχέεται με τον πέμφιγα ή το πεμφιγοειδές.

Ιδιαίτερα ευάλωτα είναι τα άτομα με ηπατική νόσο (κίρρωση και ηπατίτιδα) ή οι ανοσοκατεσταλμένοι ασθενείς (Jones and Oliver 2009) που πάσχουν από καρκίνο, καταστολή του μυελού των οστών, AIDS, σακχαρώδη διαβήτη κλπ). Σε αυτές τις περιπτώσεις, το *V. vulnificus* συνήθως εισέρχεται στην κυκλοφορία του αίματος και μπορεί να προκαλέσει πυρετό και ρίγη, σηπτική καταπληξία (με έντονη πτώση της αρτηριακής πίεσης) και φυσαλιδώδη δερματίτιδα (Oliver and Kaper 2005). Σύμφωνα με το CDC, περίπου οι μισοί από όσους παρουσιάζουν μικροβιαϊμία καταλήγουν σε θάνατο.

Οι μολύνσεις τραυμάτων από *V. vulnificus* χαρακτηρίζονται από θνησιμότητα της τάξης του 25%. Σε ασθενείς όπου η μόλυνση εξελίσσεται σε σηψαιμία, συνήθως μετά από per os πρόσληψη μικροοργανισμών, το ποσοστό θνησιμότητας αυξάνεται δραματικά στο 50%. Η πλειοψηφία αυτών των ασθενών πεθαίνουν μέσα στις πρώτες 48 ώρες από την εγκατάσταση της λοίμωξης. Το *V. vulnificus* συχνά προκαλεί εκτεταμένα παραμορφωτικά έλκη (εικόνα 3.8) που απαιτούν σοβαρή χειρουργική αποκατάσταση ή ενδεχομένως ακόμα και ακρωτηριασμό μελών του σώματος.



Εικόνα 3.8: Επιμόλυνση ανοικτού τραύματος από *V. vulnificus*. Πηγή: Εικόνες google.

Η πλέον δυσμενής πρόγνωση αφορά τους ασθενείς που καταφθάνουν στο νοσοκομείο σε κατάσταση καταπληξίας (σοκ). Η συνολική θνησιμότητα σε ασθενείς που δέχθηκαν θεραπεία μετά από προσβολή (είτε μετά από κατάποση μικροοργανισμών είτε μέσω τραύματος) αγγίζει το 33% (Liu et al. 2006).

Οι λοιμώξεις από *V. vulnificus* επηρεάζουν δυσανάλογα τους άνδρες ως προς τις γυναίκες. Το 85% των ατόμων που αναπτύσσουν σηψαιμικό σοκ είναι άνδρες. Ακόμη, οι γυναίκες που έχουν υποβληθεί σε ωθηκεκτομή εμφανίζουν αυξημένο ποσοστό θνησιμότητας, καθώς τα οιστρογόνα, όπως άλλωστε έχει αποδειχθεί πειραματικά, κατέχουν προστατευτική δράση έναντι του *V. vulnificus* (Merkel et al. 2001).

3.4.5.Θεραπεία

Ιδανική θεραπεία δεν υπάρχει αλλά από μία μελέτη ανασκόπησης, που έγινε στην Ταϊβάν και αφορά 93 ασθενείς, προέκυψε ότι η χρήση μιας κεφαλοσπορίνης τρίτης γενιάς και μιας τετρακυκλίνης (π.χ. κεφτριαξόνη και δοξυκυκλίνη αντίστοιχα) οδηγούν σε βελτίωση της κλινικής εικόνας (Liu et al. 2006). Απαιτούνται βέβαια περισσότερες κλινικές δοκιμές, προκειμένου να επιβεβαιωθεί αυτή η ανακάλυψη, αλλά τα μέχρι στιγμής δεδομένα που έχουν συλλεχθεί από *in vitro* δοκιμές στηρίζουν την υπόθεση ότι αυτός ο συνδυασμός αντιμικροβιακών ουσιών έχει συνεργιστική δράση κατά του *V. vulnificus*. Ομοίως, ο Ιατρικός Σύνδεσμος Αμερικής και τα Κέντρα Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων (CDC) συστήνουν την θεραπεία των ασθενών με τετρακυκλίνη και την ενδοφλέβια χορήγηση συνδυασμού δοξυκυκλίνης με κεφταζιντίμη (Daniels και Shafaie 2000).

Η γαστρεντερίτιδα αντιμετωπίζεται συντηρητικά, με την αναπλήρωση υγρών και ηλεκτρολυτών ενώ παράλληλα χορηγούνται αντιβιοτικά για την πρόληψη δευτερογενών επιπλοκών. Η τριφλουπεραζίνη (TFP) προστατεύει τον οργανισμό από την βλαπτική επίδραση της κυτολυσίνης (Lee et al. 2004c).

3.4.6.Πρόληψη

Η προστασία από την μόλυνση κυρίως περιλαμβάνει την απαιτούμενη ενημέρωση των ευπαθών πληθυσμιακών ομάδων, ώστε να αποφεύγουν την κατανάλωση ωμών οστρακοειδών. Το μαγείρεμα, επί του παρόντος, παραμένει η μόνη αξιόπιστη μέθοδος για την καταστροφή του βακτηρίου (Tamplin and Capers 1992).

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

4.Αναζήτηση του *Vibrio* spp. στα μύδια

Στην παρούσα ενότητα, η οποία αποτελεί το πειραματικό μέρος της ανά χείρας διπλωματικής εργασίας, περιγράφεται αναλυτικά η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την αναζήτηση (δοκιμή παρουσίας/απουσίας, prevalence test) βακτηρίων του γένους *Vibrio* spp. σε μεσογειακά μύδια (*Mytilus galloprovincialis*). Τα δείγματα (n=50) ελήφθησαν αντιπροσωπευτικά από διάφορες εγκαταστάσεις μυδοκαλλιέργειας του Θερμαϊκού κόλπου, στην περιοχή της Πιερίας, κατά την περίοδο Αυγούστου-Δεκεμβρίου 2011.

4.1.Υλικά και μέθοδοι

Για τη διενέργεια του πειράματος χρησιμοποιήθηκε ο εξοπλισμός του μικροβιολογικού Εργαστηρίου της Υγιεινής Τροφίμων του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης και ειδικότερα τα ακόλουθα εργαλεία και σκεύη:

Λαβίδα ιστών, αιχμηρό μαχαίρι, ψαλίδι, ποτήρια ζέσεως και κωνικές φιάλες διαφόρων μεγεθών, στείροι πλαστικοί περιέκτες (σακούλες) τύπου Stomacher®, δοκιμαστικοί σωλήνες των 18 ml, στείρα τρυβλία petri 100 mm × 15 mm, πουάρ και σιφώνια πλήρωσεως των 0,5 ml, 1 ml και 5 ml, αυτόματη πιπέτα 0-1000 μl, μεταλλικός και πλαστικός μικροβιολογικός κρίκος, φιαλίδια Eppendorf® 1 ml.

Αναφορικά με συσκευές και διατάξεις χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω:

- Θάλαμος νηματικής ροής, για την εξασφάλιση στείρου χώρου εργασίας
- Ομογενοποιητής Stomacher®
- Επωαστικός κλίβανος, θερμοκρασίας 37 °C ± 1 °C

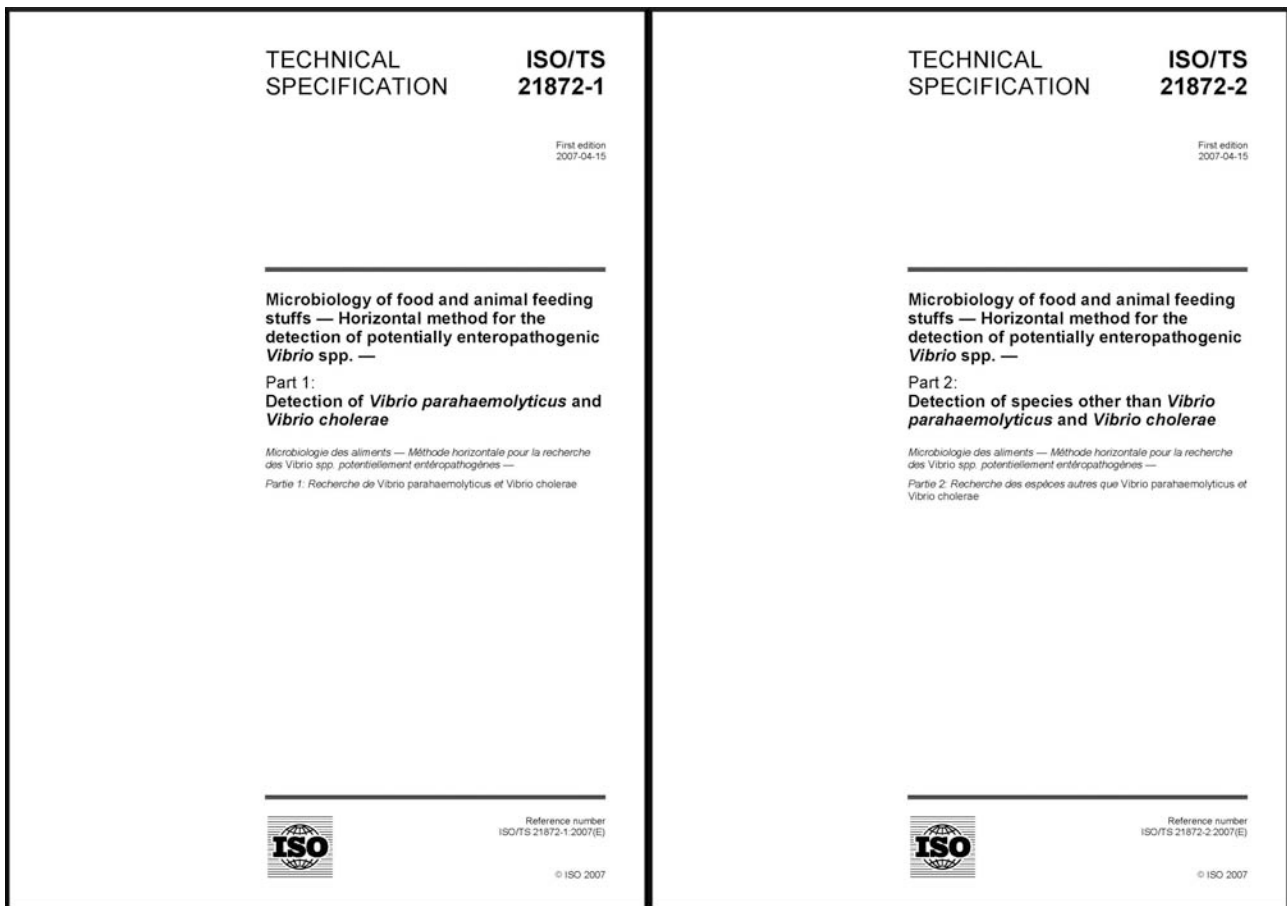
- Υδατόλουτρο θερμοκρασίας 44 °C έως 47 °C (το νερό καλό είναι να περιέχει αντιμικροβιακή ουσία)
- Κλίβανος υγρής αποστείρωσης (αυτόκαυστο), για την καταστροφή και την ασφαλή απόρριψη των μολυσματικών υλικών και για την ασφαλή ανάκτηση των χρησιμοποιημένων σκευών

Τα θρεπτικά μέσα καλλιέργειας, τα οποία προετοιμάστηκαν βάσει των οδηγιών που παρέχονται από τους κατασκευαστές τους, έχουν ως ακολούθως:

- Υγρό μέσο εμπλουτισμού: Αλκαλικό αλατούχο πεπτονούχο ύδωρ (Alkaline Saline Peptone Water, ASPW)
- Στερεά εκλεκτικά μέσα απομόνωσης: 1) Thiosulphate Citrate Bile and Sucrose (TCBS) agar και 2) Sodium Dodecyl Sulphate (SDS) agar
- Στερεό θρεπτικό μέσο ανακαλλιέργειας (για την παραγωγή “καθαρών” αποικιών): Saline Nutrient Agar (SNA)

Ακόμη, παρασκευάστηκαν βιοχημικά υποστρώματα για την δοκιμή της οξειδάσης, για την δοκιμή ανάπτυξης στο Triple Sugar Iron (TSI) agar, για την ανίχνευση των ornithine decarboxylase (ODC), lysine decarboxylase (LDC) και arginine dihydrolase (ADH), για την ανίχνευση της β-γαλακτοσιδάσης (ONPG), για την δοκιμή της ινδόλης (IND) και τέλος για την δοκιμή ανάπτυξης σε αλατούχα θρεπτικά υδατικά διαλύματα πεπτόνης.

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε βρίσκεται σε συμφωνία με την πρότυπη μέθοδο που καθορίζεται από την διεθνή σταθερά ISO/TS 21872 (εικόνα 4.1), η οποία αφορά στην οριζόντια αναζήτηση στα τρόφιμα των παθογόνων ειδών *Vibrio cholerae* και *Vibrio parahaemolyticus* (Part 1) καθώς και των δυνητικώς εντεροπαθογόνων ειδών *Vibrio fluvialis*, *Vibrio mimicus* και *Vibrio vulnificus* (Part 2). Δευτερευόντως είναι δυνατό να συναπομονωθούν βακτήρια που ανήκουν σε άλλα είδη του γένους *Vibrio* spp, παθογόνα ή μη.



