ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
Η ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΣΤΗΝ ΥΓΕΙΑ ΚΑΙ ΣΤΗ ΝΟΣΟ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«*Vibrio parahaemolyticus* και η σημασία του στην ασφάλεια των αλιευμάτων»

του

Παναγιώτη Κρητικού

Ιχθυολόγου Τ.Ε.

Λάρισα, 2019

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:11:01 EEST - 18.116.85.64

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
Η ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΣΤΗΝ ΥΓΕΙΑ ΚΑΙ ΣΤΗ ΝΟΣΟ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«*Vibrio parahaemolyticus* και η σημασία του στην ασφάλεια των αλιευμάτων»

του

Παναγιώτη Κρητικού

Ιχθυολόγου Τ.Ε.

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Σολωμάκος Νικόλαος, Επ. Καθηγητής Κτηνιατρικής σχολής Παν. Θεσσαλίας

(Επιβλέπων Καθηγητής)

Πεξαρά Ανδρεάνα, Επίκ. Καθηγήτρια Κτηνιατρικής σχολής Παν. Θεσσαλίας

Κωστούλας Πολυχρόνης, Επίκ. Καθηγητής Κτηνιατρικής σχολής Παν. Θεσσαλίας

Λάρισα, 2019

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:11:01 EEST - 18.116.85.64

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
Η ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΣΤΗΝ ΥΓΕΙΑ ΚΑΙ ΣΤΗ ΝΟΣΟ

«*Vibrio parahaemolyticus* and its importance in seafood safety»

Larisa, 2019

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:11:01 EEST - 18.116.85.64

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη 8

Abstract 9

Εισαγωγή 10

Κεφάλαιο 1: Αλιεία, Υδατοκαλλιέργειες και Αλιεύματα 11

1.1. Αλιεία 11

1.2. Υδατοκαλλιέργειες 13

1.2.1. Στατιστικά στοιχεία 15

1.3. Αλιεύματα 19

1.4. Εξασφάλιση ποιότητας, υγιεινής και ασφάλειας αλιευμάτων 20

Κεφάλαιο 2: Μικροβιολογικά χαρακτηριστικά του V. parahaemoliticus 22

2.1. Χαρακτηριστικά του βακτηρίου V. parahaemolyticus 22

2.2. Παράγοντες ανάπτυξης του V.parahaemolyticus 23

2.2.1. Θερμοκρασία 23

2.2.2. pH 25

2.2.3. Συγκέντρωση NaCl 25

2.2.4. Ενεργότητα νερού 26

2.2.5. Ανθεκτικότητα στη θερμική επεξεργασία 26

Κεφάλαιο 3.: Λοιμογόνα χαρακτηριστικά του V.parahaemoliticus 28

3.1. Τροφιμογενής λοίμωξη από V. parahaemolyticus 28

3.2. Λοιμογόνοι παράγοντες 29

Κεφάλαιο 4.: Παθογένεια στον άνθρωπο 35

4.1. Γαστρεντερίτιδα από V. parahaemolyticus 35

4.2. Συχνότητα εμφάνισης λοιμώξεων 37

4.3. Σύνδεση με κλιματική αλλαγή 42

Κεφάλαιο 5: Αναδυόμενα στελέχη του V.parahaemoliticus και παράγοντες επικινδυνότητας. . 47

5.1.Παρουσία του Vibrio parahaemolyticus στα αλιεύματα. 51

5.2. V. parahaemolyticus και κλιματική αλλαγή 55

Κεφάλαιο 6: Επίδραση των διαφόρων μεθόδων επεξεργασίας των αλιευμάτων στην επιβίωση του V.parahaemoliticus. 58

Κεφάλαιο 7: Σχετική Νομοθεσία. 63

Συμπεράσματα 67

Βιβλιογραφία 68

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:11:01 EEST - 18.116.85.64

Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 1.: Ποσότητα και αξία αλιευμάτων μέσης και παράκτιας αλιείας, 2016 και 2017 (Ποσότητα σε τόνους, αξία σε χιλιάδες ευρώ)... 12

Πίνακας 2.: Προσφορά αλιευτικών προιόντων στην Ελλάδα (ποσότητα σε τόνους) ... ……………………………………………………………………………………………14

Πίνακας 3.: Κατάταξη ελληνικών εξαγωγικών αγροτικών προϊόντων ανά κλάδο (αξία εξαγωγών σε χιλιάδες ευρώ) 16

Πίνακας 4.:Εξέλιξη της παραγωγής τσιπούρας και λαβρακιού στις ελληνικές ιχθυοκαλλιέργειες την τρέχουσα δεκαετία (σε τόνους) 17

Πίνακας 5.: Εξέλιξη τηςπαραγωγή αλιείας και υδατοκαλλιέργειας από το 1950 σε παγκόσμιο επίπεδο(σε τόνους)... 18

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:11:01 EEST - 18.116.85.64

Κατάλογος Γραφημάτων και σχημάτων

Γραφήματα

Γράφημα 1.: Ποσότητα αλιευμάτων, κατά περιοχή αλιείας, 2017. ……………………….12

Γράφημα 2. :Προσφορά αλιευτικών προϊόντων στην Ελλάδα, ανάλογα με το σημείο αλίευσης (%)……………………………………………………………………….13

Γράφημα 3. :Κύρια είδη εκτροφής στην Ελλάδα (%)…………………………………….14

Γράφημα 4.:Κύριες χώρες παραγωγής τσιπούρας και λαβρακιού παγκοσμίως, το 2017 (%)……………………………………………………………………………….18

Σχήματα

Σχήμα 1 :Συνοπτική ταξινόμηση των διαφόρων αλιευμάτων……………………………….19

Σχήμα 2.: Συσχέτιση των παθογόνων με τις παραμέτρους του κλίματος θερμοκρασία αέρα ..46

Σχήμα 3.: Εξέλιξη της έξαρσης του V. parahaemolyticus στο Περού σε συσχέτιση με την άφιξη και επέκταση των θερμών υδάτων λόγω του φαινομένου ElNino κατά την επιδημία που καταγράφηκε το 1997-1998 Α) Αριθμός επίσημα καταγεγραμμένων περιστατικών, από τις κρατικές υπηρεσίες του Περού 1997-98, (Β) γεωγραφική θέση των θερμών υδάτων, λόγω του φαινομένου El Nino κατά τους μήνες Μάιο, Οκτώβριο, και Δεκέμβριο του 1997, (C) ημερομηνίες καταγραφής των πρώτων περιστατικών λοιμώξεων από V. Parahaemolyticus, στις παράκτιες περιοχές του Περού το 1997…………………………………………56,57

Σχήμα 4.:Περιστατικά λοιμώξεων απόV. parahaemolyticus στην Αλάσκα κατά την έξαρση του 2004 σε σχέση με την άφιξη και επέκταση θερμών υδάτων στις παράκτιες περιοχές της Αλάσκας ……………………………………………………………………………..57

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:11:01 EEST - 18.116.85.64

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά, τον επιβλέποντα καθηγητή μου, Δρ. Σολωμάκο Νικόλαο, για την ανάθεση, μιας τόσο ενδιαφέρουσας διπλωματικής εργασίας, με θέμα «*Vibrio parahaemolyticus* και η σημασία του στην ασφάλεια των αλιευμάτων», σχετικής, τόσο με το αντικείμενο προπτυχιακών σπουδών μου, όσο και με την προσδοκώμενη επαγγελματική μου εξέλιξη.

Με την απρόσκοπτη επίβλεψη, νουθεσίες, στοχευμένη καθοδήγηση, παρακολούθηση της πορείας μου, καθώς και με τη συστηματικότητα στον τρόπο σκέψης που τον διακρίνει, συνέβαλε σε μεγάλο βαθμό, στην επιστημονική εξέλιξη της σκέψης μου και στην ολοκλήρωση της συγγραφής, της παρούσας διπλωματικής εργασίας.

Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ, στους γονείς μου, Νίκο Κρητικό και Ιωάννα Γούναρη, στον καθηγητή μου, Δρ. Τσίρο Χαράλαμπο, που με προέτρεψε να ακολουθήσω ένα πρόγραμμα μεταπτυχιακών σπουδών, σε μεγάλη ηλικία και προπαντώς, στη σύζυγό μου Καθολική, η οποία υποστήριξε την όλη μου προσπάθεια και με μεγάλη υπομονή και επιμονή, συνέβαλε ουσιαστικά στο όλο εγχείρημα, εμψυχόνοντας με και αναλαμβάνοντας, το μεγαλύτερο μέρος των βαρών της οικογενειάς μας, σε σχέση, με τα δύο ανήλικα παιδιά μας, Νίκο και Βασίλη 12 και 8 ετών, στα οποία και χρωστώ, αρκετό δημιουργικό χρόνο, μιας και τους στέρησα την πατρική συντροφιά για ενάμιση και πλέον χρόνο . Τους ευχαριστώ όλους, για την υπομονή, την συμπαράσταση και την αγάπη που μου έδειξαν, στηρίζοντας τις επιλογές μου.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:11:01 EEST - 18.116.85.64

Περίληψη

Στην Ελληνική και ξένη βιβλιογραφία, έχουν καταγραφεί, περισσότερα από 30 είδη Vibrio (δονάκια), από τα οποία, τα 13, θεωρούνται παθογόνα για τον άνθρωπο. Όλα τα παθογόνα δονάκια, σχετίζονται με τροφιμογενείς λοιμώξεις, αλλά το *V. parahaemolyticus,* χαρακτηρίζεται ως το σημαντικότερο παθογόνο βακτήριο. Το *V. parahaemolyticus,* είναι ένα αλόφιλο βακτήριο, αφού, μπορεί και αναπτύσσεται σε υψηλές συγκεντρώσεις άλατος, ενώ, απαντάται σε υδάτινα οικοσυστήματα, σε όλο τον κόσμο. Το παθογόνο, σχετιζόνταν, συνήθως με σποραδικά περιστατικά τροφιμογενούς γαστρεντερίτιδας, μετά από κατανάλωση νωπών ιχθύων ή αλιευμάτων, που είχαν υποστεί ατελή θερμική επεξεργασία. Από το 1996 όμως, ο αριθμός των καταγεγραμμένων τροφιμογενών λοιμώξεων από το *V. Parahaemolyticus,* έχει αυξηθεί σημαντικά, ώστε από τότε, να αποτελεί, το κυριότερο αίτιο τροφιμογενούς λοίμωξης, μετά από κατανάλωση αλιευμάτων, ιδιαίτερα στην περιοχή της Ασίας, αλλά και στις Η.Π.Α. Η αύξηση αυτή, αποδίδεται στην εμφάνιση του ορότυπου O3:K6 του παθογόνου βακτηρίου. Τα παθογόνα στελέχη του *V. Parahaemolyticus,* παράγουν, μια θερμοανθεκτική τοξίνη (Kanagawa ή TDH), ή μια αιμολυσίνη. Στον Κανονισμό 2073/2005 της Ευρωπαϊκής Ένωσης, όπου καθορίζονται τα μικροβιολογικά κριτήρια για τα τρόφιμα, δεν περιέχεται καμία διάταξη, για τον έλεγχο του Vibrio στα θαλασσινά, εντός της Ευρωπαϊκής Ένωσης. Ωστόσο, υπάρχει μια αυξανόμενη ανησυχία, ότι το *V. Parahaemolyticus,* μπορεί, να αποτελέσει σημαντικό και αυξανόμενο πρόβλημα, για την ασφάλεια των αλιευμάτων στην Ευρώπη. Η απομόνωση του συγκεκριμένου παθογόνου παράγοντα σε πρόσφατες μελέτες, από περιοχές, συμπεριλαμβανομένης της Ευρώπης, όπου, σπάνια εντοπιζόταν στο παρελθόν, δείχνει τη γεωγραφική και εποχιακή επέκταση του βακτηρίου, παρόμοια με την τοξίνη Kanagawa (TRH), που σχετίζεται με τα γονίδια tdh και trh, αντίστοιχα.

Το *V. Parahaemolyticus,* δεν περιλαμβάνεται στα μικροβιολογικά κριτήρια ασφαλείας, για τα αλιεύματα, που ισχύουν στην Ευρωπαϊκή Ένωση, αφού μέχρι πρόσφατα, θεωρούνταν χαμηλή η συχνότητα εμφάνισης λοιμώξεων, από αυτό, στην Ευρώπη. Όμως, η κλιματική αλλαγή στον πλανήτη μας, ευνοεί την ανάπτυξη του παθογόνου, στο θαλάσσιο νερό. Πρόσφατες μελέτες στην Ισπανία και τη Γαλλία, αναφέρουν ότι οι λοιμώξεις αυτές, παρουσιάζουν σημαντική αύξηση. Στη παρούσα ανασκόπηση, αναφέρονται, οι κυριότερες επιδημίες που έχουν προκληθεί παγκοσμίως από *V. Parahaemolyticus,* μετά από κατανάλωση αλιευμάτων. Η αυξανόμενη καταγραφή της παρουσίας του παθογόνου σε αλιεύματα στην Ευρώπη, παρουσιάζει ιδιαίτερη σημασία για τη Δημόσια Υγεία και υπογραμμίζει, την ανάγκη ένταξης του *V. Parahaemolyticus,* στα προγράμματα επιτήρησης και ελέγχου.