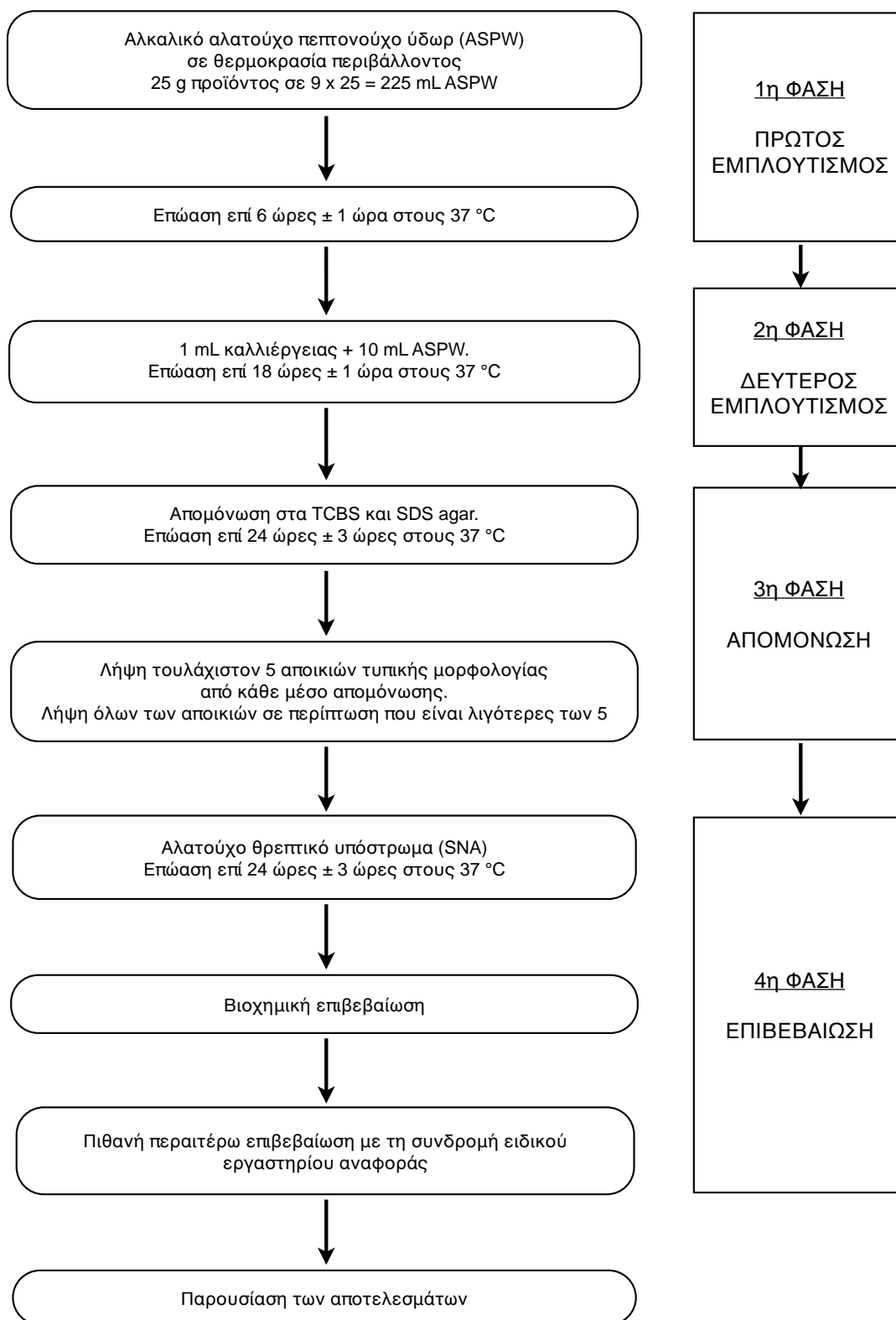
Εικόνα 4.1: Η πρότυπη μέθοδος ISO/TS 21872, Parts 1 & 2, που αφορά στην αναζήτηση των παθογόνων βακτηρίων του γένους *Vibrio* spp. στα τρόφιμα. Πηγή: International Standards Organization (ISO).

Η αναζήτηση του *Vibrio* spp. προϋποθέτει την συλλογή και την προετοιμασία των δειγμάτων, ενώ το κυρίως μέρος της απαιτεί τέσσερις διαδοχικές φάσεις, οι οποίες αναφορικά είναι οι ακόλουθες:

1. Πρώτος εμπλουτισμός σε υγρό εκλεκτικό υπόστρωμα
2. Δεύτερος εμπλουτισμός σε υγρό εκλεκτικό υπόστρωμα
3. Απομόνωση και ταυτοποίηση
4. Επιβεβαίωση

Οι φάσεις αυτές περιγράφονται συνοπτικά στο διάγραμμα ροής που ακολουθεί και αναλύονται διεξοδικά στην οικεία ενότητα του κειμένου που ακολουθεί.

Γράφημα 4.1: Διάγραμμα ροής της κατά ISO 21872 μεθόδου για την αναζήτηση του *Vibrio* spp.



4.2.Δειγματοληψία

Τα δείγματα (ζωντανά μεσογειακά μύδια του είδους *Mytilus galloprovincialis*) συλλέγονταν, ανά τακτά χρονικά διαστήματα, από τον Αύγουστο έως τον Σεπτέμβριο του 2011, με αντιπροσωπευτικό τρόπο, από το αρμόδιο προσωπικό της Διεύθυνσης Κτηνιατρικής του Νομού Πιερίας και αποστέλλονταν στη Θεσσαλονίκη, σε κατάλληλη υδατοστεγή συσκευασία, την ίδια μέρα που πραγματοποιείτο η δειγματοληψία. Οι εγκαταστάσεις εκτροφής μυδιών, από τις οποίες προήλθαν τα δείγματα, ανήκουν στις περιοχές (ζώνες αλίευσης) Αθερίδα, Κίτρος (Αλυκές), Μακρύγιαλος και Μεθώνη του Ν. Πιερίας.

4.3.Προετοιμασία του δείγματος

Απόλυτη σημασία για την ορθότητα των αποτελεσμάτων της ανίχνευσης κατέχει η σωστή προκατεργασία των μυδιών. Στην παρούσα περίπτωση ακολουθήθηκαν οι οδηγίες που περιλαμβάνονται στο εγχειρίδιο "*Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 4th Edition, 2001*" της συγγραφέως Frances Pouches Downes, εκδοθέν υπό του American Public Health Association, οι οποίες έχουν ως εξής:

Τα μύδια παραλαμβάνονται συσκευασμένα σε θερμοκρασία συντήρησης, εντός 24ώρου από την αλίευση τους. 24 ώρες είναι ο μέγιστος επιτρεπόμενος χρόνος που μεσολαβεί από την συλλογή έως την παραλαβή στο Εργαστήριο, η περαιτέρω καθυστέρηση οδηγεί σε αλλοιώσεις του δείγματος που επηρεάζουν αρνητικά την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων - στη δική μας περίπτωση μεσολαβούσαν, κατά μέσο όρο, 18 ώρες. Ακολουθώς πλένονται εξωτερικά, κάτω από συνεχή ροή τρεχούμενου νερού (εικόνες 4.2 και 4.3) με τη βοήθεια σκληρής πλαστικής βούρτσας, ώστε να απομακρυνθούν τυχόν προσκολλημένα ξένα σώματα (όστρακα, πλαγκτόν, φύκη) καθώς και υπολείμματα άμμου.



Εικόνα 4.2 (αριστερά): Μύδια *Mytilus galloprovincialis* αμέσως μετά την παραλαβή τους. Ακολουθεί σχολαστικό πλύσιμο της εξωτερικής επιφάνειάς τους, ώστε να εξασφαλισθεί η κατά το δυνατό άσηπτη λήψη του περιεχομένου τους, στην αμέσως επόμενη φάση.

Εικόνα 4.3 (δεξιά): Κοντινό πλάνο σε μύδι, στην επιφάνεια του οστράκου διακρίνονται προσκολλημένα ξένα σώματα. Ακόμη διακρίνεται προς τα πάνω, κατά μήκος της ακμής του οστράκου, ο βύσσος, μια θυσανοειδής αποφυάδα.

Πηγή: Εργ. Υγιεινής Τροφίμων, Κτηνιατρική Σχολή ΑΠΘ.

Με αυτό τον τρόπο εξασφαλίζεται η κατά το δυνατόν άσηπτη διάνοιξη του κελύφους των μυδιών, στο αμέσως επόμενο στάδιο, ώστε να ληφθούν η σάρκα και το ενδοθυρικό υγρό χωρίς επιμολύνσεις. Καλό είναι ο χειριστής προκαταβολικά να πλύνει σχολαστικά τα χέρια του με σαπούνι και νερό και, αφού τα στεγνώσει, να φορέσει γάντια μιας χρήσεως. Έτσι ο ίδιος αποφεύγει πιθανή μόλυνση από τους παρόντες στο δείγμα μικροοργανισμούς. Αφού τα μύδια στραγγίσουν, ο βύσσος, μια χαρακτηριστική θυσανοειδής αποφυάδα που κάθε μύδι διαθέτει, έλκεται μέχρι να αποσπαστεί από το σώμα του οστράκου. Στο σημείο αποκόλλησης του βύσσου εγκαταλείπεται σχισμή στην οποία εισάγεται το εργαλείο επιλογής του χειριστή (ένα μαχαίρι κουζίνας με σκληρή λάμα και μυτερή άκρη εξυπηρετεί

άριστα). Με κινήσεις μοχλού το κέλυφος ανοίγει και αποκαλύπτεται η εσωτερική δομή του μυδιού. Πρωτίστως λαμβάνεται το υγρό (κυρίως θαλασσινό νερό, από πλευράς σύστασης) με ελεύθερη ροή και στη συνέχεια με λαβίδα ιστών αποκολλάται ο μανδύας (σάρκα) από την εσωτερική επιφάνεια του οστράκου. Σε αυτό το στάδιο απαιτείται ιδιαίτερη προσοχή από πλευράς του χειριστή, καθώς, λόγω της μεγάλης δύναμης που απαιτείται για την αποκόλληση της σάρκας από το όστρακο, υπάρχει κίνδυνος τραυματισμού των χεριών. Επίσης θα πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα ώστε τυχόν θραύσματα του κελύφους να μην συμπεριληφθούν, από λάθος, στο δείγμα.

4.4.Συγκέντρωση του δείγματος και δημιουργία εναιωρήματος

Το περιεχόμενο του οστράκου τοποθετείται σε προζυγισμένη στείρα σακούλα τύπου Stomacher® των 400 ml. Η ίδια διαδικασία επαναλαμβάνεται για περισσότερα μύδια, ώσπου να συγκεντρωθεί ποσότητα ίση με 25 g, η οποία, βάσει της πρότυπης μεθόδου, αντιστοιχεί σε ένα (1) δείγμα. Συνήθως 3-4 άτομα (μύδια) μεσαίου μεγέθους επαρκούν για κάθε ένα δείγμα.

Στη συνέχεια, στον περιέκτη (σακούλα) με το δείγμα προστίθεται ποσότητα αλκαλικού αλατούχου πεπτονούχου ύδατος (ASPW), εννεαπλάσια του βάρους του δείγματος, ήτοι 225 ml (εικόνα 4.4). Το ASPW, που εξυπηρετεί ως θρεπτικό υπόστρωμα διασποράς του δείγματος, έχει αλκαλική αντίδραση (pH = 8,6) και περιεκτικότητα σε NaCl 2%, παράμετροι που ευνοούν εκλεκτικά την ανάπτυξη των μικροβίων του γένους *Vibrio*. Η θερμοκρασία του υγρού, αμέσως πριν από την χρήση του, ιδανικά θα πρέπει να είναι γύρω στους 37 °C.



Εικόνα 4.4: Το δείγμα τοποθετήθηκε, μαζί με την απαιτούμενη ποσότητα του υγρού αραιωτικού μέσου ASPW, σε στείρα πλαστική σακούλα Stomacher®, προς ομογενοποίηση.

Πηγή: Εργ. Υγιεινής Τροφίμων, Κτηνιατρική Σχολή ΑΠΘ.

4.5.Πρώτος εκλεκτικός εμπλουτισμός

Το δείγμα (25 g σάρκας και ενδοθυρικού υγρού + 225 ml ASPW), που βρίσκεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, ομοιογενοποιείται επί 2' στη συσκευή Stomacher® (εικόνες 4.5 και 4.6) και ακολούθως το εναιώρημα τοποθετείται προς επώαση σε κλίβανο θερμοκρασίας 37 °C επί 6 ± 1 ώρες.



Εικόνες 4.5 & 4.6: Ομογενοποίηση του δείγματος επί 120 sec με τη βοήθεια της συσκευής Stomacher®.
Πηγή: Εργ. Υγιεινής Τροφίμων, Κτηνιατρική Σχολή ΑΠΘ.

4.6.Δεύτερος εκλεκτικός εμπλουτισμός

Από την προηγούμενη καλλιέργεια και συγκεκριμένα από την επιφάνεια της αναρροφάται, με αυτόματη πιπέτα των 1000 μl, ποσότητα 1 ml (εικόνα 4.7) η οποία ενοφθαλμίζεται σε δοκιμαστικό σωλήνα που περιέχει 10 ml του αρχικού υγρού μέσου εμπλουτισμού (ASPW). Ακολουθεί επώαση στους 37 °C επί 18 ± 1 ώρες.

Το δεύτερο στάδιο εμπλουτισμού είναι απαραίτητο, προκειμένου να καταστεί δυνατή η ανίχνευση των βακτηρίων-στόχων. Αυτό ισχύει καθώς στο πρώτο εναιώρημα (καθώς

βέβαια και στο αρχικό δείγμα) ο αριθμός τους (ειδικότερα των *V. parahaemolyticus* και *V. cholerae*) συχνά είναι ελάχιστος, ενώ αντίθετα άλλοι μικροοργανισμοί της οικογένειας των *Vibrionaceae* (π.χ. *Photobacterium* spp.) ή βακτήρια άλλων οικογενειών ενδέχεται να είναι παρόντα σε σημαντικά μεγαλύτερες συγκεντρώσεις, προκαλώντας παρεμποδίσεις της τεχνικής αναζήτησης.



Εικόνα 4.7: 2ο στάδιο εκλεκτικού εμπλουτισμού. Από το εναιώρημα του 1ου σταδίου (αριστερά) λαμβάνεται άσηπτα, με τη βοήθεια αυτόματης πιπέτας των 1000 μl, ποσότητα καλλιέργειας 1 ml η οποία τοποθετείται σε δοκιμαστικό σωλήνα (κέντρο) που περιέχει το ίδιο θρεπτικό υγρό ASPW, για να ακολουθήσει η επώαση. Πηγή: Εργ. Υγιεινής Τροφίμων, Κτηνιατρική Σχολή ΑΠΘ.

4.7.Απομόνωση και ταυτοποίηση

Από την υγρή καλλιέργεια που αναπτύχθηκε στην δεύτερη φάση του εμπλουτισμού λαμβάνεται, με τη βοήθεια μικροβιολογικού κρίκου, ποσότητα με την οποία ενοφθαλμίζεται

η επιφάνεια του πρώτου εκλεκτικού στερεού υποστρώματος απομόνωσης, του TCBS (Thiosulfate Citrate Bile-salts Sucrose) agar. Με αντίστοιχο τρόπο ενοφθαλμίζεται και το δεύτερο θρεπτικό υπόστρωμα, το SDS (Sodium Dodecyl Sulphate) agar (εικόνα 4.8).



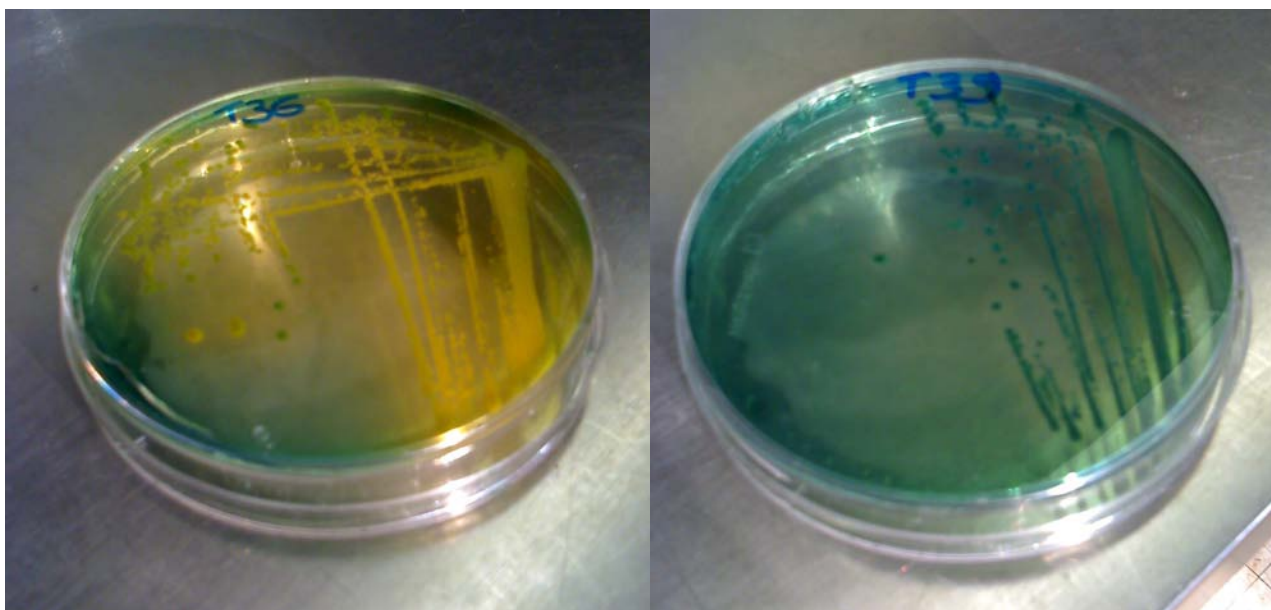
Εικόνα 4.8: Ενοφθαλμισμός των SDS (αριστερά) και TCBS (δεξιά) agar με υλικό από την εμπλουτισμένη υγρή καλλιέργεια (κέντρο), με σκοπό την λήψη απομονωμένων αποικιών.