Λέξεις κλειδιά: V. Parahaemolyticus, τροφολοίμωξη, τροφιμογενής γαστρεντερίτιδα, θερμοανθεκτική τοξίνη, τροφιμογενείς επιδημίες, ασφάλεια αλιευμάτων.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:11:01 EEST - 18.116.85.64

Abstract

In the Greek and international bibliography, more than about 30 species of the genus Vibrio, have been recorded but only 13 of them are pathogenic to humans. All pathogenic vibrios, have been reported, to cause foodborne diseases, although, *V. parahaemolyticus,* is considered the most important pathogenic Vibrio. *V. parahaemolyticus,* is a halophilic bacterium that occurs naturally, in aquatic environments worldwide. The pathogen caused sporadic diarrhea, mainly associated with the consumption of raw or undercooked seafood up to recent years. Since 1996, the incidence of *V. parahaemolyticus* infections, has increased dramatically. *V. parahaemolyticus*, is the leading cause, of seafood-associated bacterial gastroenteritis in the United States and of the half foodborne outbreaks, in some Asian countries. This increase in incidence, has been related to the emergence of the O3:K6 serovar. The pathogenic *V. parahaemolyticus* strains, can produce a thermostable direct hemolysin, or a thermostable direct hemolysin-related hemolysin, which are encoded by the tdh and trh genes, respectively.

Vibrio parahaemolyticus, has not been included in the microbiological criteria of E.U. Food legislation, probably because the risk by this pathogen, was considered rather low in Europe. However, climate change favour, the growth of the pathogen in seawater. Recent studies in Spain and France have shown that, *V. parahaemolyticus* infections from seafood consumption, have been increased. The emergence of the pathogen in Europe is of public health concern and emphasizes, the importance of microbiological surveillance and control programs for *V. parahaemolyticus*.

Keywords : V. parahaemolyticuspathogen, infection, food-borne gastroenteritis, heat-resistant toxin, foodborne outbreaks, seafood safety.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:11:01 EEST - 18.116.85.64

Εισαγωγή

Τα αλιεύματα, αποτελούν την μοναδική κατηγορία αγροτικών αγαθών, την οποία ο άνθρωπος, από ανέκαθεν, υφαρπάζε από την φύση, αντί να τα καλλιεργεί και να τα εκτρέφει, όπως συνέβαινε για πολλές χιλιετίες, με όλα τα υπόλοιπα αγροτικά προϊόντα.

Από την μια, ο πληθυσμός της γης, εκτιμάται ότι θα αυξηθεί κι άλλο και θα ανέλθει στα 8,5 δις, μέχρι το 2050, δημιουργώντας, μια αλματωδώς, αυξανόμενη ζήτηση τροφών υψηλής θρεπτικής αξίας, πλούσιων σε πρωτεΐνες, όπως είναι τα αλιεύματα, που αποτελούν, σύμφωνα με στοιχεία του F.A.O., την βασική πηγή πρωτεϊνών για πάνω από 2 δισεκατομμυρία ανθρώπους, στις αναπτυσσόμενες χώρες του πλανήτη.

Από την άλλη, η μείωση της συνολικής παραγωγής αλιευμάτων θαλάσσιας αλιείας, είναι συνεχής και μεγαλύτερη από 30%, για την χρονική περίοδο 2005-2011. Οι λόγοι, είναι γνωστοί. Υπεραλίευση των ιχθυαποθεμάτων, Παράνομη Αλιεία, Περιβαλλοντική υποβάθμιση, Ρύπανση, Κλιματική αλλαγή .Σήμερα, στον πλανήτη μας, 15 από τα 17 σημαντικότερα παγκόσμια αλιευτικά πεδία, έχουν ήδη υπεραλιευθεί και εξαντληθεί[118].

Συνεπώς, η αειφόρος εκμετάλλευση των θαλασσών, σε συνδυασμό με την καλλιέργεια αλιευμάτων (ανάπτυξη των υδατοκαλλιεργειών), είναι επιτακτική ανάγκη, καθήκον και υποχρέωση. Σήμερα, σε παγκόσμιο επίπεδο, οι καλλιέργειες αυτές, αποτελούν τη μόνη ορατή ελπίδα, για την αύξηση της αλιευτικής παραγωγής.

Η μεγάλη σημασία της αλιείας και των υδατοκαλλιεργειών, σε κοινωνικό, οικονομικό, πολιτικό και πολιτιστικό επίπεδο, καταδεικνύεται και από το γεγονός ότι, γύρω στα 36 εκατομμύρια άνθρωποι ανά τον κόσμο, με 80% εξ'αυτών, προερχόμενων από την Ασία, εργάζονται, στον κλάδο της αλιείας, ενώ έμμεσα, στην επεξεργασία, τη μεταφορά και το εμπόριο αλιευμάτων, (υπηρεσίες που συνδέονται με την αλιεία), απασχολούνται άλλα 80 εκατομμύρια άνθρωποι.

Στα κεφάλαια που ακολουθούν, γίνεται μια αποτύπωση, της επικρατούσας κατάστασης, στο πεδίο των ιχθυοκαλλιεργειών και της αλιείας στην Ελλάδα.

Επίσης, αναδυκνύεται, η σπουδαιότητα του κινδύνου στην ασφάλεια των αλιευμάτων .

Ειδικότερα, μελέτάται, η επίδραση και η σημασία του "Vibrio parahaemoliticus", στην ασφάλεια των αλιευμάτων.Γίνεται, συστηματική ανάλυση και καταγραφή παρουσίας και περιστατικών λοιμώξεων από το παθογόνο βακτήριο, σε διάφορες χώρες.Παρατηρείται η επίδραση της κλιματικής αλλαγής, στη συχνότητα εμφάνισης του παθογόνου σε παγκόσμιο επίπεδο. Τέλος επισήμαίνεται, η αναγκαιότητα αναθεώρησης της κείμενης Ευρωπαϊκής νομοθεσίας για την ένταξή του στο μικροβιολογικά κριτήρια.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:11:01 EEST - 18.116.85.64

Κεφάλαιο 1: Αλιεία, Υδατοκαλλιέργειες και Αλιεύματα

1.1. Αλιεία

Από το 1950 έως το 1990, η αλιευτική παραγωγή αυξήθηκε κατά πέντε φορές, κυρίως ως αποτέλεσμα της συνεχούς εξέλιξης της βιομηχανικής αλιείας, μέσω της εφαρμογής νέων τεχνολογιών στον εντοπισμό των ιχθυοαποθεμάτων και της κατασκευής αποδοτικότερων αλιευτικών εξοπλισμών και σκαφών.

Από τα διαθέσιμα στοιχεία και την ετήσια έκθεση του έτους 2017, της Γενικής Διεύθυνσης Αλιείας του Υπουργείου Αγροτικής ανάπτυξης και Τροφίμων και σύμφωνα με το Άρθρο 22 του ΚΑΝ (ΕΕ) 1380/2013 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, καθώς και στοιχεία έρευνας της Ελληνικής Στατιστικής Αρχής για το ίδιο έτος, προκύπτει ότι, ο Ελληνικός επαγγελματικός αλιευτικός στόλος, είναι, ο πολυπληθέστερος αλιευτικός στόλος στην Ε.Ε.. Αποτελείται από περίπου 15.000 επαγγελματικά αλιευτικά σκάφη (14.977 σκάφη στις 31.12.2017). Η πλειοψηφία των σκαφών (περίπου 95,11%), είναι μικρής χωρητικότητας με κινητήρες μικρής ιπποδύναμης και ισχύ μηχανών (71.099,90 GT, και 426.600,51 KW) (ΕΛΣΤΑΤ, 2017) [93].

Τα σκάφη αυτά, διαθέτουν στην αλιευτική τους άδεια, στατικά κυρίως εργαλεία, που διενεργούν πολυειδική και πολυσυλλεκτική αλιεία, (αλιεύουν παράκτια αποθέματα) κατά μήκος της εκτεταμένης ακτογραμμής της ηπειρωτικής χώρας, καθώς και των πολυάριθμων ελληνικών νησιών. Από το σύνολο των σκαφών, περίπου το 1,60% (239 σκάφη), φέρουν πρώτο αλιευτικό εργαλείο το γρι-γρι (PS) και στοχεύουν πελαγικά είδη, κυρίως γαύρο και σαρδέλα, ενώ το 1,70% (256 σκάφη) φέρουν πρώτο αλιευτικό εργαλείο την τράτα βυθού με πόρτες (μηχανότρατα(OTB)) και στοχεύουν βενθικά είδη, κυρίως κουτσομούρες, μπαρμπούνια, μπακαλιάρους και καρκινοειδή, δραστηριοποιούνται δε, σε μεγαλύτερες αποστάσεις από την ακτή, ή ακόμη και στα διεθνή ύδατα (πέραν των 6 ναυτικών μιλίων). (ΕΛΣΤΑΤ, 2017) [93].

Η συνολική αλιευθείσα ποσότητα των αλιευμάτων μέσης και παράκτιας αλιείας το 2017, ανήλθε σε 77.114,3 τόνους και η αξία τους, σε 249.213,4 χιλιάδες ευρώ. Στη μέση αλιεία, το 2017, η ποσότητα των αλιευμάτων ανήλθε σε 48.822,8 τόνους και η αξία τους, σε 109.700,5 χιλ. ευρώ. Στην παράκτια αλιεία, το 2017, η ποσότητα των αλιευμάτων ανήλθε σε 28.291,5 τόνους και η αξία τους, σε 139.512,9 χιλ. ευρώ. Η παράκτια αλιεία, έχει κυρίως τη μορφή παραδοσιακής οικογενειακής δραστηριότητας, που συνδυάζεται και με άλλες ασχολίες, ενώ ασκείται κατά κύριο λόγο από μεγάλης ηλικίας και μη εκπαιδευμένους, επαγγελματίες αλιείς. (ΕΛΣΤΑΤ, 2017) [93].

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:11:01 EEST - 18.116.85.64

Πίνακας 1. Ποσότητα και αξία αλιευμάτων μέσης και παράκτιας αλιείας, 2016 και 2017. (Ποσότητα σε τόνους, αξία σε χιλιάδες ευρώ)

	2016		2017		Μεταβολή (%) 2017/2016	
	Ποσότητα	Αξία	Ποσότητα	Αξία	Ποσότητα	Αξία
Σύνολο	**74.372,5**	**255.715,2**	**77.114,3**	**249.213,4**	**3,7**	**-2,5**
Μέση αλιεία	41.161,8	98.607,8	48.822,8	109.700,5	18,6	11,2
Παράκτια αλιεία	33.210,7	157.107,4	28.291,5	139.512,9	-14,8	-11,2

Πηγή Ελληνική στατιστική Αρχή'http://www.statistics.gr/el/statistics/-/publication/SPA03 (ΕΛΣΤΑΤ 2017) [93]

Στα πλαίσια της εφαρμογής των κανόνων της Κοινής Αλιευτικής Πολιτικής και ειδικότερα μέσω της εφαρμογής του μέτρου της οριστικής παύσης των αλιευτικών δραστηριοτήτων, με οικονομική ενίσχυση, από τα Επιχειρησιακά Προγράμματα Αλιείας, ο Ελληνικός αλιευτικός στόλος, μειώνεται συνεχώς, από το 2003 έως σήμερα. Η μεγαλύτερη μείωση, παρατηρείται στα μικρότερα σκάφη παράκτιας αλιείας (ολικού μήκους < 12μ.). (ΕΛΣΤΑΤ, 2017) [93].

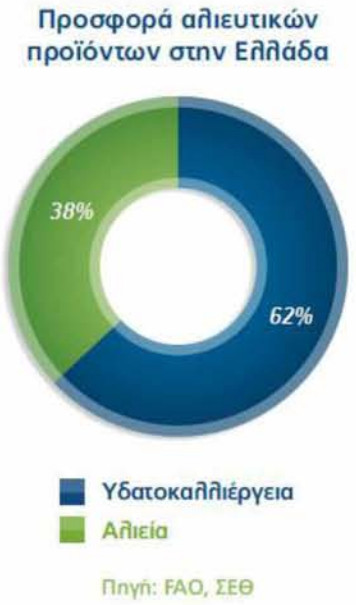
Σε τόνους

Γράφημα 1.: Ποσότητα αλιευμάτων, κατά περιοχή αλιείας, 2017 Πηγή Ελληνική στατιστική Αρχή. 2017) http://www.statistics.gr/el/statistics/-/publication/SPA03(ΕΛΣΤΑΤ [93]

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:11:01 EEST - 18.116.85.64

1.2. Υδατοκαλλιέργειες

Οι υδατοκαλλιέργειες και κυρίως οι ιχθυοκαλλιέργειες, στην Ελλάδα, αποτελούν έναν από τους πιο σημαντικούς κλάδους του πρωτογενούς τομέα ζωικής παραγωγής, με μεγάλο ενδιαφέρον, λόγω της συμβολής τους, στην οικονομική ανάπτυξη της χώρας. των υδατοκαλλιεργειών της χώρας. Ενδεικτικά, αναφέρεται, πως το 1980, μόλις το 2% της εγχώριας παραγωγής αλιευτικών προϊόντων, προερχόταν από τις υδατοκαλλιέργειες, (2.000τόνοι) και η εκτροφή θαλάσσιων μεσογειακών ιχθύων που αποτελεί εδώ και 30 χρόνια, τη βασική δραστηριότητα και το υπόλοιπο 98% από την συλλεκτική αλιεία (105.651 τόνοι). Η αναλογία αυτή, άλλαξε τα επόμενα χρόνια και σύμφωνα με τα τελευταία διαθέσιμα στοιχεία του FAO, εκτιμάται πως το 62% της εγχώριας παραγωγής αλιευτικών προϊόντων προέρχεται από τις υδατοκαλλιέργειες και το υπόλοιπο 38%, από τη συλλεκτική αλιεία. (FAO, ΣΕΘ, 2018) [94].