Πηγή: Εργ. Υγιεινής Τροφίμων, Κτηνιατρική Σχολή ΑΠΘ.

Τα τρυβλία Petri με τα ενοφθαλμισμένα υποστρώματα τοποθετούνται ανεστραμμένα σε επωαστικό κλίβανο, στους 37 °C επί 24 ± 3 ώρες και μετά την επώαση εξετάζονται ως προς την παρουσία τυπικών αποικιών από παθογόνα στελέχη του *Vibrio* spp.

Σε ότι αφορά το υπόστρωμα TCBS (εικόνες 4.9 και 4.10) απαντώνται δύο τυπικές μορφές αποικιών:

- Οι τυπικές αποικίες των *V. mimicus* και *V. vulnificus* είναι λείες, πράσινες (σακχαρόζη αρνητικές) και με διάμετρο 2-3 mm.
- Οι τυπικές αποικίες του *V. fluvialis* είναι λείες, κίτρινες (σακχαρόζη θετικές) και με διάμετρο 2-3 mm. Τα *V. parahaemolyticus* και *V. cholerae* σχηματίζουν πράσινες και κίτρινες αποικίες αντίστοιχα.



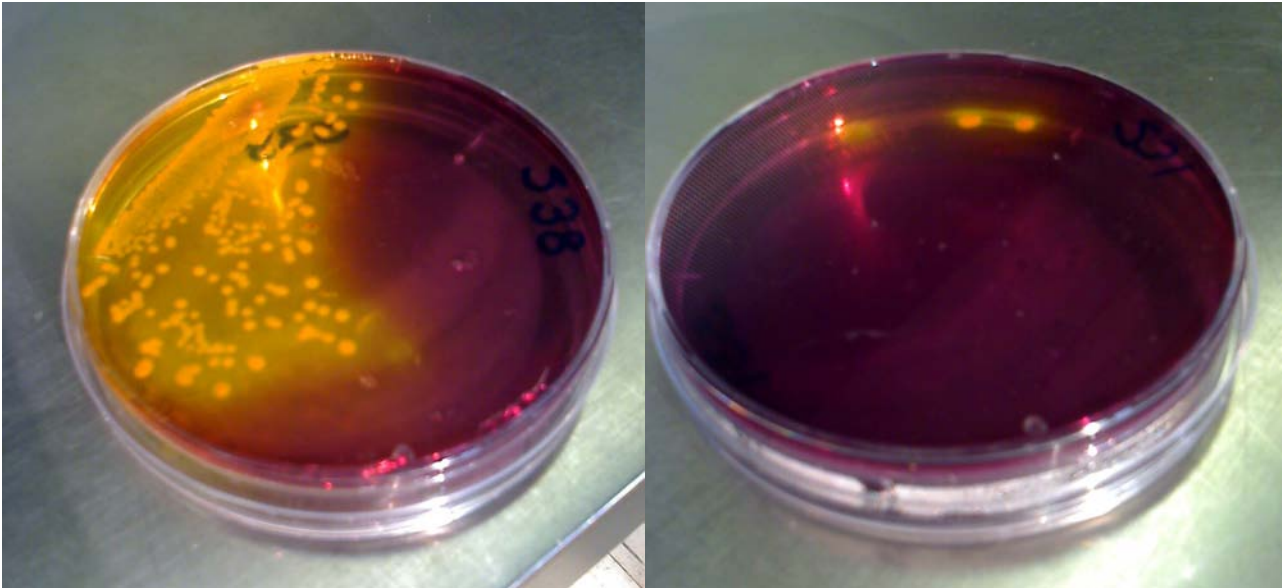
Εικόνες 4.9 & 4.10: TCBS agar, κίτρινες και πράσινες αποικίες (αριστερά), αμιγώς πράσινες αποικίες (δεξιά).

Πηγή: Εργ. Υγιεινής Τροφίμων, Κτηνιατρική Σχολή ΑΠΘ.

Στο υπόστρωμα SDS (εικόνες 4.11 και 4.12) σχηματίζονται οι εξής αποικίες:

- Οι τυπικές αποικίες των *V. mimicus* και *V. vulnificus* είναι ιώδεις, έχουν διάμετρο ≥ 2 mm με αδιαφανή άλω.
- Οι τυπικές αποικίες του *V. cholerae* στέλεχος O1 είναι κίτρινες, έχουν διάμετρο ≥ 2 mm με αδιαφανή άλω ενώ αυτές των υπολοίπων στελεχών του *V. cholerae* εμφανίζουν προαιρετικά αδιαφανή άλω.

Άλλα είδη του *Vibrio* spp. είτε δεν αναπτύσσονται στο SDS agar είτε, εφόσον αναπτυχθούν, σχηματίζουν αποικίες δίχως άλω.



Εικόνες 4.11 & 4.12: SDS agar, κίτρινες αποικίες. Πηγή: Εργ. Υγιεινής Τροφίμων, Κτηνιατρική Σχολή ΑΠΘ.

4.8.Αποτελέσματα της απομόνωσης

Η προαναφερθείσα διαδικασία ακολουθήθηκε για το σύνολο των 50 δειγμάτων που συγκεντρώθηκαν στο χρονικό πλαίσιο Ιανουάριος-Δεκέμβριος 2011. Στον παρακάτω πίνακα παρατίθενται συνοπτικά τα στοιχεία που συλλέχθηκαν από τις δοκιμές απομόνωσης του *Vibrio* spp. στα μύδια:

Πίνακας 4.1: Αποτελέσματα της απομόνωσης του *Vibrio* spp.

Ημερομηνία δειγματοληψίας	Αριθμός δείγματος	Ανάπτυξη αποικιών				Παρατηρήσεις
		TCBS		SDS		
23/08/2011	# 1-2 (2)	✓	✓	✓	✓	--
30/08/2011	# 3-5 (3)	✓	✓	✓	✓	--
06/09/2011	# 6-11 (6)	✓	✓	✓	✓	--
04/10/2011	# 12-17 (6)	✓	✓	✓	✓	ασθενέστερη ανάπτυξη απ' ότι συνήθως σε TCBS/SDS
11/10/2011	# 18-23 (6)	✓	✓	✓	✓	ασθενέστερη ανάπτυξη απ' ότι συνήθως σε TCBS/SDS # 20, 22 χωρίς ανάπτυξη στο SDS
31/10/2011	# 24-30 (7)	✓	✓	✓	✓	--

Ημερομηνία δειγματοληψίας	Αριθμός δείγματος	Ανάπτυξη αποικιών				Παρατηρήσεις
		TCBS		SDS		
29/11/2011	# 31-40 (10)	✓	✓	✓	✓	τα περισσότερα δείγματα χωρίς ανάπτυξη στο SDS
13/12/2011	# 41-50 (10)	✓	✓	✓	✓	τα περισσότερα δείγματα χωρίς ανάπτυξη στο SDS

Σημείωση: Το σύμβολο “✓” δηλώνει ανάπτυξη αποικιών στο σχετικό υπόστρωμα απομόνωσης. Το χρώμα του συμβόλου αντιστοιχεί στο χρώμα των αποικιών που σχηματίστηκαν.

Παρατηρήθηκε σταθερά η εμφάνιση θετικών αποτελεσμάτων (ανάπτυξη μικροοργανισμών στα εκλεκτικά υποστρώματα TCBS και SDS), στην πλειοψηφία των δειγμάτων κάθε παρτίδας μυδιών που ελέγχθηκε, στη διάρκεια της χρονικής περιόδου Αυγούστου-Δεκεμβρίου 2011, κατά την οποία η θερμοκρασία σημείωσε προοδευτική ελάττωση. Υπήρξαν ελάχιστες αποκλίσεις από το πρότυπο αυτό.

Η ανάπτυξη βακτηρίων, με την μορφή μεμονωμένων αποικιών, στα εκλεκτικά υποστρώματα, στην καλύτερη περίπτωση απλώς θέτει υποψία για την παρουσία μικροβίων του γένους *Vibrio* στο δείγμα και δευτερευόντως πληροφορεί “χονδρικά” ως προς τα πιθανά είδη στα οποία αυτά ανήκουν. Στην επόμενη φάση, η οποία περιλαμβάνει την υποβολή σε βιοχημικό έλεγχο των μικροβίων που ελήφθησαν από απομονωμένες αποικίες στα υποστρώματα TCBS και SDS, αναμένεται να ξεκαθαρίσει περισσότερο η εικόνα των ανιχνευθέντων βακτηρίων, ως προς την ταυτότητα τους (σε επίπεδο είδους).

Για τον σκοπό αυτό, υλικό από τις μεμονωμένες αποικίες που αναπτύχθηκαν από κάθε δείγμα, στα υποστρώματα TCBS και SDS, καλλιεργήθηκε σε εκλεκτικό, για *Vibrio*, στερεό θρεπτικό υπόστρωμα ανάπτυξης SNA (Saline Nutrient Agar). Η τεχνική που εφαρμόστηκε έχει ως εξής:

Αρχικά λαμβάνονται, με μικροβιολογικό κρίκο, από κάθε εκλεκτικό μέσο (TCBS και SDS) τουλάχιστον δύο μεμονωμένες αποικίες, με τυπική μορφολογία παθογόνων

στελεχών *Vibrio* (όπως αυτή περιγράφηκε παραπάνω), κατά προτίμηση διαφορετικού, μεταξύ τους, τύπου. (όσες περισσότερες αποικίες από κάθε τρυβλίο ληφθούν, τόσο αυξάνει η πιθανότητα να ανιχνευθούν τα παθογόνα στελέχη, καθώς στα εκλεκτικά υποστρώματα δύναται να αναπτυχθούν και απαθογόνα είδη *Vibrio*).

Οι επιλεγμένες αποικίες ενοφθαλμίζονται στην επιφάνεια τρυβλίων που περιέχουν το στερεό θρεπτικό υπόστρωμα ανάπτυξης SNA (Saline Nutrient Agar), ώστε να παραχθούν σε μεγάλη ποσότητα “καθαρές” αποικίες, προερχόμενες δηλαδή από το ίδιο είδος μικροβίου (εικόνα 4.13). Η επώαση γίνεται στους 37 °C επί 24 ± 3 ώρες.



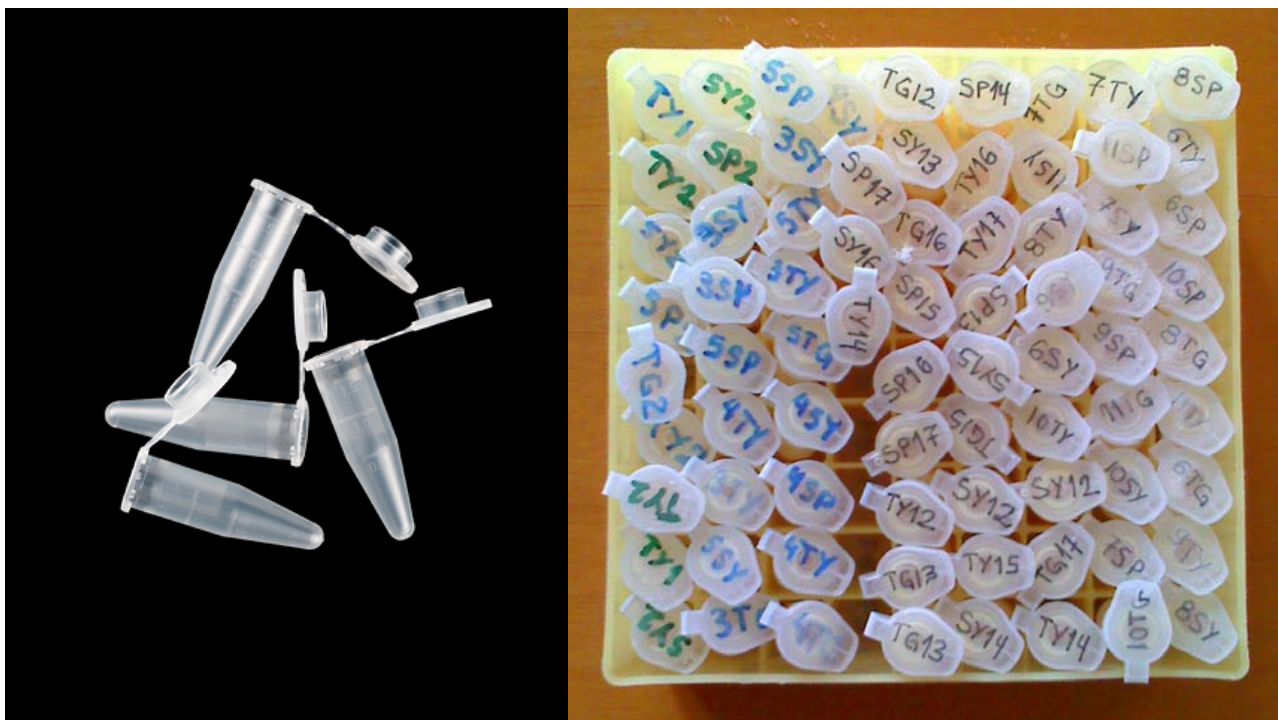
Εικόνα 4.13: Ανακαλλιέργεια υλικού από μεμονωμένες αποικίες των υποστρωμάτων TCBS και SDS (δεξιά) σε SNA (αριστερά), με στόχο την λήψη “καθαρών” αποικιών.

Πηγή: Εργ. Υγιεινής Τροφίμων, Κτηνιατρική Σχολή ΑΠΘ.

Το καθένα από τα τρυβλία petri SNA έλαβε έναν μοναδικό κωδικό, ανάλογα με την προέλευση της καλλιέργειας που περιείχε. Ο κάθε κωδικός αποτελείται από τρία στοιχεία, έναν αριθμό και δύο γράμματα. Ο αριθμός αντιστοιχεί στον αριθμό του δείγματος από το οποίο έγινε η απομόνωση. Το πρώτο γράμμα δηλώνει το είδος του θρεπτικού

υποστρώματος που χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση, δηλαδή “S” για το SDS και “T” για το TCBS και το δεύτερο γράμμα συμβολίζει το χρώμα της απομονωμένης αποικίας από την οποία ελήφθη υλικό, δηλαδή “G” για πράσινο (green) “P” για μοβ (purple) και “Y” για κίτρινο (yellow). Π.χ. 15TY σημαίνει ότι η καλλιέργεια προήλθε από το δείγμα #15, από μεμονωμένη αποικία κίτρινου χρώματος (Y) στο υπόστρωμα απομόνωσης TCBS (T).