Γράφημα 2. Προσφορά αλιευτικών προϊόντων στην Ελλάδα, ανάλογα με το σημείο αλίευσης (%) (Πηγή FAO, ΣΕΘ)[94]

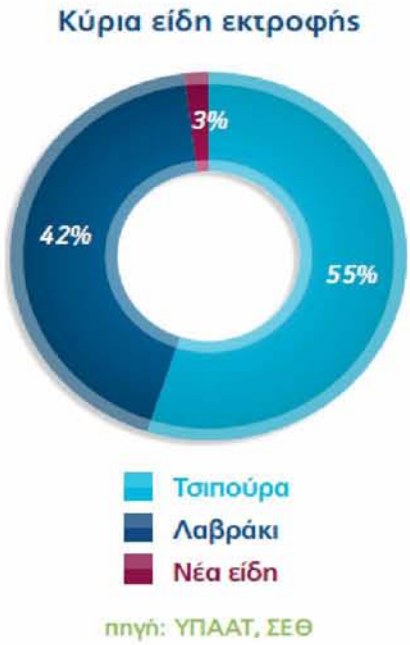
Την τελευταία δεκαετία, όπως φαίνεται και από τον πίνακα 2, υπήρξε μια επιβράδυνση της ανάπτυξης, (προφανώς και λόγω της οικονομικής κρίσης) και ελαφρά μείωση της παραγωγής. (FAO, ΣΕΘ, 2018) [94].

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:11:01 EEST - 18.116.85.64

Πίνακας 2. Προσφορά αλιευτικών προιόντων στην Ελλάδα (ποσότητα σε τόνους)

Η κατάσταση όμως, έχει ήδη αρχίσει να αντιστρέφεται και ο κλάδος να ανακάμπτει και να επανέρχεται σε τροχιά ανάπτυξης. Η Ελλάδα, διατηρεί μια από τις ηγετικές θέσεις στην παραγωγή μεσογειακών ειδών, σε ευρωπαϊκό, αλλά και διεθνές επίπεδο και είναι ιδιαίτερα ανταγωνιστική στον συγκεκριμένο κλάδο.

Τα κύρια είδη που εκτρέφονται, είναι η τσιπούρα και το λαβράκι, αποτελώντας περίπου το 97% των πωλήσεων, ενώ σε πολύ μικρότερη κλίμακα, περίπου 3%, εκτρέφονται όλα τα υπόλοιπα μεσογειακά είδη, μυτάκι, φαγκρί, λυθρίνι, κρανιός, συναγρίδα κ.α. (FAO, ΣΕΘ, 2018) [94].



Γράφημα 3. :Κύρια είδη εκτροφής στην Ελλάδα (%) (Πηγή ΥΠΑΑΤ, ΣΕΘ)[94]

Η θαλάσσια ιχθυοκαλλιέργεια, γνώρισε ραγδαία ανάπτυξη στην Ελλάδα την δεκαετία του ’80, όταν χρησιμοποιήθηκαν πλωτοί ιχθυοκλωβοί, ακολουθώντας το παράδειγμα της μεθόδου

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:11:01 EEST - 18.116.85.64

εκτροφής σολωμού, που χρησιμοποιούσαν μέχρι τότε στην Νορβηγία, για την εκτροφή σολομού. Έτσι, το 1985, ξεκίνησαν διστακτικά, 12 μονάδες, με συνολική παραγωγή περίπου 100 τόνους, αριθμώντας σήμερα, περισσότερες από 300 μονάδες και συνολική παραγωγή πάνω από 100.000 τόνους. [94]

Επίσης, δεύτερη σε σπουδαιότητα κατηγορία υδατοκαλλιέργειας εκτροφής, είναι η οστρακοκαλλιέργεια, καθώς στην χώρα μας, καλλιεργείται σχεδόν κατά αποκλειστικότητα το Μεσογειακό μύδι, σε περιοχές της Βόρειας Ελλάδας. Η πρώτη εκμίσθωση θαλάσσιας έκτασης για καλλιέργεια μυδιών, έγινε το 1955. Επρόκειτο, για μια πασσαλωτή μονάδα στον ΒΑ κόλπο Θεσσαλονίκης. Η πιο συστηματική καλλιέργεια μυδιών, ξεκίνησε το 1970, σε διάφορα κομμάτια των ποταμών Λουδία και Αξιού και στη συνέχεια στην Πιερία, την Ημαθία και την Καβάλα. Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε στην αρχή, ήταν το πασσαλωτό σύστημα που θεωρείται ιδανικό για αβαθή νερά, ενώ το 1985, η μέθοδος long line υιοθετήθηκε για βαθύτερα νερά και εκτόξευσε τον αριθμό των μονάδων από 70, σε 600. (FAO, ΣΕΘ, 2018) [94].

Στις θαλάσσιες υδατοκαλλιέργειες, έρχεται να προστεθεί και η υδατοκαλλιέργεια των εσωτερικών υδάτων, που αποτελεί πηγή κύριας ή συμπληρωματικής απασχόλησης και εσόδων, κατοίκων ορεινών και απομακρυσμένων ηπειρωτικών περιοχών. Εβδομήντα-οκτώ μονάδες εντατικής εκτροφής ιχθύων, που καλλιεργούν κυρίως ιριδίζουσα πέστροφα και σε μικρότερο ποσοστό, κυπρίνο και ευρωπαϊκό χέλι, λειτουργούν ανά την επικράτεια, ενώ 72 μονάδες, συνολικής έκτασης 400 χιλ. στρεμμάτων, παραδοσιακής εκτατικής υδατοκαλλιέργειας, με τις γνωστές οικονομικές και κοινωνικές ιδιαιτερότητες τους, παράγουν, τσιπούρες, λαβράκια, κεφάλους και χέλια, στις ελληνικές λιμνοθάλασσες .

Τέλος, θα πρέπει να επισημανθεί ότι τα τελευταία χρόνια, καλλιεργούνται στην Ελλάδα και υδρόβια φυτά (κυανοβακτήριο σπιρουλίνα, το μακροφύκος ulva κ.α.), τα οποία χρησιμοποιούνται ως πρώτες ύλες στην βιομηχανία φαρμάκων ,τροφίμων και καλλυντικών (συμπληρώματα διατροφής, καλλυντικά, superfoods κλπ.) .(FAO, ΣΕΘ, 2018) [94].

1.2.1. Στατιστικά στοιχεία

Από τα διαθέσιμα στοιχεία και την ετήσια έκθεση έτους 2018, του Συνδέσμου Ελλήνων θαλασσοκαλλιεργητών, καθώς και στοιχεία έρευνας της Ελληνικής Στατιστικής Αρχής για το έτος 2017, η καλλιέργεια ψαριών σε θαλάσσια και εσωτερικά ύδατα, το 2017, ήταν συνολικά 133.110 τόνοι, με αξία 584,51 εκ. ευρώ. Τα ψάρια των εσωτερικών υδάτων, αντιστοιχούν στο 1,5% του συνολικού όγκου ιχθυοκαλλιεργειών, ενώ τα ψάρια που καλλιεργούνται στην ανοικτή θάλασσα, αντιστοιχούν στο 98,5%. Η συνολική ποσότητα παραγωγής, από

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:11:01 EEST - 18.116.85.64

υδατοκαλλιέργειες στην Ελλάδα το 2017, ήταν γύρω στους 142.000 τόνους, με αύξηση 6,5%, λόγω της ανάλογης αύξησης παραγωγής στις θαλάσσιες ιχθυοκαλλιέργειες.

Συνολικά τα αλιεύματα, (ψάρια και παρασκευάσματα αυτών),συμβάλουν θετικά στο εμπορικό ισοζύγιο της χώρας. Πρόκειται, για έναν από τους πιο εξωστρεφείς κλάδους της ελληνικής οικονομίας, καθώς υπερβαίνει τις αντίστοιχες εισαγωγές. Η συνολική αξία των εξαγωγών αλιευτικών προϊόντων, το 2017 στην Ελλάδα, ανήλθε σε 653,5εκ. ευρώ, αντιπροσωπεύοντας το 11,4% των συνολικών εξαγωγών αγροτικών προϊόντων της χώρας (6,1 δισ. ευρώ). (κατηγοριοποίηση ΕΛ.ΣΤΑΤ.)[97]

Το ενδοκοινοτικό εμπόριο (615,22 εκ. ευρώ), αντιστοιχεί στο 94% των συνολικών εξαγωγών, με τα ψάρια ιχθυοκαλλιέργειας να αντιπροσωπεύουν το 82% από αυτό το ποσοστό, ενώ οι εξαγωγές σε τρίτες χώρες το υπόλοιπο 8% (59 εκ. ευρώ).

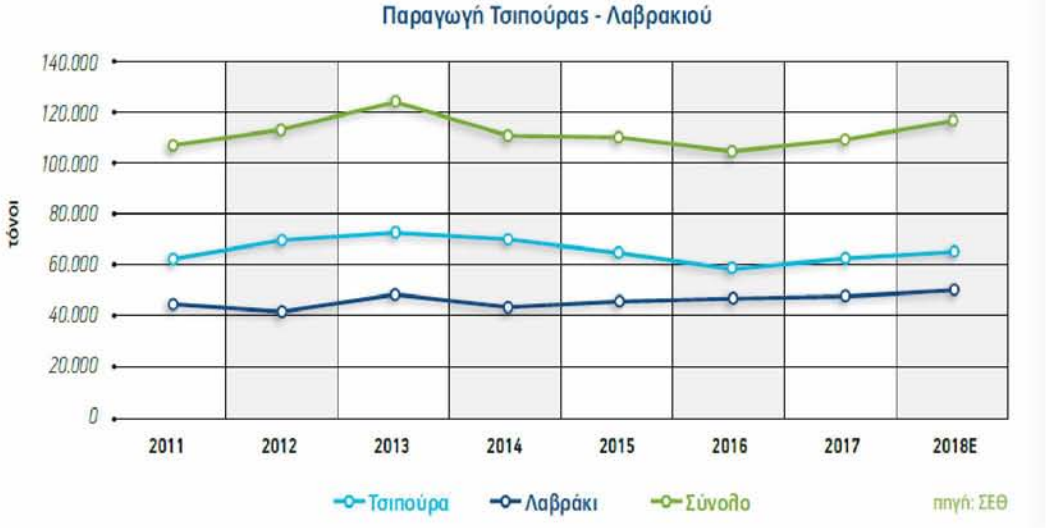
Οι συνολικές εξαγωγές αλιευτικών προϊόντων, άγγιξαν τους 130.620 τόνους, ενώ οι εισαγωγές, τους 102.445 τόνους. Το 2017, τα αλιεύματα ως κλάδος αγροτικών προϊόντων, κατατάσσονται στην τρίτη πιο σημαντική θέση, μετά τα φρούτα και τα λαχανικά, τα έλαια και τα λίπη, με καθαρή συμμετοχή στο Α.Ε.Π. 221,6 εκ. ευρώ, συμβάλλοντας σημαντικά, στο εμπορικό ισοζύγιο.[97]

Πίνακας 3.: Κατάταξη ελληνικών εξαγωγικών αγροτικών προϊόντων ανά κλάδο (αξία εξαγωγών σε χιλιάδες ευρώ)

Το 2018, εκτιμάται ότι η παραγωγή θα παρουσιάσει αύξηση 4,5% και θα ανέλθει στους 117.000 τόνους τσιπούρας και λαβρακιού.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:11:01 EEST - 18.116.85.64

Πίνακας 4.: Εξέλιξη της παραγωγής τσιπούρας και λαβρακιού στις ελληνικές ιχθυοκαλλιέργειες την τρέχουσα δεκαετία (σε τόνους).



Από τα πρώτα κιόλας χρόνια ανάπτυξης της ελληνικής θαλάσσιας ιχθυοκαλλιέργειας, διαφάνηκε ο εξαγωγικός χαρακτήρας της. Τόσο στην Ευρώπη, όσο και στις τρίτες χώρες, τα Ελληνικά προϊόντα λόγω της υψηλής τους διατροφικής αξίας, της εγγυημένης τους φρεσκότητας και της πιστοποιημένης τους ποιότητας, απέκτησαν αναγνωρισιμότητα, αξιοπιστία και ικανοποιούν και τον πλέον απαιτητικό καταναλωτή. Στις αγορές της Ιταλίας, της Ισπανίας, της Γαλλίας και του Ηνωμένου Βασίλειου, η τσιπούρα και το λαβράκι της ελληνικής ιχθυοκαλλιέργειας, έχουν πλέον τη δική τους «ταυτότητα», και έχουν καλύψει σημαντικά μερίδια της αγοράς αλιευμάτων τους [97].

Σήμερα, εκτιμάται ότι στην Ελλάδα λειτουργούν περίπου 320 μονάδες καλλιέργειας, με συνολική παραγωγή περί τους 120 χιλ. τόνους φρέσκου ψαριού, καθώς επίσης, 30 ιχθυογεννητικοί σταθμοί, που παράγουν περίπου 450 εκατομμύρια ιχθύδια (γόνου), ενώ απασχολούν περισσότερους από 10.000 εργαζόμενους. Στον κλάδο σήμερα δραστηριοποιούνται 110 εταιρείες, εκ των οποίων οκτώ (8), είναι εισηγμένες στο Χ.Α.Α. [97]

Ο «Στρατηγικός Σχεδιασμός και το Όραμα του Πολυετούς Εθνικού Στρατηγικού Σχεδίου για την ανάπτυξη των υδατοκαλλιεργειών στην Ελλάδα, 2014-2020», προβλέπει μια μέση ετήσια αύξηση της παραγωγής κατά 7%, σχεδόν διπλάσια, από την ετήσια αύξηση 4% που προσδιορίζεται από την ΕΕ. Η Ελλάδα, αντιπροσωπεύει σχεδόν το 62% της παραγωγής τσιπούρας και λαβρακιού στην Ε.Ε.

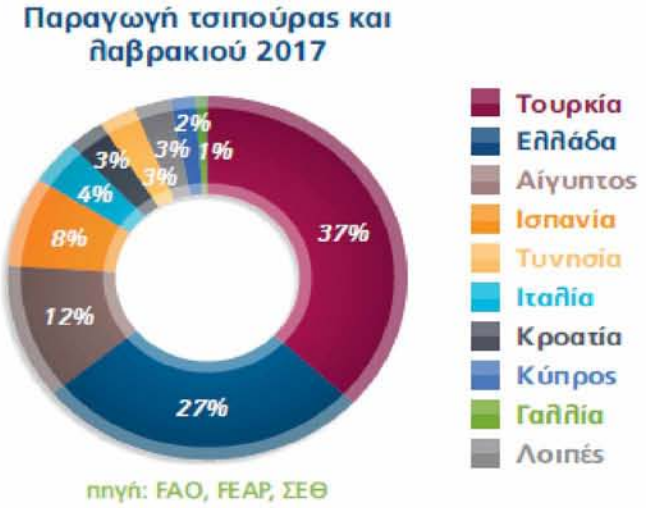
Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:11:01 EEST - 18.116.85.64

Πίνακας 5.: Εξέλιξη της παραγωγής αλιείας και υδατοκαλλιέργειας από το 1950 σε παγκόσμιο επίπεδο(σε τόνους)

Η υδατοκαλλιέργεια, παρέχει ήδη περισσότερα αλιευτικά προϊόντα στην ανθρωπότητα, από ότι η ελεύθερη αλιεία, όπως φαίνεται στον πίνακα 5 (92,01 εκ. τόνοι το 2016).

Η Ασία παράγει σχεδόν το 92% του συνολικού όγκου ανά τον κόσμο, προϊόντων υδατοκαλλιέργειας (101,51 εκ. τόνοι).

Το 2016, τα ψάρια υδατοκαλλιέργειας αποτέλεσαν σχεδόν το 49% της παγκόσμιας παραγωγής (54,09 εκ. τόνοι). Η μεσογειακή υδατοκαλλιέργεια, το 2017, ανήλθε σε 416.724 τόνους (220.167 τόνοι τσιπούρας, 196.557 τόνοι λαβρακιού), παρουσιάζοντας αύξηση 11,8% σε σχέση με το 2016. Η Ελλάδα, βρίσκεται στις δύο πρώτες χώρες παραγωγής ψαριών μεσογειακής υδατοκαλλιέργειας, αντιπροσωπεύοντας το 29% της παραγωγής τους διεθνώς [97.]



Γράφημα 4.:Κύριες χώρες παραγωγής τσιπούρας και λαβρακιού παγκοσμίως το 2017 (%)

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:11:01 EEST - 18.116.85.64

1.3. Αλιεύματα

Όλοι οι ζωντανοί οργανισμοί που ζουν στη θάλασσα, τις λίμνες, τους ποταμούς ή τα ιχθυοτροφεία και καταναλώνονται από τον άνθρωπο, ως τροφή, αποτελούν τα αλιεύματα. Επίσης, αλίευμα αποτελεί, η συνολική βιομάζα ενός, ή περισσοτέρων ειδών, που αφαιρείται από το οικοσύστημα με το ψάρεμα. Ο αριθμός των συνηθέστερων γνωστών ειδών αλιευμάτων στην Ελλάδα, είναι περισσότερα από εκατό και απεικονίζονται συνοπτικά στο παρακάτω σχήμα 1.

Η σημασία των αλιευμάτων, στα πλαίσια μιας ισορροπημένης διατροφής, τύπου ΜεσογειακήςΔιατροφής, είναι θεμελιώδης. Αποτελούν βασική πηγή πρωτεϊνών, με όλα τα απαραίτητα αμινοξέα και είναι πλούσια σε βιταμίνες του συμπλέγματος Β (Β1, Β2, Β3 και Β12) A , D, καθώς και ασβέστιο, φωσφόρο, ψευδάργυρο, ιώδιο και σίδηρο. Οι πρωτεΐνες των ψαριών, πέρα από μεγάλη βιολογική αξία, είναι και πιο εύπεπτες από τις ζωικές, μιας και η ποσότητα συνδετικού ιστού και κολλαγόνου τους είναι συγκριτικά μικρότερη.[95]

Σχήμα 1:Συνοπτική ταξινόμηση των διαφόρων αλιευμάτων (Πηγή:Κέντρο Ελέγχου Τροφίμων Διεύθυνσης Κτηνιατρικής Θεσσαλονίκης, 2006) [116]

Επίσης, η περιεκτικότητά τους σε λίπος, διαφέρει από είδος σε είδος, ενώ είναι πλούσιο σε ω-3 πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, μικρής και μακράς αλύσου (λινολενικό οξύ, DHA, EPA).Το λίπος αυτό, ανήκει στα λεγόμενα «καλά» λιπαρά και έχει συγκεντρώσει εδώ και καιρό το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας, καθώς έχει συνδεθεί με μια σειρά από ευεργετικές δράσεις για τον ανθρώπινο οργανισμό. Μερικές από αυτές αφορούν, την φυσιολογική λειτουργία της καρδιάς, την μείωση του πόνου των αρθρώσεων, την βελτίωση της νευρολογικής λειτουργίας, την προστασία έναντι κάποιων μορφών καρκίνου, καθώς και την διατήρηση της φυσιολογικής όρασης.[95]

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:11:01 EEST - 18.116.85.64

Η θρεπτική αξία των ψαριών, δεν είναι ανάλογη της εμπορικής τιμής τους. Τα λεγόμενα «ψιλά ψάρια», όπως η σαρδέλα, ο γαύρος, το σαφριδάκι κ.α., έχουν υψηλή βιολογική αξία, δεν υστερούν σε λευκώματα και λίπος, σε σχέση με τα πολύ ακριβότερα άλλα είδη ψαριών [95].

Πολλές Ελληνικές Εταιρείες ιχθυοκαλλιέργειας, χρησιμοποιούν τον ισχυρισμό υγείας, στα Πλαίσια του Κανονισμού ΕΕ 1924/2006, σύμφωνα με τον οποίο, «Η κατανάλωση εκτρεφόμενης τσιπούρας και λαβρακιού, ως πλούσια πηγή ωμέγα-3 πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (EPA & DHA) και σαν μέρος ενός υγιεινού τρόπου ζωής, βοηθά στη διατήρηση της φυσιολογικής λειτουργίας της καρδιάς, στη διατήρηση της φυσιολογικής πίεσης τους αίματος και στη διατήρηση των φυσιολογικών επιπέδων τριγλυκεριδίων, στο αίμα».[95]

Υποστηρίζουν λοιπόν, στις διεθνείς τους διαφημιστικές καμπάνιες, ότι, η κατανάλωση τσιπούρας και λαβρακιού 2 φορές την εβδομάδα, «θωρακίζει» τον ανθρώπινο οργανισμό και του προσφέρει, όλες τις ευεργετικές ιδιότητες των ωμέγα-3 πολυακόρεστων λιπαρών οξέων.[95]

1.4. Εξασφάλιση ποιότητας, υγιεινής και ασφάλειας αλιευμάτων

Από όλα τα παραπάνω, φαίνεται ξεκάθαρα η σπουδαιότητα και η σημασία της εξασφάλισης ποιοτικών, αλλά και υγιεινών προϊόντων αλιείας και υδατοκαλλιεργειών. Μέσα σε ένα ιδιαίτερα απαιτητικό περιβάλλον, διεθνών αγορών και στα πλαίσια, της ελεύθερης διακίνησης προϊόντων, μεταξύ των κρατών μελών της Ευρωπαϊκής Ένωσης, σε αγορές που μεταβάλλονται με ταχύτατους ρυθμούς, είναι προφανής η ανάγκη, για βέλτιστα επίπεδα ποιότητας υγιεινής και ασφάλειας των αλιευμάτων.[94]

Στην Ευρώπη, άλλα και στην Ελλάδα, οι υδατοκαλλιέργειες, χαρακτηρίζονται από υψηλά στάνταρντ, σε θέματα περιβαλλοντικής προστασίας, υγείας των εκτρεφόμενων ειδών, αλλά και της ασφάλειας των καταναλωτών[94].

Σε γενικές γραμμές, οι επίσημοι έλεγχοι για την εκτίμηση της ποιότητας υγιεινής και ασφάλειας των αλιευμάτων, μπορεί να περιλαμβάνει:

α) **Εξέταση με τις αισθήσεις**: Μεταβολές σε χαρακτηριστικά, που γίνονται αντιληπτά μέσω της όρασης, της όσφρησης, της γεύσης, της αφής και της ακοής.

β) **Βιοχημικές/χημικές μεθόδους**: Η συγκέντρωση των χημικών ενώσεων που μετρώνται (τριμεθυλαμίνη, διμεθυλαμίνη, αμμωνία, πτητικές αζωτούχες ενώσεις και αιθανόλη) αυξάνονται, ή μειώνονται, ανάλογα με το βαθμό της μικροβιακής αλλοίωσης ή της αυτόλυσης). Επίσης, μετράται η οξειδωτική τάγγιση μέσω του προσδιορισμού των υδροπεροξειδικών λιπιδίων.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:11:01 EEST - 18.116.85.64

γ) **Φυσικές μεθόδους**: Μέτρηση ηλεκτρικών ιδιοτήτων δέρματος και των μεταβολών, στους ιστούς μετά το θάνατο, μέτρηση pH, δυναμικού οξειδοαναγωγής (Eh) και της υφής.

δ) **Μικροβιολογικές εξετάσεις**: Εκτίμηση πιθανής παρουσίας βακτηρίων, ή μικροοργανισμών

Η Ευρωπαϊκή Αγορά, προϋποθέτει, την αμοιβαία εμπιστοσύνη στους ελέγχους ποιότητας των τροφίμων που διενεργεί κάθε κράτος-μέλος. Η θέσπιση κοινοτικών ή εθνικών κανόνων, μας εξασφαλίζουν κοινές πρακτικές ελέγχου και επιτήρησης της ποιότητας των τροφίμων, Η ισχύουσα νομοθεσία της Ε.Ε., έχει σαν σκοπό, την προμήθεια φρέσκων, υγιεινών και τοπικά παραγόμενων ειδών διατροφής, λειτουργώντας με βάση την διακίνηση ποιοτικών και ασφαλών προϊόντων, μεταξύ των κρατών μελών της.

Η Ενιαία Ευρωπαϊκή Αγορά, προϋποθέτει την αμοιβαία εμπιστοσύνη στους ελέγχους ποιότητας των τροφίμων που διενεργεί κάθε κράτος-μέλος. Η θέσπιση κοινοτικών ή εθνικών κανόνων, μας εξασφαλίζουν κοινές πρακτικές ελέγχου και επιτήρησης της ποιότητας των τροφίμων και την καλύτερη δυνατή, προστασία του καταναλωτή. Η εφαρμογή Διεθνών αποδεκτών προτύπων ποιότητας, οδήγησε στη Νομοθέτηση, του ονομαζόμενου «Πακέτου Υγιεινής» «from farm to the fork». Εν κατακλείδι, η αδιαμφισβήτητη σημασία των αλιευμάτων, στην διατροφή και την υγεία των ανθρώπων, θα πρέπει να συνοδεύεται από την εξασφάλιση της υγιεινής και της ασφάλειας τους.

Οι καλές πρακτικές υγιεινής και οι αρχές HACCP (ανάλυση κινδύνων και κρίσιμα σημεία ελέγχου), εξετάζονται επίσης, στους επίσημους ελέγχους αλιευμάτων.

Από τους ελεγχόμενους κινδύνους στα τρόφιμα (χημικούς,φυσικούς, βιολογικούς), η παρουσία τροφιμογενών παθογόνων μικροοργανισμών, ή τοξινών αυτών σε αυτά, είναι ιδιαίτερα σημαντικοί για την ανθρώπινη υγεία [94].

Η πλειονότητα των περιπτώσεων δηλητηριάσεων από αλιεύματα, προκαλούνται από τοξίνες (βιοτοξίνες, ισταμίνη) και ιούς (norovirus,ιός της ηπατίτιδας Α).

Ειδικότερα το δονάκειο, V. Parahemoliticus, προκαλεί σποραδικά τροφιμογενείς επιδημίες παγκοσμίως, με κοινότερη κλινική εκδήλωση τη γαστρεντερίτιδα, καθώς προκαλεί άμεσες, μεγάλης έκτασης και με υψηλή ένταση συμπτώματα και επιπτώσεις στην ανθρώπινη υγεία, που μπορεί να προκαλέσουν και θάνατο [96].

Ο Ευρωπαϊκός Κανονισμός για τη θέσπιση κριτηρίων ασφάλειας για τα τρόφιμα ΕΚ 2073/2005, όπως τροποποιήθηκε από τον ΕΚ 1441/2007, δεν καθορίζει κριτήρια ασφάλειας, ή κριτήρια υγιεινής κατά την παραγωγική διαδικασία, για το συγκεκριμένο μικροοργανισμό. Η επιστημονική επιτροπή για τα κτηνιατρικά μέτρα, σε σχέση με τη δημόσια υγεία (ΕΕΚΜΔΥ), εξέδωσε γνώμη, για το *Vibrio vulnificus* και το *Vibrio* parahaemolyticus, στις 19-20 Σεπτεμβρίου 2001. Το συμπερασμά της ήταν, ότι τα επιστημονικά στοιχεία που διαθέτουμε σήμερα, δεν υποστηρίζουν τον καθορισμό ειδικών

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:11:01 EEST - 18.116.85.64

κριτηρίων για τα παθογόνα V. vulnificus και V. Parahaemolyticus, στα θαλασσινά. Ωστόσο, συνέστησε, να καθοριστούν κώδικες πρακτικής, για να εξασφαλίζεται η εφαρμογή ορθών πρακτικών υγιεινής. Συγκεκριμένα, έκρινε, ότι θα πρέπει να καθοριστούν κριτήρια, ιδίως για παθογόνους ιούς, σε ζώντα δίθυρα μαλάκια, όταν εξελιχθούν επαρκώς οι αναλυτικές μέθοδοι. Επίσης, επισήμανε την ανάγκη ανάπτυξης αξιόπιστων μεθόδων και για άλλους μικροβιακούς κινδύνους (π.χ. το Vibrio parahaemolyticus) [96].