Στο σύνολο τους οι καθαρές καλλιέργειες που προέκυψαν από τα 50 δείγματα είναι 117. Η κάθε νέα ομοιογενής καλλιέργεια (περιλαμβάνει μικρόβια ενός αποκλειστικά είδους) τοποθετήθηκε σε φιαλίδια Eppendorf® (εικόνες 4.14 και 4.15) που περιέχουν από 0,5 ml SN (Saline Nutrient) broth (ζωμό) με γλυκερόλη (κρυσταλλοπροστατευτική ουσία) και καταψύχθηκε στους -80 °C, σε αναμονή της βιοχημικής επιβεβαίωσης των αποτελεσμάτων της απομόνωσης, στο στάδιο που περιγράφεται παρακάτω.



Εικόνα 4.14 (αριστερά): Κενά φιαλίδια Eppendorf® χωρητικότητας 1,5 ml.

Εικόνα 4.15 (δεξιά): Κασετίνα με φιαλίδια Eppendorf® καθένα από τα οποία περιέχει “καθαρή” καλλιέργεια, προερχόμενη από μία μονήρη αποικία των υποστρωμάτων απομόνωσης. Διακρίνονται οι κωδικοί που περιγράφουν την προέλευση του υλικού. Φυλάσσεται σε θερμοκρασία - 80 °C.

Πηγή: Εργ. Υγιεινής Τροφίμων, Κτηνιατρική Σχολή ΑΠΘ.

4.9.Βιοχημική ταυτοποίηση

Η βιοχημική επιβεβαίωση συμπληρώνει την απομόνωση/ταυτοποίηση και υποβοηθά την καθοριστική ανίχνευση των *Vibrio* spp. σε επίπεδο είδους. Στηρίζεται στις διαφορές τις οποίες παρουσιάζουν μεταξύ τους, ως προς τις βιοχημικές ιδιότητες τους, τα διαφορετικά είδη του μικροβίου.

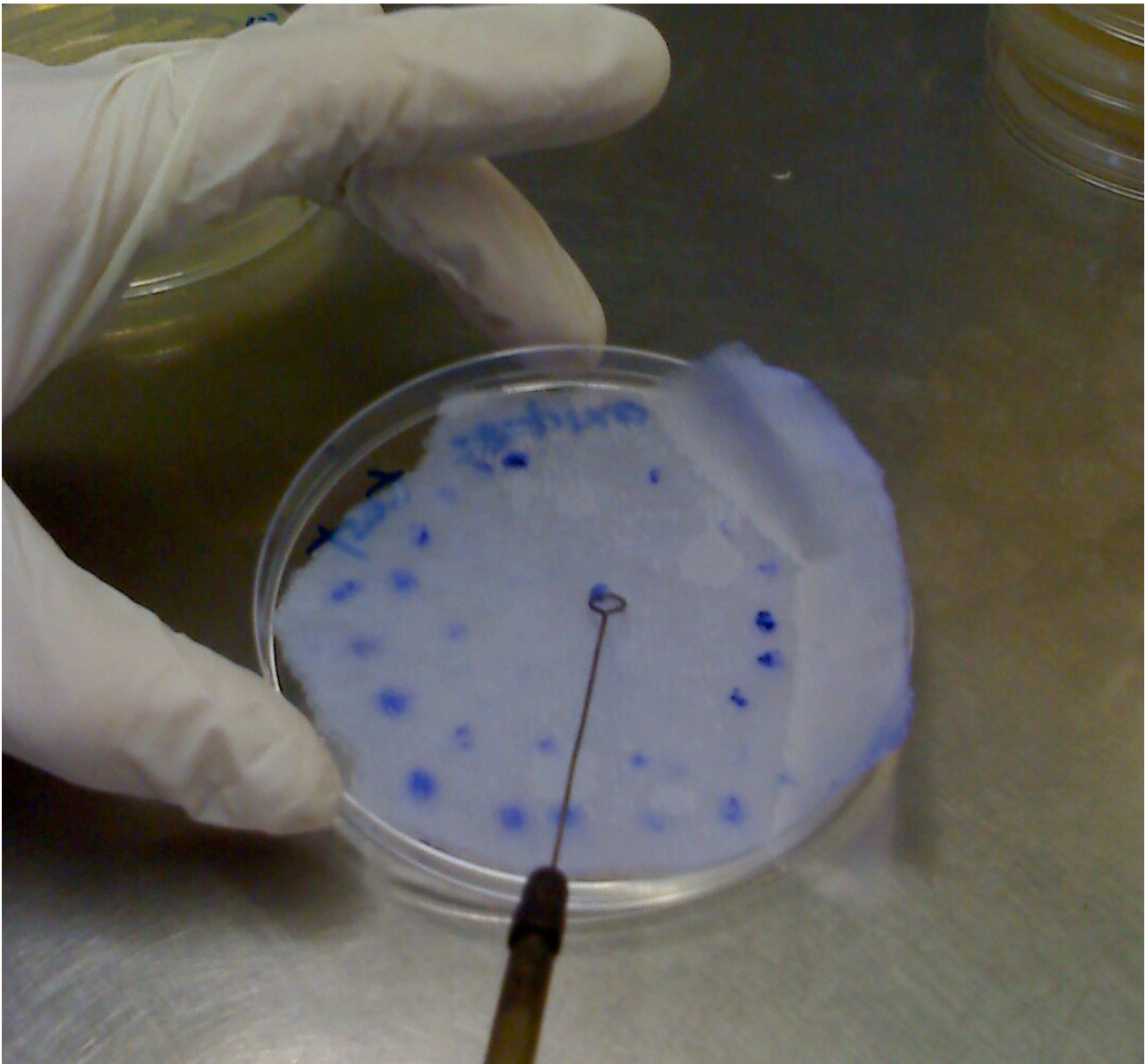
Από τις 117 καθαρές καλλιέργειες που συγκεντρώθηκαν και παρέμειναν στην κρουσυντήρηση έγινε ανασύσταση σε θρεπτικό υπόστρωμα SNA κατόπιν ενοφθαλμισμού και επώασης στους 37 °C επί 24 ± 3 ώρες. Αυτή η διαδικασία ενεργοποιεί τα βακτήρια των καλλιεργειών που βρίσκονται σε αδράνεια, λόγω χαμηλής θερμοκρασίας. Στη συνέχεια έγινε λήψη υλικού από τις ανασυσταθείσες καλλιέργειες, μία προς μία, ώστε να ενοφθαλμιστούν οι βιοχημικές σειρές.

4.9.1.Προκαταρκτικές δοκιμές

Για την βιοχημική ταυτοποίηση χρησιμοποιούνται από τις καθαρές αποικίες του SNA μόνο αυτές που αφενός είναι θετικές στη δοκιμή της οξειδάσης, αφετέρου αυτές των οποίων τα βακτήρια, κατά την μικροσκόπηση, παρουσιάζουν κίνηση.

4.9.1.1.Δοκιμή της οξειδάσης

Με πλαστικό μικροβιολογικό κρίκο μίας χρήσεως λαμβάνεται ποσότητα από την καλλιέργεια στο SNA και απλώνεται με τη μορφή γραμμών ή κουκκίδων σε διηθητικό χαρτί εμποτισμένο με αντιδραστήριο οξειδάσης (υδατικό διάλυμα N, N, N', N'-Tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride 1%). Η δοκιμή θεωρείται ότι έχει θετικό αποτέλεσμα όταν το χαρτί λάβει ιώδες, βιολετί ή μοβ χρώμα, εντός δέκα δευτερολέπτων (εικόνα 4.17).



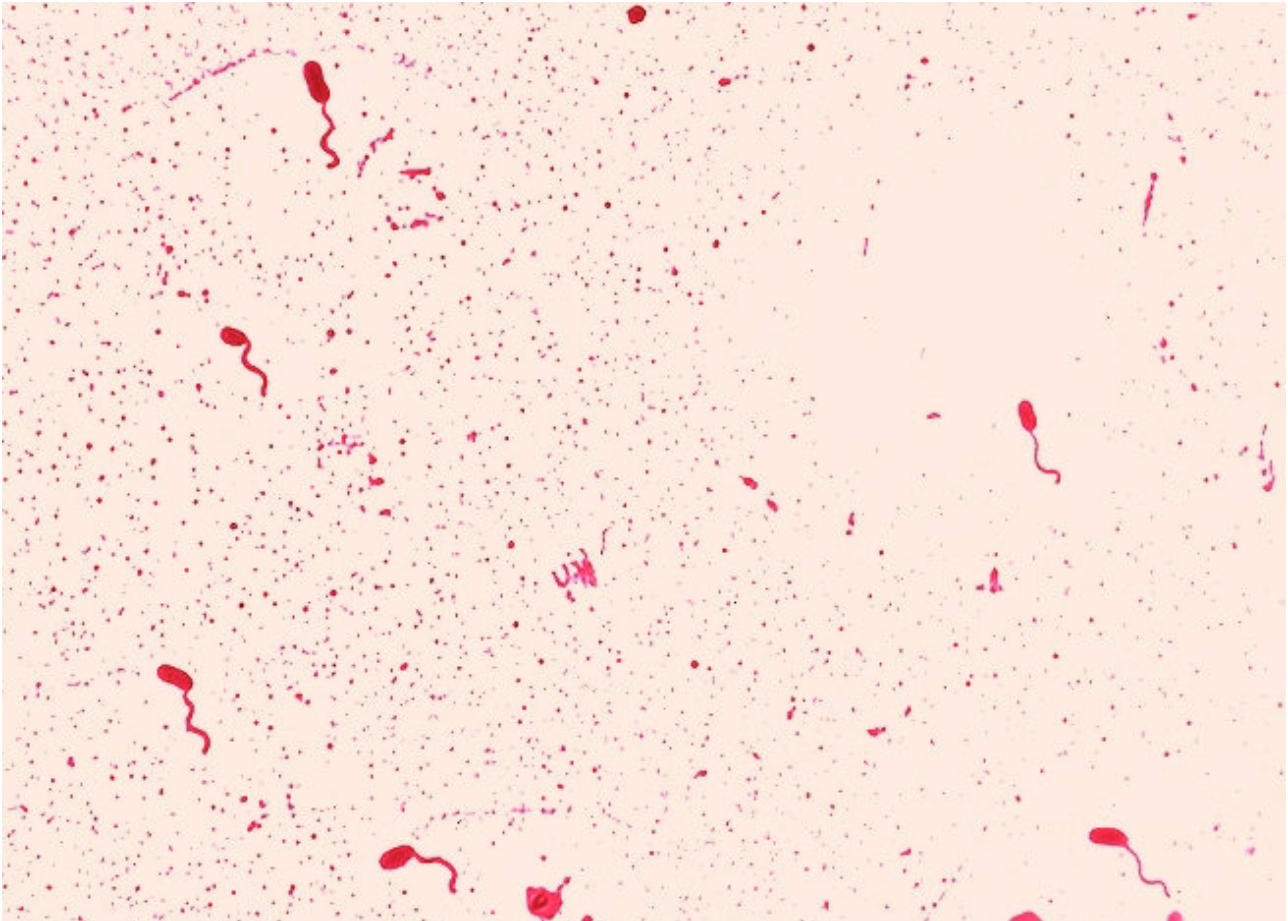
Εικόνα 4.17: Δοκιμή της οξειδάσης, το ιώδες χρώμα αντιστοιχεί σε οξειδάση θετικούς μικροοργανισμούς, όπως είναι τα περισσότερα είδη του *Vibrio* spp. Πηγή: Εργ. Υγιεινής Τροφίμων, Κτηνιατρική Σχολή ΑΠΘ.

4.9.1.2.Μικροσκοπική εξέταση

Για την μικροσκόπηση λαμβάνεται υλικό από απομονωμένες αποικίες του TCBS/ SDS agar, με τη βοήθεια του κρίκου, και στη συνέχεια απλώνεται πάνω σε αντικειμενοφόρο πλάκα, στο κέντρο της οποίας έχει προστεθεί μια σταγόνα φυσιολογικού ορού. Το υλικό διασπείρεται ομ αλά, ώστε να διαλυθούν τα συσσωματώματα, το παρασκεύασμα βάφεται με χρώση κατά Gram (για πληροφορίες ως προς την τεχνική βλ.

ISO 7218) και, αφού προστεθεί σε αυτό καλυπτρίδα, μελετάται σε αρχική μεγέθυνση 10x και αργότερα σε μεγαλύτερη (εικόνα 4.18).

Ένας δεύτερος τρόπος περιλαμβάνει τον ενοφθαλισμό υλικού από τα TCBS/SDS agar στο ASPW, την επώαση για 1-6 ώρες στους 37 °C και την άμεση μικροσκόπηση.

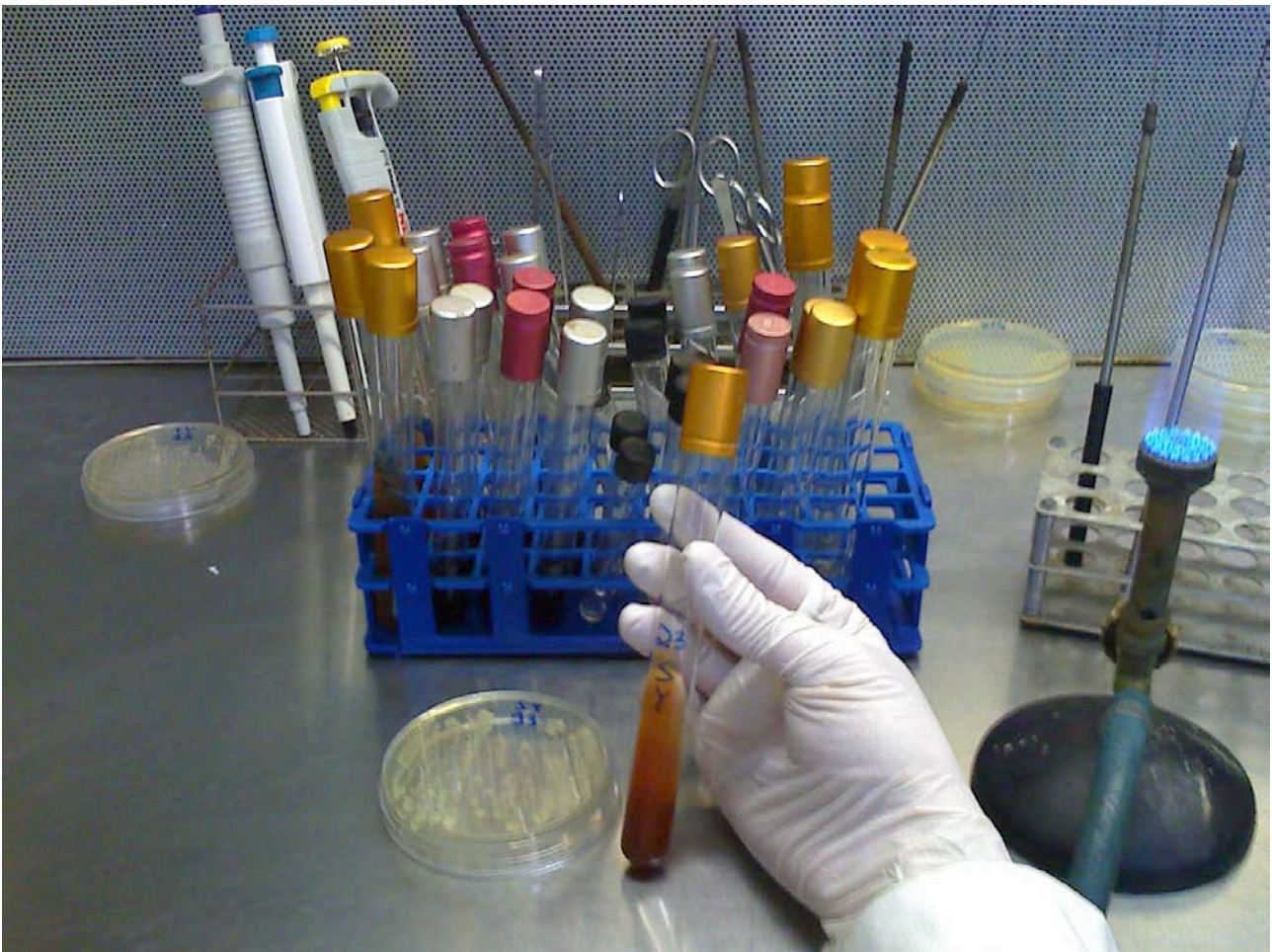


Εικόνα 4.18: Βακτηριακά σωματίδια *Vibrio* spp. στο οπτικό μικροσκόπιο. Διακρίνονται καθαρά τόσο το σώμα όσο και το μαστίγιο του βακτηρίου. Πηγή: Εικόνες google.

Η μορφολογία των *Vibrios* είναι χαρακτηριστική. Στο οπτικό πεδίο διακρίνονται μικροοργανισμοί που θυμίζουν κεκαμμένες ράβδους και στην πλειοψηφία τους χαρακτηρίζονται από ενεργητική συνεχή κίνηση πρόωσης (διαφορετική από την τρομώδη ή παθητική κίνηση Brown). Το πολικό μαστίγιο επίσης είναι ορατό.

4.9.2.Βιοχημικές δοκιμές

Από τις καλλιέργειες στο SNA που έδωσαν θετική την δοκιμή της οξειδάσης και την δοκιμή της κινητότητας, κατά την μικροσκόπηση, λαμβάνεται υλικό με το οποίο ενοφθαλμίζονται ένα προς ένα τα ειδικά υποστρώματα που απαρτίζουν τις βιοχημικές σειρές (εικόνα 4.19).



Εικόνα 4.19: Ενοφθαλμισμός υλικού από “καθαρή” καλλιέργεια (τρυβλίο petri με SNA) στο TSI agar, το πρώτο αντιδραστήριο της βιοχημικής σειράς. Πηγή: Εργ. Υγιεινής Τροφίμων, Κτηνιατρική Σχολή ΑΠΘ.

Οι βιοχημικές δοκιμές που πραγματοποιήθηκαν έχουν ως ακολούθως:

1. Ανάπτυξη στο sTSI (saline Triple Sugar Iron) agar: Οι δοκιμαστικοί σωλήνες που περιέχουν κεκλιμένο υπόστρωμα από sTSI agar δέχονται στο βάθος και κατά μήκος της κεκλιμένης επιφάνειας του υποστρώματος ενοφθαλμισμό, ενώ ακολουθεί

επώαση στους 37 °C επί 24 ± 3 ώρες. Οι παρατηρούμενες αλλαγές ερμηνεύονται ως εξής:

- Για τον βυθό του θρεπτικού μέσου:
Κίτρινο: Γλυκόζη θετικά (ζυμούν την γλυκόζη)
Κόκκινο ή χωρίς αλλαγή χρώματος: Γλυκόζη αρνητικά (δε ζυμούν την γλυκόζη)
Μαύρο: Σχηματίζεται σουλφυδρίδιο, λόγω παραγωγής υδροθείου (H₂S)
Σχηματισμός φυσαλίδων ή ρηγμάτων: Σχηματισμός αερίου από την ζύμωση της γλυκόζης.
- Για την κεκλιμένη επιφάνεια του θρεπτικού μέσου:
Κίτρινο: Λακτόζη/σακχαρόζη θετικά (ζύμωση λακτόζης και/ή σακχαρόζης)
Κόκκινο ή χωρίς αλλαγή χρώματος: Λακτόζη και σακχαρόζη αρνητικά (χωρίς ζύμωση λακτόζης ή σακχαρόζης).

Οι τυπικές μεταβολές του *V. vulnificus* αντιστοιχούν σε όξινη (κίτρινη) επιφάνεια και όξινο (κίτρινο) πυθμένα, χωρίς σχηματισμό αερίου ή σουλφυδριδίου (μαύρο ίζημα).

2. Δοκιμή αποκαρβοξυλίωσης της ορνιθίνης, ornithine decarboxylase (ODC): Το υγρό αλατούχο υπόστρωμα ODC ενοφθαλμίζεται ακριβώς κάτω από την επιφάνεια. Προστίθεται κατά προσέγγιση 1 ml αποστειρωμένου παραφινέλαιου πάνω στο υπόστρωμα και ακολουθεί επώαση στους 37 °C επί 24 ± 3 ώρες. Η εγκατάσταση θολερότητας καθώς και η εμφάνιση ιώδους χρώματος, μετά την επώαση μαρτυρούν θετική αντίδραση (βακτηριακή ανάπτυξη και αποκαρβοξυλίωση της ορνιθίνης. Το κίτρινο χρώμα σημαίνει ότι δεν υπάρχει αντίδραση.

3. Δοκιμή αποκαρβοξυλίωσης της L-λυσίνης, L-lysine decarboxylase (LDC): Το υγρό αλατούχο υπόστρωμα LDC ενοφθαλμίζεται ακριβώς κάτω από την επιφάνεια.

Προστίθεται κατά προσέγγιση 1 ml αποστειρωμένου παραφινέλαιου πάνω στο υπόστρωμα και ακολουθεί επώαση στους 37 °C επί 24 ± 3 ώρες. Η εγκατάσταση θολερότητας καθώς και η εμφάνιση ιώδους χρώματος, μετά την επώαση μαρτυρούν θετική αντίδραση (βακτηριακή ανάπτυξη και αποκαρβοξυλίωση της L-lysine. Το κίτρινο χρώμα σημαίνει ότι δεν υπάρχει αντίδραση.

4. Δοκιμή υδρόλυσης της αργινίνης, arginine dehydrolase (ADH): Το υγρό αλατούχο υπόστρωμα ADH ενοφθαλμίζεται ακριβώς κάτω από την επιφάνεια. Προστίθεται κατά προσέγγιση 1 ml αποστειρωμένου παραφινέλαιου πάνω στο υπόστρωμα και ακολουθεί επώαση στους επί 24 ± 3 ώρες. Η εγκατάσταση θολερότητας καθώς και η εμφάνιση ιώδους χρώματος, μετά την επώαση μαρτυρούν θετική αντίδραση (βακτηριακή ανάπτυξη και αφυδροξυλίωση της αργινίνης. Το κίτρινο χρώμα σημαίνει ότι δεν υπάρχει αντίδραση.

5. Δοκιμή παραγωγής β-γαλακτοσιδάσης, β-galactosidase (υδρόλυση ONPG): 0,25 ml αλατούχου υδατικού διαλύματος τοποθετούνται σε δοκιμαστικό σωλήνα και ενοφθαλμίζονται με υλικό από την υπό ανίχνευση αποικία. Προστίθεται 1 ml τολουολίου και το περιεχόμενο αναδεύεται (με τη βοήθεια vortexer). Ο σωλήνας τοποθετείται σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 37 °C όπου και παραμένει επί περίπου 5'. Στη συνέχεια προστίθενται σε αυτόν 0,25 ml του αντιδραστήριου ανίχνευσης της β-galactosidase και το περιεχόμενο αναδεύεται. Ο σωλήνας τοποθετείται εκ νέου στο υδατόλουτρο, όπου και παραμένει για 24 ± 3 ώρες, ενώ επιθεωρείται τακτικά στο μεταξύ για τυχόν αλλαγές. Η εμφάνιση κίτρινου χρώματος συνδέεται με θετική αντίδραση (παρουσία β-γαλακτοσιδάσης) και συχνά η αλλαγή αυτή γίνεται ορατή ήδη από το πρώτο 20λεπτο. Απουσία χρώματος σημαίνει έλλειψη αντίδρασης.

6. Δοκιμή παραγωγής της ινδόλης, indole (IND): 5 ml από το υγρό αλατούχο υπόστρωμα τρυπτόνης-τρυπτοφάνης ενοφθαλμίζονται με υλικό από την υπό ανίχνευση αποικία. Ακολουθεί επώαση στους 37 °C επί 24 ± 3 ώρες και εν συνεχεία προσθήκη 1 ml αντιδραστηρίου Kovacs's. Ο σχηματισμός ερυθρού δακτυλίου είναι δηλωτικός θετικής αντιδράσεως (σχηματισμός ινδόλης). Η εμφάνιση κίτρινου-καφέ δακτυλίου συνηγορεί υπέρ αρνητικής αντίδρασης.

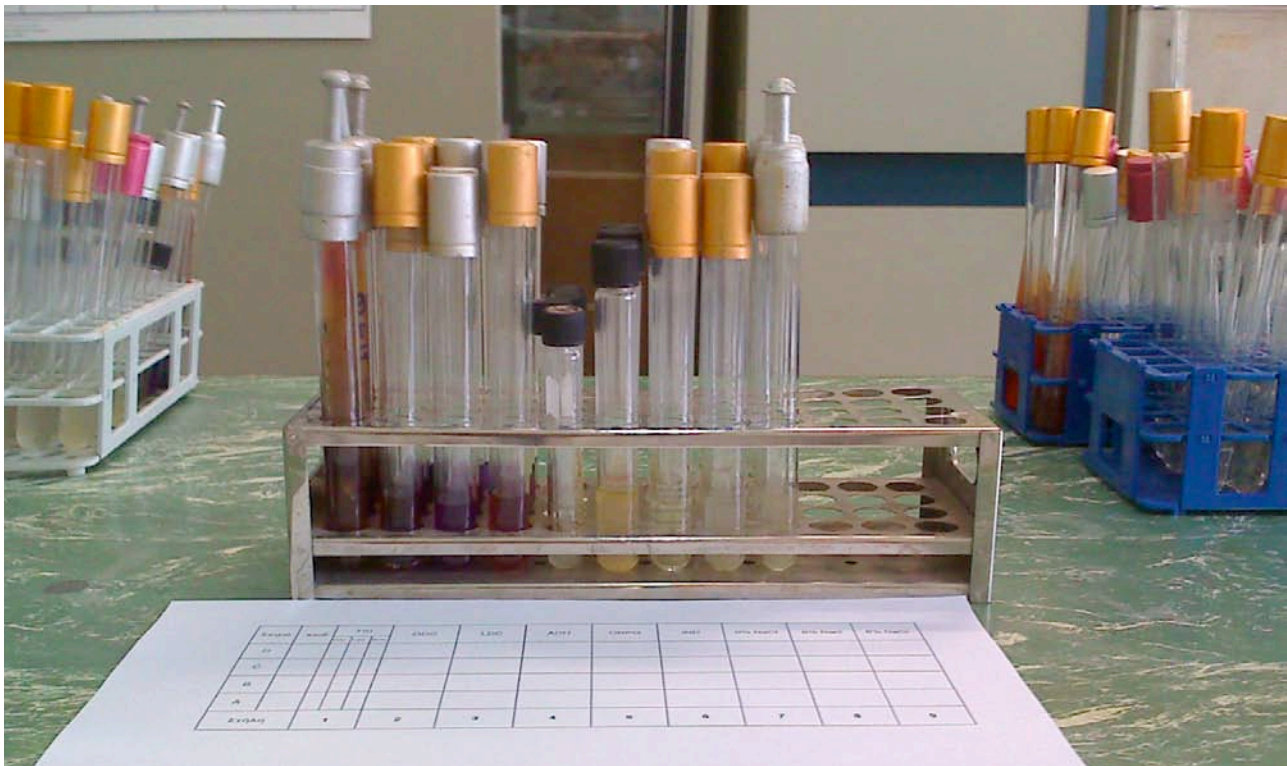
7, 8, & 9. Δοκιμές αλοφιλίας: Προετοιμάζεται μια σειρά από διαλύματα πεπτονούχου ύδατος, αυξανόμενης συγκέντρωσης, ήτοι 0%, 6% και 8%. Οι προς έλεγχο αποικίες ενοφθαλμίζονται σε κάθε ένα από τα αλατούχα διαλύματα και επωάζονται στους 37 °C επί 24 ± 3 ώρες. Η εμφάνιση θολερότητας σημαίνει ότι τα υπό ανίχνευση βακτήρια αναπτύσσονται σε περιβάλλον αλατότητας ίσης με αυτήν του εκάστοτε διαλύματος.

Στο γράφημα 4.2 απεικονίζεται σχηματικά ένα σετ βιοχημικών σειρών σε διάταξη 9x4 (9 διαφορετικά βιοχημικά υποστρώματα x 4 παράλληλες θέσεις A, B, C και D). Σε κάθε κελί σημειώνεται το σύμβολο (+) (προκειμένου για θετική δοκιμή) ή το σύμβολο (-) (προκειμένου για αρνητική δοκιμή). Η αλληλουχία (+) και (-) κατά την οριζόντια έννοια συνθέτει το βιοχημικό προφίλ της υπό δοκιμή καλλιέργειας.

Η ίδια οργάνωση διακρίνεται και στην εικόνα 4.20. Προς διευκόλυνση της καταγραφής των αποτελεσμάτων οι δοκιμαστικοί σωλήνες σημαίνονται με ανεξίτηλο τρόπο.

Γράφημα 4.2: Βιοχημική σειρά 9x4.

Σειρά	κωδ	TSI			ODC	LDC	ADH	ONPG	IND	0% NaCl	6% NaCl	8% NaCl
		Glu (gas)	Lac	Suc								
D												
C												
B												
A												
Στήλη		1			2	3	4	5	6	7	8	9



Εικόνα 4.20: Ενοφθαλισμισμένη βιοχημική σειρά 9x4 (9 στήλες, 1 για κάθε βιοχημικό υπόστρωμα και 4 σειρές, 1 για κάθε δείγμα). Πηγή: Εργ. Υγιεινής Τροφίμων, Κτηνιατρική Σχολή ΑΠΘ.