Σε αρκετά κράτη εκτός Ευρωπαικής Ένωσης, έχουν θεσπιστεί όρια, μιάς και τα προβλήματα που δημιουργεί το συγκεκριμένο βακτήριο, είναι συχνά και έντονα. Έτσι στις ΗΠΑ, σύμφωνα με τον FDA, το όριο λήψης μέτρων στην ISSF, είναι τα 10.000 κύτταρα/g, αφού, η μολύνουσα δόση των εντεροπαθογόνων στελεχών, δεν είναι γνωστή επακριβώς και τα παθογόνα στελέχη του *V. Parahaemolyticus,* έχουν βρεθεί σε λιγότερο από 1%, σε περιβαλλοντικά δείγματα. Στην Ιαπωνία, οι αρχές έθεσαν όριο τα 100 MPN/g τροφίμων[96].

Κεφάλαιο 2: Μικροβιολογικά χαρακτηριστικά του V. parahaemoliticus

2.1. Χαρακτηριστικά του βακτηρίου V. parahaemolyticus

Η παρουσία παθογόνων βακτηρίων στο θαλάσσιο περιβάλλον, εγείρει ανησυχίες σχετικά με την ασφάλεια των τροφίμων, εξαιτίας του γεγονότος ότι, μπορούν να εκδηλωθούν ασθένειες, ανάλογα με τις περιβαλλοντικές συνθήκες [1]. Ένα τέτοιο παράδειγμα παθογόνου μικροοργανισμού, είναι το *Vibrio parahaemolyticus*, το οποίο είναι μέλος του γένους *Vibrio*. Το *V. parahaemolyticus* είναι ένα Gram-αρνητικό αλόφιλο βακτήριο, το οποίο απαντάται ευρέως σε εκβολές ποταμών, καθώς και σε θαλάσσιο και παράκτιο περιβάλλον. Βρίσκεται συνήθως σε περιοχές όπου, επιτρέπεται ελέυθερα η κολύμβηση, με την κινητικότητά του να αποδίδεται στην ικανότητα προσκόλλησής του, μέσω του πολικού του μαστιγίου, σε αδρανείς και ζωντανές επιφάνειες, όπως το ζωοπλαγκτόν, τα ψάρια, τα οστρακοειδή ή οποιοδήποτε αιωρούμενο υλικό κάτω από την επιφάνεια του νερού [2].

Το *Vibrio parahaemolyticus,* απομονώθηκε για πρώτη φορά από τον Tsunesaburo Fujino το 1950, ως αιτιολογικός παράγοντας της μετάδοσης τροφιμογενών ασθενειών, σε ένα μεγάλο ξέσπασμα στην Οσάκα της Ιαπωνίας, στο οποίο καταγράφηκαν 272 περιστατικά, με 20 θανάτους μετά την κατανάλωση του shirasu (νεαρών σαρδελών). Το νέο είδος, ονομάστηκε αρχικά *Pasteurella parahaemolyticus* και αργότερα *Vibrio parahaemolyticus* [3]. Τα στελέχη του *V. parahaemolyticus,* μεταδίδονται με την κατανάλωση ωμών, ή μη επαρκώς θερμικά

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:11:01 EEST - 18.116.85.64

επεξεργασμένων αλιευμάτων, προκαλώντας οξεία γαστρεντερίτιδα [4-5]. Σε σπάνιες περιπτώσεις, μπορεί να προκαλεί λοίμωξη από αμυχές ή τραυματα , ή σηψαιμία, που μπορεί να είναι απειλητική για τη ζωή σε άτομα με βεβαρυμένο ιατρικό ιστορικό [6].

Το γένος *Vibrio,* είναι ταξινομημένο στην οικογένεια *Vibrionaceae* και περιλαμβάνει 30 είδη, που παρουσιάζουν τη μορφολογία και τα χαρακτηριστικά της οικογένειας *Vibrionaceae*. Όλα τα είδη, αναπτύσσονται στους 20°C, ενώ πολλά από αυτά στους 30°C, πολύ λίγα στελέχη στους 4°C, και κανένα στους 50°C. Επίσης, αναπτύσσονται ιδιαίτερα καλά, σε αλκαλικά υποστρώματα (pH 9.0−10.0). Το *V. parahaemolyticus,* είναι αρνητικό κατά Gram, μη σπορογόνο βακτήριο. Έχει σχήμα ραβδιού (ευθύ ή καμπυλοειδές), διαστάσεων 0,5, έως 0,8 μm, σε πλάτος και 1,4 έως 2,6 μm σε μήκος [7]. Ως μέσο για τη μετακίνησή τους, χρησιμοποιούν, μία μόνο πολική βλεφαρίδα (flagellum). Τα περισσότερα είδη, παράγουν οξειδάση και καταλάση και ζυμώνουν τη γλυκόζη χωρίς παραγωγή αερίου [8]. Το βακτήριο αυτό, είναι μέτρια αλόφιλο, εντερικό παθογόνο, που μπορεί να αναπτύσσεται σε συγκεντρώσεις NaCl, μέχρι 8%, αλλά η βέλτιστη ανάπτυξη, παρατηρείται σε περιεκτικότητα 2 έως 3% NaCI [9]. Όλα τα στελέχη του, παράγουν υδρόθειο σε υπόστρωμα Triple Sugar Iron medium (TSI) [10].

Από τα 30 είδη Vibrio, τα 13, θεωρούνται παθογόνα για τον άνθρωπο, συμπεριλαμβανομένων των *V. cholerae, V. mimicus, V. fluvialis, V. parahaemolyticus, V. alginolyticus, V. eincinnatiensis, V. hollisae, V. vulnificus, V. fitrnissii, V. damseìa, V. Metshnikovii* και *V. carchariae*. Όλα τα παθογόνα είδη Vibrio, έχουν αναφερθεί ότι προκαλούν τροφιμογενείς λοιμώξεις, αλλά τα πιο σημαντικά είδη, θεωρούνται τα *V. cholerae, V. parahaemolyticus* και *V. vulnificus* [11].

2.2. Παράγοντες ανάπτυξης του V.parahaemolyticus

Μέσα από την έρευνα και τις διάφορες μελέτες σχετικά με τα χαρακτηριστικά του *V. parahaemolyticus*, φαίνεται, πώς οι κυριότεροι περιβαλλοντικοί παράγοντες οι οποίοι καθορίζουν την ανάπτυξή του, είναι, η θερμοκρασία, το pH, η συγκέντρωση NaCl, η ενεργότητα του νερού, καθώς και η επίδραση της θερμικής επεξεργασίας.

2.2.1. Θερμοκρασία

Η άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης του βακτηρίου, είναι 30-35°C. Στην άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης, όπου ο μικροοργανισμός παρουσιάζει το μέγιστο ρυθμό ανάπτυξης, ο χρόνος διαίρεσης του κυττάρου, είναι, 9-13 λεπτά.Η μέγιστη θερμοκρασία στην οποία αναπτύσσεται το βακτήριο είναι οι 44 °C και η ελάχιστη θερμοκρασία ανάπτυξης του βακτηρίου, που έχει καταγραφεί εργαστηριακά, είναι 5 °C. Στα τρόφιμα έχει αναφερθεί η ανάπτυξη του *V.*

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:11:01 EEST - 18.116.85.64

parahaemolyticus, σε θερμοκρασία 9.5-10 °C. Μεταξύ, 5 – 9°C ο μικροοργανισμός, αναπτύσσεται μόνο, εφόσον είναι κατάλληλες οι συνθήκες pH και περιεκτικότητας σε NaCl [10].

Οι χαμηλότερες θερμοκρασίες που έχουν αναφερθεί για την ανάπτυξη αυτού του βακτηρίου, κυμαίνονται από 3-13°C και εξαρτώνται από το υπόστρωμα. Οι Vanderzant και Nickelson (1972), ανέφεραν μια μείωση των πληθυσμών του *V. parahaemolytcus,* σε ενοφθαλμισμένες ολόκληρες αποφλοιωμένες γαρίδες κατά τη διάρκεια των πρώτων 2 ημερών, όταν είχαν αποθηκευτεί στους 3, 7, 10 και -18°C. Κατά τη διάρκεια των επόμενων 6 ημερών, οι πληθυσμοί παρέμειναν περίπου σταθεροί. Η χαμηλότερη θερμοκρασία, στην οποία παρατηρήθηκε επιβίωση στα αποθηκευμένα δείγματα, ήταν στους 3 °C και -18 °C [14]. Ο Jackson (1974), ανέφερε ως ελάχιστες θερμοκρασίες ανάπτυξης τους 9,5 έως 10,5 °C. Η ανάδευση ενός υποστρώματος, που περιλαμβάνει ζωμό σόγιας από φρυπαστίνη μαζί με 3% χλωριούχο νάτριο και pH 7,2, οδήγησε μερικές καλλιέργειες, να αυξάνονται στους 7 και 8 °C [14].

Οι Thomson και Thacker (1973), έδειξαν ότι το *V. parahaemolyticus,* μπορεί να φτάσει σε υψηλούς πληθυσμούς, όταν, τα στρείδια φυλάσσονται σε θερμοκρασίες, μεγαλύτερες των 8 °C. Έτσι, η αύξηση των πληθυσμών του παθογόνου, παρατηρήθηκε κατά τη συντήρηση των στρειδιών, στους 10 και 12 °C, ενώ αντίθετα, καταγράφηκε μείωση των πληθυσμών που ενοφθαλμίστηκαν κατά τη συντήρηση τους, στους -20,0°C και 4 °C. Ο μικροοργανισμός αυτός, μπορεί να επιβιώσει για μεγάλα χρονικά διαστήματα, στην επιφάνεια του δέρματος των ιχθύων της θάλασσας, όταν διατηρούνται σε ψυγεία, σε θερμοκρασίες 5 και 8 ° C [16].

Ο Asakawa (1966), ανέφερε μεγαλύτερο ποσοστό μείωσης των πληθυσμών του *V. parahaemolyticus*, όταν διατηρήθηκε *invitro* στους -10 °C, σε σχέση με τους -20 °C. Στην ίδια μελέτη, καταγράφηκε επιβίωση του παθογόνου σε νωπό τόνο, η οποία ήταν υψηλότερη κατά την συντήρηση, σε θερμοκρασίες -10 και -20 °C σε σχέση με την συντήρηση στους 0 °C. Οι Johnson και Liston (1973), μελετώντας την επιβίωση του σε θαλάσσιους ιχθύες και οστρακοειδή που διατηρούνται υπό ψύξη, ή, ως κατεψυγμένα προϊόντα, διαπίστωσαν πώς σε φιλέτα ψαριών, ο παθογόνος μικροοργανισμός, επιβίωσε για περισσότερες από 15 ημέρες, στους 1 °C και για περισσότερες από 60 ημέρες, στους -15 °C και -30 °C, αντίστοιχα. Στην ίδια μελέτη, ο μικροοργανισμός, επιβίωσε σε καβούρια που συντηρήθηκαν στους 1 °C, -15 °C και -30 °C, για 30 ημέρες. Οι Johnson et al. (1973), κατέδειξαν ότι, το *V. parahaemolyticus,* έχει την ικανότητα να επιβιώνει, για τουλάχιστον 3 εβδομάδες στους 4 °C, με μικρή ή μείωση του πληθυσμού, καταδεικνύοντας πώς, το βακτήριο είναι ανθεκτικό και μπορεί να επιβιώνει σε χαμηλές θερμοκρασίες.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:11:01 EEST - 18.116.85.64

Το *V. parahaemolyticus,* μπορεί να απομονωθεί από δείγματα στρειδιών και θαλάσσιων ιζημάτων, ακόμη και όταν αυτά βρίσκονται σε θερμοκρασίες, κάτω από 10 °C. Ωστόσο, απομονώνεται λιγότερο εύκολα από το θαλασσινό νερό και μάλιστα καθόλου, όταν η θερμοκρασία του νερού, πέφτει κάτω από 13°C [20]. Οι Kaneko και Colwell (1973), διαπίστωσαν την παρουσία του βακτηρίου, σε υψηλούς πληθυσμούς στο ζωοπλαγκτόν, ιδιαίτερα όταν η θερμοκρασία του νερού, καταγράφονταν υψηλότερη από 14 °C.

2.2.2. pH

Το άριστο *pH* για την ανάπτυξη του βακτηρίου, είναι 7,5-8,6, με ελάχιστη τιμή pH, όπου μπορεί να αναπτυχθεί το βακτήριο, το 4,8 και μέγιστη τιμή, το 11,0. Η ανάπτυξη του βακτηρίου στην κατώτατη τιμή pH (4,8), προϋποθέτει άριστες συνθήκες θερμοκρασίας και περιεκτικότητας σε NaCl, δηλαδή η θερμοκρασία, να είναι 30 °C και η περιεκτικότητα σε NaCl, 3% [10].

Έχει βρεθεί, πώς το κατώτερο όριο θερμοκρασίας για την ανάπτυξη του βακτηρίου, επηρεάζεται σημαντικά από το pH. Από έξι βακτηριακά στελέχη, τα οποία εξετάστηκαν *invitro*, το χαμηλότερο pH, στο οποίο παρατηρήθηκε ανάπτυξη στους 5 °C, ήταν το 7,3 [14]. Έχει αναφερθεί, πως συνήθως η ανάπτυξή του *V. parahaemolyticus,* συμβαίνει ανάμεσα σε τιμές pH 5,0 έως 11,0. Οι πληθυσμοί, όταν το pH ρυθμίστηκε, από 6,0 έως 10, παρέμειναν βιώσιμοι για περίπου δύο ώρες, μόνο [22].

2.2.3. Συγκέντρωση NaCl

Το *V. Parahaemolyticus,* αποτελεί ένα αλόφιλο βακτήριο και η άριστη συγκέντρωση NaCl, για την ανάπτυξη του είναι 2-4%. Σε συγκέντρωση NaCl μικρότερη από 2%, καθώς και σε συγκεντρώσεις 4-8% NaCl, παρουσιάζεται σημαντική μείωση του ρυθμού ανάπτυξης. Μπορεί να αναπτυχθεί σε συγκέντρωση αλατιού 8%, αλλά παρουσία 10% NaCl, αναστέλλεται η ανάπτυξή του [7].