Στον πίνακα 4.2 που ακολουθεί παρατίθενται, εν είδει οδηγού/κλειδας αναγνώρισης, οι αντιδράσεις τις οποίες αναμένεται να παρουσιάσουν, στις προαναφερθείσες βιοχημικές δοκιμές, τα αναγραφόμενα παθογόνα είδη *Vibrio*. Αντιπαραβάλλοντας το βιοχημικό προφίλ των υπό εξέταση καλλιεργειών της παρούσας έρευνας με τα δεδομένα του πίνακα 4.2, μπορεί κανείς να εξάγει συμπεράσματα για την πιθανή ταυτότητα των μικροβίων που απομονώθηκαν σε προηγούμενο στάδιο.

Πίνακας 4.2: Κλειδα ερμηνείας των βιοχημικών δοκιμών

Είδος μικροβίου	<i>V. cholerae</i>	<i>V. mimicus</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>V. vulnificus</i>	<i>V. fluvialis</i>
Δοκιμή					
Οξειδάση	+	+	+	+	+
Παραγωγή αερίου (ζύμωση γλυκόζης)	-	-	-	-	-
Λακτόζη	-	-	-	+	-
Σακχαρόζη	+	-	-	-	+
ODC	+	+	+	+	-
LDC	+	+	+	+	-
ADH	-	-	-	-	+
Υδρόλυση ONPG	+	+	-	+	+
Παραγωγή ινδόλης	+	+	+	+	*
Αλατότητα 0%	+	+	-	-	-
Αλατότητα 6%	-	-	+	+	+
Αλατότητα 8%	-	-	+	-	-
+ σημαίνει θετικά αποτελέσματα σε ποσοστό 76 % έως 89 % * σημαίνει ποικίλα αποτελέσματα					

5.Αποτελέσματα

Μια πρώτη ενδιαφέρουσα παρατήρηση είναι ότι από το σύνολο των 117 καθαρών καλλιεργειών που απομονώθηκαν στα ειδικά/εκλεκτικά για *Vibrio* spp. θρεπτικά υποστρώματα μόνο ένας μικρός αριθμός αντιστοιχεί στα πέντε παθογόνα είδη-στόχους της μεθόδου ISO 21872 (σημειώνονται με **έντονη** γραμματοσειρά).

Συγκεκριμένα ταυτοποιήθηκαν τα είδη:

- ***V. parahaemolyticus*** (10 από 117 στελέχη, ποσοστό 8,5%)
- ***V. cholerae*** (1 από 117 στελέχη, ποσοστό 0,85%)
- ***V. mimicus*** (1 από 117 στελέχη, ποσοστό 0,85%)
- ***V. fluvialis*** (2 από 117 στελέχη, ποσοστό 1,7%)
- *V. alginolyticus* (28 από 117 περιπτώσεις, ποσοστό 24%)

Σε ότι αφορά το ποσοστό θετικότητας επί του συνόλου των 50 δειγμάτων μυδιών, που ελέγχθηκαν ως προς την παρουσία του *Vibrio* spp., τα αποτελέσματα έχουν ως εξής:

- ***V. parahaemolyticus***: Βρέθηκαν θετικά 9 από 50 δείγματα, ποσοστό 18%
- ***V. cholerae***: Βρέθηκε θετικό 1 από 50 δείγματα, ποσοστό 2%
- ***V. mimicus***: Βρέθηκε θετικό 1 από 50 δείγματα, ποσοστό 2%
- ***V. fluvialis***: Βρέθηκαν θετικά 2 από 50 δείγματα, ποσοστό 4%
- *V. alginolyticus*: Βρέθηκαν θετικά 21 από 50 δείγματα, ποσοστό 42%
- Συνολικά *Vibrio* spp: Βρέθηκαν θετικά 34 από 50 δείγματα, ποσοστό 68%

Ακόμη, 7 από τα 50 δείγματα (ποσοστό 14%) βρέθηκαν προσβεβλημένα ταυτόχρονα από δύο είδη *Vibrio*. Αναλυτικότερα:

- ***V. parahaemolyticus*** + *V. alginolyticus*: 5 από τα 50 δείγματα, ποσοστό 10%
- ***V. mimicus*** + *V. alginolyticus*: 1 από τα 50 δείγματα, ποσοστό 2%
- ***V. fluvialis*** + *V. alginolyticus*: 1 από τα 50 δείγματα, ποσοστό 2%

Για πρόσβαση στα αναλυτικά αποτελέσματα των διενεργηθεισών βιοχημικών δοκιμών βλέπε “Παράρτημα Α” (σελ. 75). Οι περιπτώσεις των στελεχών που ανιχνεύθηκαν πλην όμως δεν ταυτοποιήθηκαν επιτυχώς από την πρότυπη μέθοδο, κατά το στάδιο των βιοχημικών δοκιμών, πιθανολογείται ότι κατατάσσονται είτε σε άλλα (πιθανώς απαθογόνα) είδη *Vibrio* είτε ακόμη και σε άλλα γένη μικροβίων, τα οποία συναπομονώθηκαν μαζί με τα *Vibrio* spp. στα εκλεκτικά θρεπτικά υποστρώματα TCBS και SDS. Για περαιτέρω πληροφορίες κάποιος μπορεί να ανατρέξει σε εκτενείς πίνακες-κλείδες βιοχημικών προφίλ.

6.Συζήτηση

Τα αποτελέσματα της έρευνας μας συνηγορούν ότι τα μεσογειακά μύδια του είδους *Mytilus galloprovincialis* του Θερμαϊκού Κόλπου που εξετάστηκαν (και, κατ' επέκταση, τα νερά της ευρύτερης περιοχής) είναι μολυσμένα με *Vibrio* spp, σε ποσοστό ιδιαίτερα υψηλό (68%). Λόγω του ότι δεν έχει προηγηθεί άλλη έρευνα παρουσίας του *Vibrio* spp. στην Ελλάδα, η αντιπαραβολή των αποτελεσμάτων μας θα πρέπει, αναγκαστικά, να γίνει με τα δεδομένα που ισχύουν για ξένες χώρες. Κατά μια μελέτη (Ripabelli et al. 1999) που πραγματοποιήθηκε στην Ιταλία, το ποσοστό θετικότητας των δειγμάτων για το *Vibrio* spp., κατά την χρονική περίοδο Σεπτεμβρίου-Ιανουαρίου, ανήλθε στο 48,4%

Το *V. cholerae*, οι επιπτώσεις του οποίου στη Δημόσια Υγεία εγείρουν το μεγαλύτερο ενδιαφέρον, απομονώθηκε σε ένα μόνο δείγμα (ποσοστό 2%), γεγονός που δεν εμπνέει σοβαρή ανησυχία, σε ότι αφορά το καθεστώς προσβολής της περιοχής. Το αντίστοιχο ποσοστό μόλυνσης που παρατηρήθηκε στη Μαλαισία (Elhadi et al. 2004) ήταν 4,6% ενώ στην Ιταλία (Ripabelli et al. 1999) 1,6%.

Οι Ottaviani et al. (2005) σε έρευνα που πραγματοποίησαν για την παρουσία του *V. parahaemolyticus* σε μύδια (*M. galloprovincialis*) περιοχών της Αδριατικής θάλασσας, παρακτίως της Ιταλίας, σημείωσαν ποσοστό θετικότητας 24,3%, το οποίο είναι παραπλήσιο με το 18% που βρήκαμε. Οι Vernocchi et al. (2007) σε μια ανάλογη έρευνα, στην ίδια περιοχή της Αδριατικής, βρήκαν τα δείγματα τους μολυσμένα με *V. parahaemolyticus* σε ποσοστό 25%. Οι Cavallo και Stabili (2002) αντιθέτως, σε έρευνα τους που αφορά μύδια του Ιονίου Πελάγους, ανίχνευσαν το *V. parahaemolyticus* σε ποσοστό μόλις 5%.

Σημαντικό εύρημα θεωρήθηκε η ανίχνευση του *V. alginolyticus*, που απομονώθηκε παρά το γεγονός ότι δεν ανήκει στα βακτήρια στόχους της μεθόδου ISO 21872. Βρέθηκε σε αισθητά υψηλότερο, από τα υπόλοιπα είδη, αριθμό δειγμάτων (21/50, ποσοστό 42%). Η

παρατήρηση αυτή είναι σε συμφωνία με τα αποτελέσματα των Lhafi και Kühne (2007), κατά τους οποίους το *V. alginolyticus* κυριάρχησε μεταξύ των άλλων ειδών *Vibrio* που ανιχνεύθηκαν, με ποσοστό 51,2% επί των μολυσμένων δειγμάτων. Η σημασία του, σε ότι αφορά την Δημόσια Υγεία, είναι μεγάλη, καθώς το συγκεκριμένο βακτήριο, αν και κατά βάση απαθογόνο, θεωρείται υπεύθυνο, από ορισμένους επιστήμονες, για την επιμόλυνση ανοικτών τραυμάτων σε άτομα που έρχονται σε επαφή με μολυσμένο θαλασσινό νερό αλλά και για την πρόκληση ωτίτιδας σε λουόμενους (Farmer et al. 2003). Επιπλέον, το *V. alginolyticus* βρίσκεται φυσιολογικά στο σώμα ορισμένων ειδών ιχθύων (π.χ. pufferfish) όπου παράγει την τετραοδοντοξίνη, μια ισχυρή νευροτοξίνη, η πρόσληψη της οποίας επιφέρει σοβαρής μορφής δηλητηρίαση στους ανθρώπους.

Σε ότι αφορά τις τεχνικές που εφαρμόστηκαν στα πλαίσια του πειράματος, σημειώνεται ότι προέκυψαν ορισμένα σφάλματα και αστοχίες κατά την πορεία του πειράματος, παρότι ακολουθήθηκαν στενά οι διαδικασίες που περιγράφονται στο εγχειρίδιο της πρότυπης μεθόδου. Ειδικότερα, κατά την 5η βιοχημική δοκιμή (ανίχνευση της β-γαλακτοσιδάσης, υδρόλυση ONPG) παρατηρήθηκε απουσία θετικού αποτελέσματος σε όλες τις περιπτώσεις πλην εκείνης με τον κωδικό “33TG”. Για τον λόγο αυτό τέθηκε υπό αμφιβολία η εγκυρότητα της συγκεκριμένης δοκιμής και παρασκευάστηκε εκ νέου το αντιδραστήριο ανίχνευσης της β-γαλακτοσιδάσης (ONPG), χωρίς όμως να προκύψει οποιαδήποτε μεταβολή στα αποτελέσματα.

Επίσης, σε αρκετές περιπτώσεις, η ανασύσταση μικροβιολογικού υλικού που βρισκόταν υπό συντήρηση (κατάψυξη), σε SN broth, απέτυχε, με αποτέλεσμα να μην καταστεί δυνατός ο έλεγχος ταυτοποίησης ορισμένων απομονωθέντων στελεχών. Εκτιμούμε ότι δεν πρόκειται περί αληθούς σφάλματος κατά τον ενοφθαλμισμό. Η πιθανότερη εξήγηση είναι ότι τα μικρόβια των συγκεκριμένων καλλιεργειών αδρανοποιήθηκαν ανεπιστρεπτί από το ψύχος (είναι γνωστή η ευαισθησία των *Vibrio* spp. στις χαμηλές θερμοκρασίες). Σε πολύ μικρότερο βαθμό προέκυψαν αποτυχίες στο στάδιο

της λήψης απομονωμένων αποικιών (τα δείγματα #40 και #46 δεν έδωσαν καθόλου αποικίες).

Εναλλακτικά ως προς τις κλασικές βιοχημικές σειρές που μετήλθαμε, μπορούν να χρησιμοποιηθούν σύγχρονα kit που διατίθενται στο εμπόριο (π.χ. API 20E®, εικόνα 6.1) για την βιοχημική ταυτοποίηση του *Vibrio* spp., των οποίων τα προεγκατεστημένα βιοχημικά υποστρώματα είναι συμβατά με αυτά της πρότυπης μεθόδου ISO/TS 21872.



Εικόνα 6.1: Διαγνωστικό kit βιοχημικών δοκιμών “API 20E®”. Πάνω σειρά: Όλες οι δοκιμές θετικές. Κάτω σειρά: Όλες οι δοκιμές αρνητικές. Πηγή: Εικόνες google.

Τα πλεονεκτήματα τους περιλαμβάνουν την ευκολία και την γρήγορη ταχύτητα εφαρμογής της τεχνικής, σε συνδυασμό με το ότι δεν απαιτείται η προετοιμασία, η χρήση και αργότερα το καθάρισμα σκευών πολλαπλών χρήσεων (π.χ. υάλινοι δοκιμαστικοί σωλήνες), όπως ισχύει για τις συμβατικές βιοχημικές σειρές. Επειδή ωστόσο το κόστος απόκτησης τους υπερέβαινε τον προϋπολογισμό του πειράματος μας, χρησιμοποιήθηκαν εν τέλει οι κλασικές βιοχημικές εξετάσεις, οι οποίες έγιναν στο Εργαστήριο, κατά τις οδηγίες της πρότυπης μεθόδου.

Γενικώς η παραδοσιακή φαινοτυπική ταυτοποίηση των *Vibrio* spp. καθίσταται προβληματική, καθώς τα βιοχημικά χαρακτηριστικά, ανά είδος βακτηρίου, δεν είναι σταθερά αλλά αντιθέτως παρουσιάζουν διακύμανση. Σε κάποιες περιπτώσεις, μάλιστα, τα απομονωθέντα είδη δεν ήταν δυνατό να ταυτοποιηθούν και να καταταγούν σε κάποιον από τους ήδη γνωστούς τύπους (Maugeri et al. 2000). Επιπλέον, ο χρόνος που μεσολαβεί από την έναρξη της διαδικασίας έως ότου ληφθούν αποτελέσματα ποικίλλει από τρεις έως επτά

ημέρες. Η πλήρης διαφοροποίηση των ειδών μεταξύ τους καθώς και η αντιδιαστολή τους από άλλα παθογόνα είδη *Vibrio* και από άλλους αναερόβιους gram (-) μικροοργανισμούς (π.χ. *Aeromonas* spp.) απαιτεί την εκτέλεση επιπρόσθετων φαινοτυπικών δοκιμών.

Καθώς η ευαισθησία των συμβατικών βιοχημικών δοκιμών αμφισβητείται από μερίδα της επιστημονικής κοινότητας (Pinto et al. 2005), καλό είναι, εφόσον διατίθεται ο εξοπλισμός και η οικονομική δυνατότητα, να διασταυρώνονται τα αποτελέσματα των κλασικών μεθόδων ανίχνευσης με αυτά που προκύπτουν από την χρήση μοριακών τεχνικών, όπως είναι για παράδειγμα η PCR/multiplex PCR. Η αυξημένη ευαισθησία/ειδικότητα ανίχνευσης σε συνδυασμό με την μικρή σχετικά χρονική διάρκεια που απαιτεί ο κύκλος λειτουργίας της PCR, επιτάσσουν την εφαρμογή της, στις περιπτώσεις που τίθεται θέμα εκτίμησης του κινδύνου για την Δημόσια Υγεία και προέχει η ανάληψη άμεσου δράσης. Στη δική μας περίπτωση δυστυχώς δεν κατέστη δυνατή η χρήση τεχνικών εναλλακτικών της βιοχημικής ταυτοποίησης, κυρίως λόγω οικονομικής στενότητας και ελλείψεως αναλώσιμων.