Πρέπει να επισημανθεί ότι, ο συγκεκριμμένος μικροοργανισμός, απαιτεί NaCl για να αναπτύσσεται και να πολλαπλασιάζεται σε υποστρώματα και τρόφιμα και η ελάχιστη συγκέντρωση που απαιτείται συνήθως, είναι μεγαλύτερη από 0,5%. Επίσης, η παραγωγή αιμολυσίνης, η οποία σχετίζεται με το μολυσματικό χαρακτήρα του *V. parahaemolyticus*, έχει αποδειχθεί ότι αυξάνεται σημαντικά, ύστερα από έγχυση με 0,5%, NaCl. Η συγκέντρωση NaCl 3 %, θωρείται ευρέως αποδεκτή, ως η βέλτιστη συγκέντρωση για την ανάπτυξή του [7].

Ωστόσο, υπάρχουν διαφορετικές απόψεις όσον αφορά τη συγκέντρωση μέγιστης ανοχής του μικροοργανισμού, στο χλωριούχο νάτριο. Οι Molenda et al. (1972), παρατήρησαν πώς το

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:11:01 EEST - 18.116.85.64

βακτήριο αυτό, παρουσιάζει αδυναμία να αναπτυχθεί σε κατάλληλα θρεπτικά μέσα που περιέχουν, τουλάχιστον 10% NaCl. Η μέγιστη συγκέντρωση NaCl, η οποία είναι ανεκτή από το *V. parahaemolyticus,* είναι 8%. Οι εμφανείς όμως αποκλίσεις που υπάρχουν, σχετίζονται με τα διαφορετικά θρεπτικά μέσα, τα συστατικά τους, το pH, τις θερμοκρασίες επώασης και τη μεταβλητότητα μεταξύ των διάφορων στελεχών. Έχει αποδειχθεί ότι, τα διάφορα βακτηριακά στελέχη, δεν είναι ομοιογενή μεταξύ τους, όσον αφορά την απαίτηση για ιόντα νατρίου και την υποκατάσταση, με άλλα μονοσθενή κατιόντα. Η ανοχή του *V. parahaemolyticus* στις χαμηλές και υψηλές συγκεντρώσεις NaCl, σχετίζονται με την οσμωτική, καθώς και την ιοντική ευαισθησία. Μπορεί αρκετά εύκολα να αδρανοποιηθεί σε απεσταγμένο νερό και η αντίστασή του, στην απενεργοποίηση αυξάνεται, καθώς ο οργανισμός, περνάει από την εκθετική, στη στατική φάση ανάπτυξης [23].

2.2.4. Ενεργότητα νερού

Η Beuchat (1974), ανέφερε ότι η βέλτιστη ανάπτυξη του *V. Parahaemolyticus* παρατηρήθηκε σε ζωμό TSB, που περιείχε 2,94% NaCl και αντιστοιχεί σε a_W 0,992. Φαίνεται ότι ελάχιστη aw, για την ανάπτυξη του βακτηρίου, εξαρτάται από τη διαλυμένη ουσία που χρησιμοποιείται για τον έλεγχο της και είναι ένας χρήσιμος δείκτης για την εκτίμηση της ανάπτυξής του, στα τρόφιμα. Η ελάχιστη τιμή ενεργότητας νερού (aw), για την ανάπτυξη του είναι 0,94.

Η ελάχιστη τιμή a_wγια την ανάπτυξη σε θρεπτικό ζωμό TSB με NaCl, είναι 0,948, στους 29 ° C. Όταν διάφορες διαλυμένες ουσίες προστέθηκαν σε TSB που περιείχε 2,9% NaCl, επιτεύχθηκε μείωση της ελάχιστης a_w για ανάπτυξη. Η ελάχιστη a_w για την ανάπτυξη του *V. parahaemolyticus,* ήταν 0,937, όταν η γλυκερόλη χρησιμοποιήθηκε ως διαλυμένη ουσία δοκιμής, 0,945 για το χλωριούχο κάλιο, 0,957 για τη σακχαρόζη, 0,983 για τη γλυκόζη, και 0,986 για το προπυλενοξείδιο [24].

2.2.5. Ανθεκτικότητα στη θερμική επεξεργασία

Το *V. parahaemolyticus,* είναι ευαίσθητο στη θέρμανση και ο βαθμός ευαισθησίας που εμφανίζει, είναι συνάρτηση των ακόλουθων παραμέτρων:

1. Της θερμοκρασίας ανάπτυξης του βακτηρίου. Ειδικότερα, το βακτήριο, είναι περισσότερο ανθεκτικό, εφόσον αναπτυχθεί σε υψηλές θερμοκρασίες.

2. Του υποστρώματος ανάπτυξης όπου πραγματοποιείται, η θερμική επεξεργασία. Ειδικότερα, σε μελέτες *Invitro,* όσο αυξάνεται η συγκέντρωση του NaCl, από 3% έως 12%, τόσο αυξάνεται και η ανθεκτικότητα του βακτηρίου, στη θερμική επεξεργασία [7].

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:11:01 EEST - 18.116.85.64

Η ευαισθησία του μικροοργανισμού, στην αδρανοποίηση σε αυξημένες θερμοκρασίες, εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό, από τις εργαστηριακές συνθήκες που χρησιμοποιούνται για την ανάπτυξή του, καθώς και την τοποθεσία στην οποία, βρίσκεται κατά τη διάρκεια της θερμικής επεξεργασίας. Μέσα από τα πειράματα που έκαναν οι Vanderzant και Nickelson (1972), με αρχική συγκέντρωση πληθυσμού 2 x 10^6/ ml, το *V. parahaemolyticus,* μπορούσε να ανακτηθεί από δείγματα τα οποία θερμάνθηκαν για 15 λεπτά, στους 60 ° C ή 80 ° C.

Ο Temmyo (1966), ανέφερε ότι, το *V. parahaemolyticus,* θα μπορούσε να θανατωθεί εαν θερμανθεί σε διάλυμα πεπτόνης για 10 λεπτά, στους 55 ° C, ή για 5 λεπτά, στους 60 ° C. Στην ίδια μελέτη, εξετάστηκε επίσης η ευαισθησία του οργανισμού στη θέρμανση, σε συνθήκες που προσομοιάζουν εκείνες, που θα μπορούσαν να υπάρχουν σε εγκαταστάσεις επεξεργασίας τροφίμων, σε εστιατόρια, ή και σε σπίτια. Αλιεύματα, όπως χταπόδια και οι σουπιές (ενοφθαλμισμένα με *V.parahaemolyticus*), αφού καλύφθηκαν με αλεύρι και τηγανίστηκαν σε λάδι για περίπου 2 λεπτά στους 180 ° C, στη συνέχεια όταν εξετάστηκαν, δεν ανιχνεύθηκαν πληθυσμοί του παθογόνου.

Οι καμπύλες θανάτωσης για τα διάφορα στελέχη του *V. parahaemolyticus,* έχει παρατηρηθεί ότι, ακολουθούν διφασικά μοτίβα. Οι Baab και Johnson (1974), ανέφεραν βραδύτερους ρυθμούς αδρανοποίησής του κατά τη θερμική επεξεργασία, όταν είχε προηγηθεί θέρμανση στους 49 °C. Ο Goldmintz (1974), παρατήρησε την ίδια συμπεριφορά του παθογόνου, όταν τα κύτταρα θερμάνθηκαν αρχικά στους 48 και 55 °C. Όταν η θέρμανση όμως, πραγματοποιήθηκε στους 47 °C σε ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει αυξημένα επίπεδα NaCl, καταγράφηκε μία διαφορετική συμπεριφορά του βακτηρίου, υποδεικνύοντας ότι η παρουσία του NaCl, φαίνεται να έχει προστατευτική επίδραση έναντι της θερμικής επεξεργασίας. Οι Covert και Woodburn (1972), παρατήρησαν ότι σε ζωμό TSB, το παθογόνο ήταν λιγότερο ευαίσθητο στην θερμική επεξεργασία στους 48 ° C, σε συγκεντρώσεις NaCl που κυμαίνονταν στο 12°/$_o$.

Η θερμοκρασία ανάπτυξης, καθώς και η περιεκτικότητα σε χλωριούχο νάτριο του μέσου ανάπτυξης, επηρεάζει τη θερμική αντίσταση του *V. parahaemolyticus*. Τα κύτταρα που αναπτύσσονται στους 21 °C, ήταν περισσότερο ευαίσθητα στη θέρμανση από ότι τα κύτταρα, που αναπτύχθηκαν στους 29 °C. Τα κύτταρα που καλλιεργήθηκαν στους 29 °C, ήταν με τη σειρά τους, πιο ευαίσθητα στη θερμική επεξεργασία, από τα κύτταρα που αναπτύσσονται στους 37 °C. Κύτταρα που καλλιεργήθηκαν σε TSB, που περιείχε 3,0 ή 7,4% NaCl, ήταν περισσότερο ανθεκτικά, σε σύγκριση με εκείνα που καλλιεργούνται σε ζωμό που περιέχουν 0,5 °/$_o$, αλάτι [9].

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:11:01 EEST - 18.116.85.64

Κεφάλαιο 3.: Λοιμογόνα χαρακτηριστικά του V.parahaemoliticus

3.1. Τροφιμογενής λοίμωξη από V. parahaemolyticus

Το είδος *V. parahaemolyticus* είναι ένα εντεροπαθογόνο βακτήριο, το οποίο προκαλεί αυτοπεριοριζόμενη γαστρεντερίτιδα και έχει μελετηθεί καλύτερα από όλα τα είδη του γένους *Vibrio* spp. Χαρακτηριστικό είναι ότι, η προσβολή άπό *V. parahaemolyticus,* προκαλεί διάφορες λοιμώξεις όπως γαστρεντερίτιδα, επιμολύνσεις τραύματος, ενώ σε πιο σοβαρές περιπτώσεις μπορεί να προκαλέσει σηψαιμία. Παρόλο που η συχνότητά της τροφιμογενούς λοίμωξης από *V. parahaemolyticus* ήταν σχετικά χαμηλή, στις Ηνωμένες Πολιτείες, τα τελευταία χρόνια, έχει αυξηθεί ιδιαίτερα. Επίσης, αποτελεί το συχνότερο αίτιο βακτηριακής γαστρεντερίτιδας στην περιοχή της Ασίας και ειδικά στην Ιαπωνία.

Το βακτήριο απαντάται φυσιολογικά, σε παράκτια νερά σε όλο τον κόσμο, καθώς και σε ψάρια και οστρακοειδή. Στον άνθρωπο, η γαστρεντερίτιδα που προκαλείται από το *V.parahaemolyticus,* σχετίζεται κατά κύριο λόγω με τα αλιεύματα (ψάρια, καβούρια, γαρίδες, αστακοί, μύδια και στρείδια κ.α.), τα οποία καταναλώθηκαν ωμά ή όχι επαρκώς θερμικά επεξεργασμένα. Το 2001, η Επιστημονική Επιτροπή Κτηνιατρικής της Ευρωπαϊκής Επιτροπής κατέληξε στο συμπέρασμα ότι, σπάνια έχουν αναφερθεί εξάρσεις του βακτηρίου στην Ευρώπη. Επειδή ο κίνδυνος μόλυνσης θεωρείται χαμηλός στην Ευρώπη, το *V.parahaemolyticus* αποκλείστηκε από το Ευρωπαϊκό Δίκτυο Επιδημιολογικής Επιτήρησης και Ελέγχου Μεταδοτικών Ασθενειών και από το Σύστημα Μικροβιολογικής Επιτήρησης για τη λοιμώδη γαστρεντερίτιδα. Το *V. parahaemolyticus,* αποκλείεται επίσης από τις ισχύουσες ευρωπαϊκές μικροβιολογικές απαιτήσεις για τις περιοχές συγκομιδής οστρακοειδών και τα έτοιμα για κατανάλωση θαλασσινά [33].

Το *V. parahaemolyticus* είναι η κύρια αιτία βακτηριακής γαστρεντερίτιδας στις Ηνωμένες Πολιτείες, που σχετίζεται με τα αλιεύματα. Ειδικότερα, από το 1973 μέχρι το 1998, εκδηλώθηκαν στις Η.Π.Α. 40 περιστατικά τροφιμογενούς λοίμωξης από *V. parahaemolyticus*, οι οποίες αφορούσαν περισσότερα από 1000 άτομα. Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, τροφιμογενή περιστατικά λοιμώξεων από αυτό το παθογόνο, σημειώνονται κυρίως στις χώρες της Ανατολικής Ασίας, όπου παρασκευάζονται φαγητά με ωμά ή μη επαρκώς θερμικά επεξεργασμένους ιχθύες και οστρακοειδή. Ειδικά στην Ιαπωνία, το 50−70% όλων των τροφιμογενών λοιμώξεων, οφείλονται σε *V. parahaemolyticus*.

Η επώαση της νόσου, διαρκεί συνήθως 3−30 ώρες. Τα συμπτώματα είναι, εμετός, διάρροια, κολικοί, πυρετός και διαρκούν 2−5 ημέρες. Η θνησιμότητα είναι εξαιρετικά χαμηλή. Περίπου 10^5−10^7 cfu, χρειάζονται για να προκληθεί η ασθένεια. Το *V. Parahaemolyticus*

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:11:01 EEST - 18.116.85.64

απομονώθηκε για πρώτη φορά εξαιτίας τροφιμογενών επιδημιών στην Ιαπωνία, το 1950. Στην Ινδία, απομονώθηκε αρχικά από ένα περιστατικό γαστρεντερίτιδας [34] και οι αιτιολογικές μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί για την οξεία διάρροια, δείχνουν ότι, η γαστρεντερίτιδα η οποία προκαλείται από αυτό το βακτήριο, αποτελεί τη δεύτερη συχνότερη ασθένεια μετά τη χολέρα.

Ο Matsumoto et al. [36] παρατήρησε ότι, η εμφάνιση μολύνσεων από *V. Parahaemolyticus* τα τελευταία χρόνια, έχει αυξηθεί ιδιαίτερα σε πολλά μέρη του κόσμου, εξαιτίας κυρίως της ανάδυσης του O_3:K_6 οροτύπου, ο οποίος περιέχει μόνο το γονίδιο thd, που είναι υπεύθυνο για τις περισσότερες επιδημίες παγκοσμίως.

3.2. Λοιμογόνοι παράγοντες

Τα στελέχη του *Vibrio parahaemolyticus,* έχουν έναν αριθμό διαφορετικών λοιμογόνων παραγόντων, που περιλαμβάνουν προσκολλητίνες, τη θερμοανθεκτική αιμολυσίνη TDH, την αιμολυσίνη σχετιζόμενη με την TDH (trh), καθώς και δύο τύπου III συστήματα έκκρισης, T3SS1 και T3SS2 [38]. Τα στελέχη αυτά, κωδικοποιούν το σύστημα πρωτεινών T3SS1, για να εξασφαλιστεί η επιβίωσή τους στο περιβάλλον [39]. Το σύστημα T3SS1, διαθέτει έναν αριθμό παραγόντων που προκαλούν τη λύση των κυττάρων στο μολυσμένο ξενιστή, επιτρέποντας την απελευθέρωση ουσιωδών θρεπτικών συστατικών [40]. Επιπλέον, κάποια στελέχη τα οποία διαθέτουν το σύστημα πρωτεϊνών T3SS2, τα γονίδια tdh και trh, παρουσιάζουν διαφορετικούς βαθμούς παθογένειας. Και οι δύο αυτοί παράγοντες, είναι πιθανό να συμβάλλουν στην επιβίωση των στελεχών στο περιβάλλον, όπως και στον αποικισμό ενός ανθρώπινου ξενιστή [41].

Η γονιδιωματική ανάλυση, έδειξε ότι υπάρχει ένας κοινός προγονικός μικροοργανισμός *Vibrio*, από τον οποίο προέκυψαν τα είδη *V. parahaemolyticus*, το *V. cholerae*, καθώς και τα υπόλοιπα. Η απόκτηση ενός Συστήματος Εκκρίσεως Τύπου III (T3SS), παρόμοιο με εκείνο που απαντάται στο είδος *Yersinia*, στο οποίο γίνεται αναφορά ως T3SS1, ήταν η βάση του προγόνικού μικροοργανισμού *V. parahaemolyticus*. Η απόκτηση από ορισμένα στελέχη ενός δεύτερου συστήματος έκκρισης τύπου III (T3SS2) και των θερμοανθεκτικών αιμολυσινών (TDH) και σχετικών με TDH γονιδίων αιμολυσίνης (TRH), οδήγησε σε έναν αριθμό ειδών *V. parahaemolyticus* με ποικίλους βαθμούς παθογένειας. Αυτή η εξέλιξη, είναι ξεχωριστή από εκείνη του *V. cholerae*, στο οποίο επίσης βρίσκεται το σύστημα T3SS2 καθώς και η τοξίνη της χολέρας (CTX), η οποία κωδικοποιήθηκε σε φάγους σε μερικά στελέχη, αλλά δεν διαθέτει το σύστημα T3SS1.

Οι γονιδιακοί τόποι για τα δύο χωριστά συστήματα έκκρισης τύπου VI (VP1386-VP1420, T6SS1 και VPA1030-VPA1043, T6SS2, που εμφανίζονται στα χρωμοσώματα 1 και 2

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:11:01 EEST - 18.116.85.64

αντίστοιχα), έχουν ταυτοποιηθεί στο Rim D2210633. Η έκκριση τύπου VI, υπάρχει σε πολλά Gram-αρνητικά παθογόνα βακτήρια, αλλά επί του παρόντος, δεν έχει ερευνηθεί στο *V. Parahaemolyticus* [33].

Το πιο σημαντικό βήμα στην παθογένεση του βακτηρίου, είναι αρχικά η δέσμευση των κυττάρων στον ξενιστή. Κατά τη διάρκεια της μόλυνσης, οι παράγοντες της βακτηριακής προσκόλλησης, υπάρχουν στην βακτηριακή επιφάνεια για να σχηματίσουν επαφή με το κύτταρο ξενιστή, ώστε να εκκρίνουν τις πρωτείνες της τοξίνης. Η προσκολλητίνη MAM7 (Multivalent Molecule Adhesion 7), διατηρείται σε πολλά Gram-αρνητικά βακτήρια και αποτελείται από μία υδρόφοβη περιοχή στο N-άκρο έκτασης 44 αμινοξέων, η οποία απαιτείται για το σωστό εντοπισμό και την προσκόλληση της εξωτερικής μεμβράνης της πρωτεΐνης. Περιέχει επίσης, επτά περιοχές για την είσοδο στα κύτταρα των θηλαστικών [42]. Η MAM7 εκφράζεται, επιτρέποντας στα Gram-αρνητικά παθογόνα, να δημιουργήσουν άμεση επαφή με τα κύτταρα-ξενιστές, η οποία με τη σειρά της, μπορεί να οδηγήσει σε ρύθμιση άλλων ειδικών παθογόνων, ή κυτταρο-ειδικών παραγόντων προσκόλλησης και λοιμογόνου δράσης [43].

Η προσκολλιτίνη MAM7, δεσμεύεται τόσο με τη φιμπρονεκτίνη, όσο και με το φωσφατιδικό οξύ και εαν κάποιο από αυτά τα συστατικά, είναι μπλοκαρισμένο, αποτρέπεται η προσκόλληση της MAM7 στα κύτταρα-ξενιστές. Η ετερόλογη έκφραση της MAM7, επαρκεί για τη σύνδεση ενός μη παθογόνου στελέχους *Escherichia coli,* στα κύτταρα του ξενιστή. Κάτι τέτοιο, εμποδίζει την προσκόλληση και εξασθενεί την κυτταροτοξικότητα του *V. parahaemolyticus,* ή οποιουδήποτε άλλου αρνητικά κατά Gram παθογόνου που εκφράζει την MAM7. Επιπλέον, είναι απαραίτητη για την αρχική δέσμευση στον ξενιστή κατά τη διάρκεια της μόλυνσης και για τον κυτταρικό θάνατο που προκαλείται από το σύστημα T3SS, σε μερικούς τύπους κυττάρων. Το γεγονός αυτό, παρέχει μια νέα προοπτική για τις αλληλοεπιδράσεις ανάμεσα στα βακτηριακά κύτταρα και τους ξενιστές. Η ανακάλυψη της MAM7, ήταν αυτή που οδήγησε σε νέα έρευνα για τη δυνατότητα χρησιμοποίησής της ως θεραπευτικό παράγοντα για πολλά Gram-αρνητικά βακτήρια, συμπεριλαμβανομένου και του *V. parahaemolyticus* [44].

Ένα ιδιαίτερο χαρακτηριστικό του βακτηρίου, είναι η ικανότητα ορισμένων στελεχών να παράγουν μία θερμοανθεκτική αιμολυσίνη (εξωτοξίνη) που ονομάζεται TDH (Thermostable Direct Hemolysin), ή αιμολυσίνη Kanagawa. Η συγκεκριμένη τοξίνη, έχει σχέση με τη μολυσματικότητα του είδους, παρουσιάζοντας κυτταροτοξικές ιδιότητες. Η αιμολυσίνη, είναι ανιχνεύσιμη όταν ο αριθμός κυττάρων του βακτηρίου ανέρχεται σε 10^6 /g και παρουσιάζει μεγαλύτερη ανθεκτικότητα στη θέρμανση, σε συνθήκες pH 5,5-6,5. Τα στελέχη του *V. parahaemolyticus* που απομονώνονται από τους ασθενείς με διάρροια, παράγουν, είτε την

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:11:01 EEST - 18.116.85.64

θερμοανθεκτική άμεση αιμολυσίνη (TDH), είτε την αιμολυσίνη που σχετίζεται με την TDH (TRH), είτε και τις δύο, ενώ όταν το βακτήριο απομονωθεί από το περιβάλλον, σπάνια έχουν αυτά τα χαρακτηριστικά. Η παρουσία της θερμοανθεκτικής αιμολυσίνης (TDH), αποτελεί αποδεδειγμένο λοιμογόνο παράγοντα, και η TDH εμφανίζεται σε περισσότερα από 90% των κλινικών στελεχών του *V. parahaemolyticus* που έχουν απομονωθεί τόσο στις Ηνωμένες Πολιτείες, όσο και διεθνώς. Παλαιότερα, χρησιμοποιούνταν η φαινοτυπική δοκιμή που είναι γνωστή ως δοκιμή Kanagawa, για να ταυτοποιηθούν τα στελέχη που παράγουν TDH, πλέον όμως αυτή έχει αντικατασταθεί από πιο αποτελεσματικές και ακριβείς μεθόδους, όπως η PCR, που στοχεύουν στο γονίδιο που κωδικοποιεί την TDH (*tdh*). Ένα προϊόν απομόνωσης που παράγει την αιμολυσίνη TDH αναφέρεται ως Kanagawa θετικό (Kanagawa +) και μπορεί να αναγνωριστεί από την αιμόλυση που προκαλεί, σε ειδικό αιματούχο θρεπτικό υπόστρωμα, γνωστό ως Wagatsuma blood agar.

Η TDH, έχει αποδειχθεί ότι έχει αιμολυτική, εντεροτοξική, καρδιοτοξική και κυτταροτοξική δράση, ενώ έχει βρεθεί ότι, υπάρχει μια ισχυρή συσχέτιση μεταξύ της παραγωγής ουρεάσης (ένας ασυνήθιστος φαινότυπος για το *V. parahaemolyticus*) και του γονιδίου tdh. Αυτές και άλλες γονοτυπικές δοκιμές που εφαρμόστηκαν σε περιβαλλοντικά δείγματα, καθώς και σε δείγματα αλιευμάτων στις ΗΠΑ, έδειξαν ότι, τα συνολικά επίπεδα των πληθυσμών του *V. parahaemolyticus* σε στρείδια που κυκλοφορούν στην αγορά, ξεπερνούν συχνά τα 10.000 cfu/g, ενώ συνήθως λιγότερο από 1% των δειγμάτων που απομονώνονται από το περιβάλλον και τη θάλασσα περιέχουν tdh [33].

Η θερμοανθεκτική άμεση αιμολυσίνη (TDH), αποτελεί τον πρώτο λοιμογόνο παράγοντα που αναγνωρίστηκε για το *V. parahaemolyticus* και έκτοτε έχει χρησιμοποιηθεί ως σημαντικός παράγοντας αναγνώρισης για τα παθογόνα στελέχη. Η αιμολυσίνη TDH, κωδικοποιείται από τέσσερα γονίδια tdh, και κυριότερα από το γονίδιο tdh2. Τα παράγωγα αυτών των τεσσάρων γονιδίων, έχουν αιμολυτικές ιδιότητες για ερυθροκύτταρα διάφορων τύπων ζώων, διεγείρουν την αγγειακή διαπερατότητα στο δέρμα των κουνελιών και είναι μπορούν να επιφέρουν το θάνατο, σε ποντίκια-πειραματόζωα, αν και οι πρωτείνες του, διαφέρουν σε έναν μικρό βαθμό [45]. Οι Raimondi et al. [46], ανέφεραν πώς η TDH είναι η μία από τις λίγες εντεροτοξίνες που παράγονται από παθογόνα βακτήρια για τον άνθρωπο, της οποίας η δράση, ενεργοποιείται από το ενδοκυτταρικό ασβέστιο. Έχει την ιδιότητα να αυξάνει τη συγκέντρωση του στα μη μετασχηματισμένα εντερικά κύτταρα IOE-6 του αρουραίου, ενώ, παρουσιάζει τόσο καρδιοτοξικές όσο και κυτταροτοξικές ιδιότητες.

Συνήθως, τα κλινικά στελέχη του *V. parahaemolyticus* τα οποία απομονώνονται από ανθρώπους με γαστρεντερίτιδα, διαφοροποιούνται από τα στελέχη τα οποία απομονώνονται από το περιβάλλον, όσον αφορά την ικανότητά τους να παράγουν την tdh, η οποία μπορεί να

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:11:01 EEST - 18.116.85.64

λύσει ερυθρά αιμοσφαίρια στο άγαρ Wagatsuma. Μόνο το 1-2% των περιβαλλοντικών δειγμάτων, είναι KP-θετικό, με τα υπόλοιπα δείγματα να κατηγοριοποιούνται ως KP-αρνητικά στελέχη [47]. Οι μοριακές επιδημιολογικές μελέτες αναφέρουν ότι, τα αρνητικά KP-στελέχη του *Vibrio parahaemolyticus,* δεν διαθέτουν το χαρακτηριστικό γονίδιο tdh, αλλά παράγουν το γονίδιο trh. Το γονίδιο trh, επειδή έχει παρόμοιο ρόλο όπως και το γονίδιο tdh στην παθογένεση του *V. parahaemolyticus,* θεωρείται ως ένας συντελεστής της παθογένειας του.

Τα συστήματα έκκρισης τύπου III, είναι μηχανισμοί των βακτηριακών κυττάρων, οι οποίοι χρησιμοποιούνται για την εισαγωγή βακτηριακών πρωτεϊνών απευθείας στη μεμβράνη και στο κυτταρόπλασμα των ευκαρυωτικών κυττάρων, χωρίς να έρθουν σε επαφή με το εξωκυτταρικό περιβάλλον [49]. Το σύστημα T3SS, αποτελείται από 20-30 πρωτεΐνες [49]. Ανάλογα βέβαια με τις ανάγκες των παθογόνων μικροοργανισμών, τα συστήματα ρυθμίζονται θετικά ή αρνητικά.