Εναλλακτικά η επιβεβαίωση μπορεί να γίνει με την συμβολή εξειδικευμένων εργαστηρίων (Εργαστήρια Αναφοράς) στα οποία αποστέλλεται υλικό από μεμονωμένες αποικίες (ανακαλλιέργειες σε SNA), προς επιβεβαίωση της ταυτότητας τους. Εργαστήριο αναφοράς για το *Vibrio* spp. δεν υπάρχει στην χώρα μας.

Παράρτημα Α

Στον συγκεντρωτικό πίνακα Α.1 παρουσιάζονται αναλυτικά τα αποτελέσματα των βιοχημικών δοκιμών για το σύνολο των 50 δειγμάτων μυδιών που ελήφθησαν κατά την περίοδο Αυγούστου-Δεκεμβρίου 2011.

Στην 3η στήλη του πίνακα έχουν καταχωρηθεί οι κωδικοί σήμανσης των υπό ανίχνευση “καθαρών” καλλιέργειών. Σε κάθε κελί των επόμενων στηλών σημειώνεται ο χαρακτήρας “+”, προκειμένου για θετική δοκιμή, ενώ στην αντίθετη περίπτωση εισάγεται το σύμβολο “-”. Με το σύμβολο “x” δηλώνεται πιθανό σφάλμα τεχνικής, σε ότι αφορά τη συγκεκριμένη δοκιμή, και συνεπώς αναξιόπιστο αποτέλεσμα.

Για καθεμία από τις 117 καθαρές καλλιέργειες ο συνδυασμός των θετικών και αρνητικών αποτελεσμάτων, που προκύπτουν από τις επί μέρους δοκιμές, δίνει το βιοχημικό προφίλ του μικροβίου, το οποίο βάσει του ειδικού πληροφοριακού πίνακα 4.2, αντιστοιχίζεται σε μια πιθανή ταυτότητα. Αυτή η ταυτότητα σημειώνεται στην τελευταία στήλη. Για όσες καλλιέργειες δεν αντιστοιχίστηκαν σε κάποιο από τα είδη-στόχους της μεθόδου ISO 21872 σημειώνεται η ένδειξη “X”.

Πίνακας Α.1 (1 από 3): Αποτελέσματα των βιοχημικών δοκιμών

Ημερομηνία δειγματοληψίας	α/α	Κωδ. #	Δοκιμή οξειδάσης	Παραγωγή αερίου (ζύμωση γλυκόζης)	Ζύμωση λακτόζης και/ή σακχαρόζης	Αποκαρβοξυλίωση ορνιθίνης (ODC)	Αποκαρβοξυλίωση L-λυσίνης (LDC)	Αφυδροξυλίωση αργινίνης (ADH)	Υερόλυση ONPG	Παραγωγή ινδόλης (IND)	NaCl			Πιθανή ταυτότητα
											0%	6%	8%	
		#0	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9			
23-Aug-2011	1	1 TY	+	-	+	+	+	-	-	+	+			X
	2	2 SP	+	+	+	+	+	+	-	+	+			<i>V. alginolyticus</i>
	3	2 SY	+	-	+	+	+	-	-	+	+			X
	4	2 TG	+	-	-	+	+	-	-	+	+			X
	5	2 TY	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+		<i>V. fluvialis</i> (?)
30-Aug-2011	6	3 SY	+	-	+	+	+	+	-	+	+			<i>V. parahaemolyticus</i>
	7	3 TG	+	-	+	+	+	+	-	X	-			X
	8	3 TY	+	-	+	+	+	-	-	+	+			<i>V. alginolyticus</i>
	9	4 SP	+	H ₂ S	+	+	+	-	-	+	+			Non <i>Vibrio</i>
	10	4 SY	Ανεπιτυχής ανακαλλιέργεια											
6-Σεπ-2011	11	4 TG	+	+	+	+	+	-	-	+	+			<i>V. alginolyticus</i>
	12	4 TY	+	-	+	+	+	-	-	+	+			<i>V. alginolyticus</i>
	13	5 SP	+	-	+	+	+	-	-	+	+			<i>V. parahaemolyticus</i>
	14	5 SY	+	-	+	+	+	-	-	+	+			X
	15	5 TG	Ανεπιτυχής ανακαλλιέργεια											
	16	5 TY	Ανεπιτυχής ανακαλλιέργεια											
	17	6 SP	+	+	+	+	+	-	-	+	+			X
	18	6 SY	+	X	+	+	+	-	-	-	-			X
	19	6 TG	+	-	+	+	+	-	-	+	+			<i>V. parahaemolyticus</i>
	20	6 TY	Ανεπιτυχής ανακαλλιέργεια											
	21	7 SP	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+		<i>V. alginolyticus</i>
22	7 SY	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+		X	
23	7 TG	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+		<i>V. alginolyticus</i>	
24	7 TY	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+		<i>V. alginolyticus</i>	
25	8 SP	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		X	
26	8 SY	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+		<i>V. alginolyticus</i>	
27	8 TG	Ανεπιτυχής ανακαλλιέργεια												
28	8 TY	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+			X
29	9 SP	+	H ₂ S	+	+	+	+	+	-	+	+			Non <i>Vibrio</i>
30	9 SY	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+			X
31	9 TG	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+			<i>V. alginolyticus</i>
32	9 TY	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-			X
33	10 SP	+	H ₂ S	+	+	+	+	+	-	+	+			Non <i>Vibrio</i>
34	10 SY	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+			<i>V. alginolyticus</i>
35	10 TG	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+			<i>V. alginolyticus</i>
36	10 TY	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+			<i>V. alginolyticus</i>
37	11 SP	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+			X
38	11 SY	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+			X
39	11 TG	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+			X
40	11 TY	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+			X

Πίνακας Α.1 (2 από 3): Αποτελέσματα των βιοχημικών δοκιμών

Ημερομηνία δειγματοληψίας	α/α	Κωδ. #	Δοκιμή οξειδάσης	Παραγωγή αερίου (ζύμωση γλυκόζης)	Ζύμωση λακτόζης και/ή σακχαρόζης	Αποκαρβοξυλίωση ορνιθίνης (ODC)	Αποκαρβοξυλίωση L-λυσίνης (LDC)	Αφυδροξυλίωση αργινίνης (ADH)	Υερόλυση ONPG	Παραγωγή ινδόλης (IND)	NaCl			Πιθανή ταυτότητα	
											0%	6%	8%		
		#0	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9				
4-Οκτ-2011	41	12 SY	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+		X	
	42	12 TG	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-		<i>V. fluvialis</i>	
	43	12 TY	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
	44	13 SP	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+		X	
	45	13 SY	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-		<i>V. alginolyticus</i>	
	46	13 TG	Ανεπιτυχής ανακαλλιέργεια												
	47	14 SP	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-		X	
	48	14 SY	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+		X	
	49	14 TY	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
	50	15 SP	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+		<i>V. parahaemolyticus</i>	
	51	15 SY	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+		X	
	52	15 TG	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+		X	
	53	15 TY	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+		<i>V. alginolyticus</i>	
	54	16 SP	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+		X	
	55	16 SY	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+		X	
	56	16 TG	Ανεπιτυχής ανακαλλιέργεια												
57	16 TY	Ανεπιτυχής ανακαλλιέργεια													
11-Οκτ-2011	58	17 SP	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-		X	
	59	17 TG	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-		<i>V. parahaemolyticus</i>	
	60	17 TY	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-		X	
	61	18 SY	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-		<i>V. alginolyticus</i>	
	62	18 TG	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-		<i>V. mimicus</i> (?)	
	63	18 TY	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-		X	
	64	19 SY	Ανεπιτυχής ανακαλλιέργεια												
	65	19 TG	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-		X	
	66	19 TY	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-		X	
	67	20 SY	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-		X	
31-Οκτ-2011	68	21 SP	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-		<i>V. parahaemolyticus</i>	
	69	21 SY	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-		<i>V. alginolyticus</i>	
	70	21 TG	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-		<i>V. alginolyticus</i>	
	71	21 TY	Ανεπιτυχής ανακαλλιέργεια												
	72	22 SY	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-		<i>V. alginolyticus</i>	
	73	23 SY	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-		X	
	74	23 TG	Ανεπιτυχής ανακαλλιέργεια												
	75	23 TY	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-		<i>V. alginolyticus</i>	
	76	24 SY	Ανεπιτυχής ανακαλλιέργεια												
	77	25 SY	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-		<i>V. alginolyticus</i>	
	78	25 TG	Ανεπιτυχής ανακαλλιέργεια												
	79	25 TY	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-		X	
	80	26 SP	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-		<i>V. parahaemolyticus</i>	

Πίνακας Α.1 (3 από 3): Αποτελέσματα των βιοχημικών δοκιμών

Ημερομηνία δειγματοληψίας	α/α	Κωδ. #	Δοκιμή οξειδάσης	Παραγωγή αερίου (ζύμωση γλυκόζης) σακχαρόζης	Ζύμωση λακτόζης και/ή σακχαρόζης	Αποκαρβοξυλίωση ορνιθίνης (ODC)	Αποκαρβοξυλίωση L-λυσίνης (LDC)	Αφυδροξυλίωση αργινίνης (ADH)	Υδρόλυση ONPG	Παραγωγή ινδόλης (IND)	NaCl 0%	NaCl 6%	NaCl 8%	Πιθανή ταυτότητα	
		#0	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9				
29-Νοε-2011	81	26 SY	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	X	
	82	26 TG	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	X	
	83	27 SP	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	X	
	84	27 SY	Ανεπιτυχής ανακαλλιέργεια												
	85	28 SY	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	X	
	86	29 SY	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	X	
	87	29 TG	Ανεπιτυχής ανακαλλιέργεια												
	88	30 SP	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	V. parahaemolyticus	
	89	30 SY	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	V. alginolyticus	
	90	30 TG	Ανεπιτυχής ανακαλλιέργεια												
	91	31 SY	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	X	
	92	32 TG	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	V. alginolyticus	
	93	33 TG	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	V. cholerae	
	94	34 SP	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	V. parahaemolyticus	
	95	34 SY	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	V. alginolyticus	
	96	34 TG	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	-	V. parahaemolyticus	
	97	35 TG	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	X	
98	36 SY	-													
99	36 TG	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	V. alginolyticus		
100	37 SY	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	V. alginolyticus		
101	37 TG	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	V. alginolyticus		
102	37 TY	Ανεπιτυχής ανακαλλιέργεια													
103	38 SY	-													
104	38 TG	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	V. alginolyticus		
105	39 TG	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	X		
-	40	-	Ανεπιτυχής απομόνωση												
106	41 SY	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	V. alginolyticus		
107	42 TG	Ανεπιτυχής ανακαλλιέργεια													
108	43 TY	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	X		
109	44 TG	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	X		
110	45 TG	Ανεπιτυχής ανακαλλιέργεια													
111	45 TY	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	X		
-	46	-	Ανεπιτυχής απομόνωση												
112	47 SY	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	X		
113	47 TG	Ανεπιτυχής ανακαλλιέργεια													
114	48 TG	Ανεπιτυχής ανακαλλιέργεια													
115	49 TG	Ανεπιτυχής ανακαλλιέργεια													
116	50 SY	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	X		
117	50 TG	Ανεπιτυχής ανακαλλιέργεια													

Βιβλιογραφία

- Baffone W, Casaroli A, Campana R, Citterio B, Vittoria E, Pierfelici L, Donelli G (2005). "In vivo' studies on the pathophysiological mechanism of *Vibrio parahaemolyticus* TDH(+)-induced secretion". *Microb Pathog* 38 (2-3): 133–7
- Bauer A., Ostensvik Y., Florvag M., Ormen O., Rorvik L. M. (2006). Occurrence of *Vibrio parahaemolyticus*, *V. cholerae*, and *V. vulnificus* in Norwegian blue mussels (*Mytilus edulis*). *Appl. Environ. Microbiol.* 72:3058–3061.
- Bentivoglio, M; Pacini, P (1995). "Filippo Pacini: A determined observer". *Brain Research Bulletin* 38 (2): 161–5
- Brown A (2000). "Good Eats" TV show, Season #3, Episode #2 ("Mussel Bound")
- Bureau of Community Environmental Health, Division of Environmental Health, Florida Department of Health (2005). "Annual Report, Florida". *Food and Waterborne Illness Surveillance and Investigation*: 21.
- Caipang C.M.A., Brinchmann M.F. & Kiron V. (2009) ProϕI- ing gene expression in the spleen of Atlantic cod, *Gadus morhua* upon vaccination with *Vibrio anguillarum* antigen. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochem- istry and Molecular Biology* 153, 261^267.
- Cam, D.T.V., Hao, N.V., Dierckens, K., Defoirdt, T., Boon, N., Sorgeloos, P., Bossier, P. (2009) Novel approach of using homoserine lactone degrading and poly- β–hydroxybutyrate accumulating bacteria to protect *Artemia* from the pathogenic effects of *Vibrio harveyi*. *Aquaculture* 291: 23–30
- Cash, R. A., S. I. Music, J. P. Libonati, M. J. Snyder, R. P. Wenzel, and R. B. Hornick. (1974). Response of man to infection with *Vibrio cholerae*. I. Clinical, serologic, and bacteriologic responses to a known inoculum. *J. Infect. Dis.* 129:45–52
- Cavallo R.A., Stabili L. Presence of vibrios in seawater and *Mytilus galloprovincialis* (Lam.) from the Mar Piccolo of Taranto (Ionian Sea). (2002) *Water Research*, 36 (15), pp. 3719-3726.
- Clark RF, Williams SR, Nordt SP, Manoguerra AS (1999). "A review of selected seafood poisonings". *Undersea Hyperb Med* 26 (3): 175–84.
- Daniels N and Shafaie A (2000): A Review of Pathogenic *Vibrio* Infections for Clinicians, *J Infectious Medicine* 17(10):665-685
- DePaola A, Hopkins LH, Peeler JT, Wentz B, McPhearson RM. (1990) Incidence of *Vibrio parahaemolyticus* in U.S. Coastal waters and oysters. *Applied and Environmental Microbiology*; 56: 2299-2302.
- Di Pinto, A., Ciccarese, G., De Corato, R., Novello, L., Terio, V. Detection of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in southern Italian shellfish (2008) *Food Control*, 19 (11), pp. 1037-1041.
- Elhadi, N., S. Radu, C. Chen, and M. Nishibuchi. (2004). Prevalence of potentially pathogenic *Vibrio* species in the seafood marketed in Malaysia. *J. Food Prot.* 67:1469–1475.
- Farmer JJ (October 1979). "Vibrio ("Benecke") *vulnificus*, the bacterium associated with sepsis, septicaemia, and the sea". *Lancet* 2 (8148): 903
- Farmer III, J.J., Janda, M., Birkhead, K., (2003). *Vibrio*, In: Murray, P.R., Baron, E.J., Jorgensen, J.H., Pfaller, M.A., Tenover, R.H. (Eds.), *Manual of Clinical Microbiology*, 8th edition. ASM Press, Washington, D. C., pp. 706–718.
- Faruque, Shah M.; Nair, Balakrish, eds (2008). *Vibrio cholerae: Genomics and Molecular Biology*. Caister Academic Press
- Faury, N., D. Saulnier, F.L. Thompson, M. Gay, J. Swings and F. Le Roux. (2004). *Vibrio crassostreae* sp. nov., isolated from the haemolymph of oysters (*Crassostrea gigas*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54: 2137–2140.
- Finkelstein RA (1996). Cholera, *Vibrio cholerae* O1 and O139, and Other Pathogenic Vibrios. In: Barron's *Medical Microbiology* (Barron S et al., eds.) (4th ed.). Univ of Texas Medical Branch
- Fisher G. H., R. A. Mirza, J.-J. Poisson, A. D'Aniello, P. Spinelli, and G. Ferrandino. Do Marine Mollusks Possess Aphrodisiacal Properties? Presented at the 229th ACS National Meeting, San Diego, CA, March 14, (2005).
- Galinou-Mitsoudi, S., Savvidis, Y. & Dimitriadis, X. (2006). Interaction between Mussel Culture and Hydrodynamics; a Preliminary Study in the Gulfs of Thessaloniki and Thermaikos, Greece. *Journal of Biological Research*, 5: 1-7.

- Garrity, George M. (editor) (2005). *Bergey's manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 2 Part B (2nd ed.). Springer. pp. 496–8.
- Greenough WB, III, Gordon RS, Jr., Rogenberg IS, Davies BI, Benenson AS. Tetracycline in the treatment of cholera. *Lancet* (1964);1:355-7
- Gugliandolo, C., Carbone, M., Fera, M.T., Irrera, G.P. and Maugeri, T.L. (2005) Occurrence of potentially pathogenic vibrios in the marine environment of the Straits of Messina (Italy). *Mar Pollut Bull* 50, 682–697.
- Hall, S., and G. Strichartz (eds.). (1990). *Marine Toxins: Origin, Structure and Molecular Pharmacology*. ACS Symposium Series 418. American Chemical Society, Washington, DC.
- Hampton J (2010). What Foods Are Considered Aphrodisiacs? LiveStrong.com e-zine, Article #267793
- Heymann DL. Cholerae and Other Vibrioses. In: *Control of Communicable Diseases Manual*, 18th Edition. Washington DC: American Public Health Association; (2004). P.103-117
- Hogan, C.Michael. (2010). Bacteria. *Encyclopedia of Earth*. eds. Sidney Draggan and C.J.Cleveland, National Council for Science and the Environment, Washington DC
- Howard-Jones, N (1984). "Robert Koch and the cholera vibrio: a centenary". *BMJ* 288 (6414): 379–81
- Ichinose, Y., K. Yamamoto, N. Nakasone, M. J. Tanabe, T. Takeda, T. Miwatani, and M. Iwanaga. (1987). Enterotoxicity of El Tor-like hemolysin of non-O1 *Vibrio cholerae*. *Infect. Immun.* 55:1090–1093
- Jablecki J, Norton SA, Keller GR, DeGraw C, Ratard R, Straif-Bourgeois S, Holcombe JM, Quilter S, Byers P, McNeill M, Schlossberg D, Dohony DP, Neville J, Carlo J, Buhner D, Smith BR, Wallace C, Jernigan D, Sobel J, Reynolds M, Moore M, Kuehnert M, Mott J, Jamieson D, Burns-Grant G, Misselbeck T, Cruise PE, LoBue P, Holtz T, Haddad M, Clark TA, Cohen A, Sunenshine R, Jhung M, Vranken P, Lewis FMT, Carpenter LR (2005). "Infectious Disease and Dermatologic Conditions in Evacuees and Rescue Workers After Hurricane Katrina - Multiple States, August–September, 2005". *Mortality and Morbidity Weekly Report* 54: 1–4.
- James, William D.; Berger, Timothy G. (2006). *Andrews' Diseases of the Skin: clinical Dermatology*. Saunders Elsevier.
- Jones, M.K. and Oliver, J.D. (2009) *Vibrio vulnificus*: disease and pathogenesis. *Infect Immun* 77, 1723,-1733
- Joseph S, Colwell R, Kaper J (1982). "Vibrio parahaemolyticus and related halophilic Vibrios". *Crit Rev Microbiol* 10 (1): 77–124
- Lee Kelley. *The Global Dimensions of Cholera*. *Global Change & Human Health*, Vol. 2, No. 1. (1 July 2001), pp. 6-17
- Lee, Y.R., K.H. Park, Z.Z. Lin, Y.J. Kho, J.W. Park, H.W. Rho, B.S. Koo, H.R. Kim, E.K. Song, H.N. Yu, M.K. Han, S.O. Lee, E.C. Jhee, and J.S. Kim. (2004c). A calcium-calmodulin antagonist blocks experimental *Vibrio vulnificus* cytolysin-induced lethality in an experimental mouse model. *Infect. Immun.* 72, 6157- 6159.
- Levine, M. M., J. B. Kaper, R. E. Black, and M. L. Clements. (1983). New knowledge on pathogenesis of bacterial enteric infections as applied to vaccine development. *Microbiol. Rev.* 47:510–550
- Lewis DL, Arens M. Resistance of microorganisms to disinfection in dental and medical devices. *Nat. Med.* (1995);1:956-8
- Lhafi S.K., Kühne M. Occurrence of *Vibrio* spp. in blue mussels (*Mytilus edulis*) from the German Wadden Sea. *International Journal of Food Microbiology*, 116 (2007), pp. 297–300
- Liu JW, Lee IK, Tang HJ et al. (2006). "Prognostic factors and antibiotics in *Vibrio vulnificus* septicemia". *Archives of internal medicine* 166 (19): 2117–23
- McPherson VL, Watts JA, Simpson LM, Oliver JD . Physiological effects of the lipopolysaccharide of *Vibrio vulnificus* on mice and rats . *Microbios* (1991) ; 67: 141-9.
- Madigan, Michael; Martinko, John (editors) (2005). *Brock Biology of Microorganisms* (11th ed.). Prentice Hall
- Marrero, Karen; Sánchez, Aniel; Rodríguez-Ulloa, Arielis; González, Luis Javier; Castellanos-Serra, Lila; Paz-Lago, Dalila; Campos, Javier; Rodríguez, Boris Luis et al. (2009). "Anaerobic growth promotes synthesis of colonization factors encoded at the *Vibrio* pathogenicity island in *Vibrio cholerae* El Tor". *Research in Microbiology* 160 (1): 48–56.
- Maugeri, T.L., Caccamo, D. and Gugliandolo, C. (2000) Potentially pathogenic vibrios in brackish waters and mussels. *J Appl Microbiol* 89, 261–266.

- Maugeri, T.L., Carbone, M., Fera, M.T. and Gugliandolo, C. (2006) Detection and differentiation of *Vibrio vulnificus* in seawater and plankton of a coastal zone of the Mediterranean Sea. *Res Microbiol* 157, 194–200.
- Merkel SM, Alexander S, Zufall E, Oliver JD, Huet-Hudson YM (2001). "Essential Role for Estrogen in Protection against *Vibrio vulnificus*-Induced Endotoxic Shock". *Infection and Immunity* 69 (10): 6119–22.
- Morris, J. G., Jr. (1990). Non-O group 1 *Vibrio cholerae*: a look at the epidemiology of an occasional pathogen. *Epidemiol. Rev.* 12:179–191
- Morris, J. G., Jr., T. Takeda, B. D. Tall, G. A. Losonsky, S. K. Bhatta-charya, B. D. Forrest, B. A. Kay, and M. Nishibuchi. (1990). Experimental non-O group 1 *Vibrio cholerae* gastroenteritis in humans. *J. Clin. Invest.* 85:697–705.
- Oliver, J.D., Nilsson, L. and Kjelleberg, S. (1991) Formation of nonculturable *Vibrio vulnificus* cells and its relationship to the starvation state. *Applied and Environmental Microbiology* 57, 2640– 2644.
- Oliver JD, Kaper J (2001). *Vibrio* species. pp. 263-300 In: *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*. (Doyle MP et al., editors) (2nd ed.). ASM Press
- Oliver JD, Kaper J (2005). *Vibrio vulnificus*. In: *Oceans and Health: Pathogens in the Marine Environment*. (Belken SS, Colwell RR, editors) (2nd ed.). Springer Science
- Oliver JD (2005). "Wound infections caused by *Vibrio vulnificus* and other marine bacteria". *Epidemiol Infect* 133 (3): 383–91
- Ottaviani D., Santarelli S., Bacchiocchi S., Masini L., Ghittino C., Bacchiocchi I. Presence of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* strains in mussels from the Adriatic Sea, Italy (2005) *Food Microbiology*, 22 (6), pp. 585-590.
- Penland RL, Boniuk M, Wilhelmus KR (2000). "Vibrio ocular infections on the U.S. Gulf Coast". *Cornea* 19 (1): 26–9
- Pinto, A.D., Ciccarese, G., Tantillo, G., Catalano, D. and Forte V.T. (2005) A collagenase-targeted multiplex PCR assay for identification of *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio cholerae* and *Vibrio parahaemolyticus*, *J Food Prot* 68, 150-153.
- Rachid H. O., Ito H., Ishigaki I. Distribution of pathogenic vibrios and other bacteria in improved frozen shrimp and their contamination by gamma irradiation. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 8 (1992), pp. 494–499
- Ripabelli, G., Sammarco, M.L., Grasso, G.M., Fanelli, I., Caprioli, A., Luzzi, I., (1999). Occurrence of *Vibrio* and other pathogenic bacteria in *Mytilus galloprovincialis* (mussels) harvested from Adriatic Sea, Italy. *International Journal of Food Microbiology* 49 (1–2), 43–48.
- Ryan KJ; Ray CG, ed (2004). *Sherris Medical Microbiology* (4th ed.). McGraw Hill
- Sack, D.A., Sack, R.B., Nair, G.B. and Siddique, A.K. (2004). Cholera. *Lancet* 363, 223-233
- Sanyal, S. C., K. Alam, P. K. B. Neogi, M. I. Huq, and K. A. Al-Mahmud. (1983). A new cholera toxin. *Lancet* i: 1337
- Seas, C, Gotuzzo, E. *Vibrio cholerae*. In: *Principles and Practice of Infectious Diseases*, 6th ed. Mandell, GL, Bennett, JE, Dolin, R, (Eds), Churchill Livingstone, Philadelphia, PA (2005), p.2536.
- Siddique, A.K.; Baqui, A.H.; Eusof, A.; Haider, K.; Hossain, M.A.; Bashir, I.; Zaman, K. (1991). "Survival of classic cholera in Bangladesh". *The Lancet* 337 (8750): 1125–1127
- Simonson, J., and R. J. Siebeling. (1988). Coagglutination of *Vibrio cholerae*, *Vibrio mimicus*, and *Vibrio vulnificus* with anti-flagellar monoclonal antibody. *J. Clin. Microbiol.* 10:1962- 1966.
- Simpson, L.M., White, V.K., Zane, S.F. and Oliver, J.D. (1987). Correlation between virulence and colony morphology in *Vibrio vulnificus*. *Infection and Immunity* 55, 269–272.
- Skerman (V.B.D.), McGowan (V.) and Sneath (P.H.A.) (editors): *Approved Lists of Bacterial Names*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, (1980), 30, 225-420
- Strom, M. S. & Paranjpye, R. N. (2000). Epidemiology and pathogenesis of *Vibrio vulnificus*. *Microbes Infect* 2, 177-188.
- Su Y.-C., Liu C. *Vibrio parahaemolyticus*: A concern of seafood safety (2007) *Food Microbiology*, 24 (6) , pp. 549-558.
- Tamplin, M. L., R. R. Colwell, S. Hall, K. Kogure, and G. R. Strichartz. (1987). Sodium-channel inhibitors produced by enteropathogenic *Vibrio cholerae* and *Aeromonas hydrophila*. *Lancet* i:975

- Tamplin MI, Capers GM (1992) Persistence of *Vibrio vulnificus* in tissues of Gulf Coast oysters, *Crassostrea virginica*, exposed to seawater disinfected with UV light. *Appl Environ Microbiol* 58:1506–1510
- Thompson, F.L., Iida, T. and Swings, J. (2004) Biodiversity of vibrios. *Microbiol Mol Biol Rev* 68, 403-431
- Thompson FL, Gevers D, Thompson CC, Dawyndt P, Naser S, Hoste B, Munn CB, Swings J (2005). "Phylogeny and Molecular Identification of Vibrios on the Basis of Multilocus Sequence Analysis". *Applied and Environmental Microbiology* 71 (9): 5107–5115.
- Timenetsky J, Yanaguita R M, Silva L A. Evaluation of household chemical disinfectants for *Vibrio cholerae* EL TOR (non toxigenic strain). *Revista de saude publica* (1992). Volume: 26, Issue: 5, Pages: 328-331
- Travis, J. "Mussel Muzzled." *Science News* 1 June 2002: 339
- Vernocchi P., Maffei M., Lanciotti R., Suzzi G., Gardini F. Characterization of Mediterranean mussels (*Mytilus galloprovincialis*) harvested in Adriatic Sea (Italy) (2007) *Food Control*, 18 (12), pp. 1575-1583.
- Waldor MK, Tschape H, Mekalanos JJ. A new type of conjugative transposon encodes resistance to sulfamethoxazole, trimethoprim, and streptomycin in *Vibrio cholerae* O139. *J Bacteriol.* (1996); 178:4157–65.
- Widdows J., Donkin P. *Mussels and Environmental Contaminants: Bioaccumulation and Physiological Aspects.* E. Gosling (Ed.), *The Mussel Mytilus*, Elsevier Press, Amsterdam (1992), pp. 383–424
- Wright, A.C., Hill, R.T., Johnson, J.A., Roghman, M.C., Colwell, R.R. and Morris, J.G. (1996) Distribution of *Vibrio vulnificus* in the Chesapeake Bay estuaries. *Appl Environ Microbiol* 62, 717–724.
- Wright, A.C., Garrido, V., Debuex, G., Farrell-Evans, M., Mudbidri, A.A. and Otwell, W.S. (2007) Evaluation of postharvest-processed oysters by using PCR-based most-probable-number enumeration of *Vibrio vulnificus* bacteria. *Appl Environ Microbiol* 73, 7477–7481.
- Yamanaka H, Sugiyama K, Furuta H, Miyoshi S, Shinoda S. Cytolytic action of *Vibrio vulnificus* haemolysin on mast cells from rat peritoneal cavity. *J Med Microbiol.* (1990);32:39–43.
- Zeldes, Leah A. (2010). "Eat this! Mussels, mighty fine mollusks". *Dining Chicago. Chicago's Restaurant & Entertainment Guide, Inc.*

Συμπληρωματική Βιβλιογραφία

Ελληνικό Κέντρο Θαλάσσιων Ερευνών (ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε)
<http://www.hcmr.gr/indexel.php>

Centers for Disease Control and Prevention
<http://www.cdc.gov/>

WIKIPEDIA - The Free Encyclopedia
<http://en.wikipedia.org/wiki/Vibrio>
http://en.wikipedia.org/wiki/Vibrio_alginolyticus
http://en.wikipedia.org/wiki/Vibrio_cholerae
http://en.wikipedia.org/wiki/Vibrio_parahaemolyticus
http://en.wikipedia.org/wiki/Vibrio_vulnificus

Self NutritionData
<http://nutritiondata.self.com/facts/finfish-and-shellfish-products/4187/2>