Το σύστημα T3SS1, υπάρχει σε όλα τα περιβαλλοντικά και κλινικά δείγματα των στελεχών του *V. parahaemolyticus* [50]. Έχει την ιδιότητα να ρυθμίζεται από τρεις αλληλεπιδρώσες πρωτεΐνες, τις ExsC, ExsD, και ExsE, οι οποίες ελέγχουν τη δραστηριότητα του κύριου μεταγραφικού ρυθμιστικού παράγοντα ExsA, ενός μέλους της οικογένειας των AraC ενεργοποιητών της μεταγραφής. Κάτω από μη επαγωγικές συνθήκες, το ExsA, δεσμεύεται με το ExsD και καθίσταται ανενεργό, ενώ το ExsC, ένας αντι-ενεργοποιητής του συστήματος, δεσμεύεται με ExsE. Όταν εκκριθεί το ExsE, απελευθερώνεται ExsC και δεσμεύεται στο ExsD, γεγονός το οποίο επιτρέπει την απελευθέρωση του ExsA και ενεργοποιεί την μεταγραφή των γονιδίων T3SS1 [51]. Κατά τη διάρκεια της μόλυνσης των ιστών, το σύστημα T3SS1, πυροδοτεί την έναρξη μιας σειράς από γεγονότα, με τελικό αποτέλεσμα την κυτταρική λύση. Αυτή η σειρά γεγονότων επηρεάζεται συνήθως από το γονίδιο T3SS1, με τρεις κύριους τελεστές, τα μόρια VopQ (VP1680), VPA0450 και VopS (VP1686). Το μόριο VopQ ενεργοποιείται από την Pi3-κινάση [52]. Όταν το μόριο VopQ απουσιάζει, τα μακροφάγα είναι σε θέση να φαγοκυτταρώσουν το βακτήριο *V. parahaemolyticus,* προκαλώντας τη θανάτωσή του μέσω απόπτωσης. Με αυτό τον τρόπο, αποτρέπεται η απομόνωση των πόρων της μεμβράνης, προκαλώντας αυτοφαγία ώστε το βακτήριο να μπορεί να ανταγωνίζεται την ικανότητα των κυττάρων-ξενιστών, να το φαγοκυτταρώνουν. Το μόριο VPA0450, είναι μία ινωσιτολική πολυφωσφορική 5-φωσφατάση, η οποία υδρολύει το φωσφορικό D5 από την φωσφατιδυλινοσιτόλη-4,5- διφωσφορική [PI (4,5) P2], στη μεμβράνη του πλάσματος. Αποσταθεροποιεί το κύτταρο, αποκολλώντας τη μεμβράνη του πλάσματος από τον κυτταροσκελετό της ακτίνης, γεγονός που οδηγεί στη ροή της πλασματικής μεμβράνης και επιτρέπει την ταχεία λύση του κυττάρου-ξενιστή. Ο τρίτος τελεστής, είναι το

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:11:01 EEST - 18.116.85.64

μόριο VopS, το οποίο στοχεύει στον κυτταροσκελετό ακτίνης, μέσω της AMP Rho-οικογένειας GTP-ase, ώστε να καταρρεύσει ο κυτταροσκελετός ακτίνης που οδηγεί στη στρογγυλοποίηση και συρρίκνωση των κυττάρων [53]. Η περιοχή Fic μέσα στο μόριο VopS, είναι εκείνη που διαμεσολαβεί στην άμεση μεταφορά μονοφωσφορικής αδενοσίνης, από την ATP, στην περιοχή 1 αυτών των μικρών G-πρωτεινών, η οποία εμποδίζει τη δέσμευσή τους σε άλλους επαγωγείς-ενεργοποιητές του κατταράκτη, του μονοπατιού ενεργοποίησης [51].

Το σύστημα T3SS2, αποτελεί έναν πρόσφατα αναγνωρισμένο τύπο συστήματος έκκρισης, ο οποίος κωδικοποιείται από το γονίδιο παθογένειας VP-PAL, στο χρωμόσωμα II, και έχει απομονωθεί κυρίως από κλινικά στελέχη. Το σύστημα T3SS2, συνδέεται με την εντεροτοξικότητα σε διάφορα μοντέλα μόλυνσης [39], ενώ έχει αποδειχθεί ότι προκαλεί κυτταροτοξικότητα σε εντερικές κυτταρικές σειρές, όπως στα κύτταρα Caco-2 και κύτταρα. Επτά γνωστοί τελεστές έχουν μέχρι τώρα εντοπιστεί και χαρακτηριστεί στο σύστημα T3SS2: Vop C, Vop T, Vop Z, Vop A / P, Vop V, Vop L, και VPA1380 [55].

- Το μόριο Vop A / P (VPA1346), είναι μία ακετυλοτρανσφεράση με 55% ομολογία με το μόριο YopJ της *Yersiniaspp*. (55), το οποίο εμποδίζει το σηματοδοτικό μονοπάτι MAPK, αναστέλλοντας την έναρξη και βιολογική δραστικότητα της μιτογονικής ενεργοποιημένης πρωτεϊνικής κινάσης (56), καταστέλλοντας έτσι την κυτταρική διαίρεση.
- Το μόριο Vop L (VPA1370), περιέχει τρεις ομόλογες περιοχές Wiskott Aldrich 2 (WH2) και μία C-τελική περιοχή, η οποία προκαλεί το σχηματισμό πολωμένων ακτινικών ινών και επιταχύνει τη συλλογή νηματίων ακτίνης από τη σύνδεση μονομερών ακτίνης [57]. Συγκεκριμένα, μπορεί να παρέχει ένα ευνοϊκό μικροπεριβάλλον, ώστε τα βακτηρίδια να μπορούν να αναπαραχθούν, ενισχύοντας έτσι την πρόσληψη και την εισβολή του *V. parahaemolyticus*.
- Το μόριο Vop C, διαταράσσει το δίκτυο της ακτίνης και προκαλεί βακτηριακή εισβολή μέσω αποαμιδίωσης της γλουταμίνης 6, τόσο στα κύτταρα Rac, όσο και στα CDC42. Η αποαμιδίωση, εμφανίζεται στις περιοχές μεταγωγής τους, με αποτέλεσμα τη συστατική ενεργοποίηση των μελών της οικογένειας Rho. Οι κυτταροσκελετοί ακτίνης των μολυσμένων κυττάρων, αναδιατάσσονται περαιτέρω, με την τροποποίηση αυτών των GTPασών, προτρέποντας έτσι τα μολυσμένα κύτταρα, να καταπιούν τα βακτηρίδια [59].

  Το μόριο VopT, τροποποιεί τη μικρή πρωτεΐνη G με ADP-ριβόζη, χρησιμοποιώντας το NAD^+ ωςυπόστρωμα invivo και in. Αναστέλλει την ανάπτυξη των κυττάρων του ζυμομύκητα και είναι κυτταροτοξική για τα κύτταρα Caco-2 και HCT-8 [60].

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:11:01 EEST - 18.116.85.64

- Το μόριο Vop V, έχει περιοχές επανάληψης μεγάλου μήκους (LR) στο N- και C-τερματικό του άκρο, που αποτελείται από τρεις τύπους επαναλαμβανόμενων μονάδων αλληλουχίας. Σε αυτό οφείλεται η εντεροτοξικότητα που παρατηρείται, όταν μολύνεται ένα κουνέλι. Συνδέεται άμεσα με την F-ακτίνη, μια πολυμερική μορφή της ακτίνης, που συσσωρεύεται κάτω από τις βακτηριακές μικροαποικίες στα καρκινικά Caco-2 κύτταρα. Έχει δειχθεί ότι, απαιτείται η σύνδεση της F-ακτίνης για την εντεροτοξικότητα που προκαλείται από το μόριο VopV [33]. Ωστόσο, ο μοριακός μηχανισμός αυτής της εντεροτοξικότητας, εξακολουθεί να είναι ασαφής, συνεπώς περαιτέρω έρευνες, είναι απαραίτητη προϋπόθεση, για να τονιστεί ο κρίσιμος ρόλος της κατά τη διάρκεια της μόλυνσης.
- Το μόριο Vop Z, είναι ένας νέος τελεστής που εκκρίνεται από το σύστημα T3SS2 και είναι υπεύθυνος για συσσώρευση υγρών, την απόσπαση κυττάρων και την επιθηλιακή βλάβη. Ο εντερικός αποικισμός από τον *V. parahaemolyticus* και η συσσώρευση των υγρών, μειώνεται όταν διαγράφεται το Vop Z. Αναστέλλει την ενεργοποίηση των μονοπατιών σηματοδότησης MAPK και NP-κB, με αναστολή της ενεργοποίησης της κινάσης TAK1. Προκύπτει έτσι, μια σημαντική αλλοίωση, η οποία διαταράσσει την ακεραιότητα του ιστού [60]. Επομένως, διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στη λοιμογόνο δράση του *V.parahaemolyticus*.
- Το μόριο VPA1380. αναγνωρίστηκε πρόσφατα ως ένας κρίσιμος τελεστής του συστήματος T3SS2. Αποτελεί ένα ιδιαίτερο απηζήμιο μόριο, το οποίο προκάλεσε ένα τοξικό αποτέλεσμα στην ανάπτυξη ζύμης, όταν αυτόεκφράστηκε ως ενισχυμένη πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη σύντηξης (eGFP), με τη ζύμη να αντιπροσωπεύει πειραματικά, έναν ετερόλογο ευκαρυωτικό μικροοργανισμό. Πρόσφατες βιοπληροφορικές αναλύσεις, δείχνουν ότι το μόριο αυτό, περιέχει αρκετές εξακοφωσφορικές ινοσιτόλες (IP6), ως επαγώγιμες περιοχές πρωτεάσης κυστεΐνης, οι οποίες είναι γνωστό ότι υπάρχουν σε γνωστές τοξίνες που παράγονται από άλλα βακτήρια [33]. Αναφέρεται ως μία τυπική πρωτεάση κυστεΐνης, ικανή να καταλύει το υπόστρωμα- στόχο της, και πιθανώς εξαιτίας αυτού, να εμπλέκεται στην εισβολή του βακτηρίου στα κύτταρα του ξενιστή.

Πρόσφατα, έχει αναγνωριστεί ένα ακόμα σύστημα έκκρισης τύπου VI, το σύστημα T6SS, το οποίο ανιχνεύθηκε σε πολλά Gram-αρνητικά παθογόνα βακτήρια. Το σύστημα T6SS είναι ένα μακρομοριακό σύμπλεγμα, αποτελούμενο από πολλά συστατικά πρωτεΐνης. Είναι υπεύθυνο για την παροχή μιας σειράς τοξικών πρωτεινών τελεστών στο κυτταρόπλασμα των ευκαρυωτικών κυττάρων, επιτρέποντας στους τελεστές, να διαταράξουν το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή [63]. Το σύστημα T6SS, είναι λειτουργικά ανάλογο με το T3SS και κατέχει μια κρίσιμη λειτουργία στη διαδικασία της βακτηριακής μόλυνσης [61]. Το *V.*

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:11:01 EEST - 18.116.85.64

parahaemolyticus, περιέχει δύο διαφορετικά συστήματα T6SS, που ορίζονται ως T6SS1 και T6SS2 [57]. Το T6SS1, κωδικοποιείται στο χρωμόσωμα I, εκφράζεται κυρίως σε κλινικά στελέχη και είναι πιο δραστικό σε θερμότερες συνθήκες περιβάλλοντος. Το T6SS2, βρέθηκε και σε κλινικά δείγματα και σε δείγματα που απομονώθηκαν από το περιβάλλον, κωδικοποιείται στο χρωμόσωμα I, και είναι δραστικό υπό συνθήκες χαμηλού άλατος. Από την ανάλυση ομολογίας, καταδείχθηκε ότι τα συστήματα T6SSs, είναι παρόντα στα περισσότερα διαφορετικά είδη *Vibrio*, συμπεριλαμβανομένων των *V. parahaemolyticus, V. cholerae, V. harveyi* και *V. alginolyticus*. Πρόσφατα δημοσιευμένα άρθρα, ανέφεραν ότι και τα δύο T6SS είναι απαραίτητα για την προσκόλληση του *V. parahaemolyticus* στα κύτταρα του ξενιστή. Επίσης, αναγνωρίστηκαν δύο τελεστές του T6SS που μεσολαβούν στην αντιβακτηριακή δράση, χρησιμοποιώντας πρωτεϊνωματικές, βιοπληροφορικές, και γενετικές αναλύσεις. Το μόριο VP1388 κωδικοποιείται εντός του συμπλέγματος γονιδίων του T6SS1, ενώ το μόριο VPA1263 κωδικοποιείται στο χρωμόσωμα II. Οι δύο τελεστές, περιέχουν το διατηρημένο μοτίβο MIX που βρίσκεται στις πρωτεΐνες με προβλεπόμενες κυτταροτοξικές περιοχές, συμπεριλαμβανομένων των VgrG και PAAR πρωτεινών [57].

Κεφάλαιο 4.: Παθογένεια στον άνθρωπο

4.1. Γαστρεντερίτιδα από V. parahaemolyticus

Η μόλυνση με *V. Parahaemolyticus,* μπορεί να προκαλέσει τρεις ξεχωριστές καταστάσεις στον άνθρωπο: γαστρεντερίτιδα, επιμόλυνση τραυμάτων και σηψαιμία. Η οξεία γαστρεντερίτιδα, εμφανίζεται με κοιλιακές κράμπες, διάρροια, ναυτία, έμετο, πυρετό χαμηλού βαθμού, πονοκέφαλο και περιστασιακή αιμορραγική διάρροια, διαφορετική από αυτή που παρατηρείται σε άλλες εντερικές λοιμώξεις. Η μόλυνση, εμφανίζεται 4 έως 96 ώρες μετά την κατανάλωση επιμολυσμένων τροφίμων και διαρκεί συνήθως έως και τρεις ημέρες. Η ασθένεια σε ανοσοκατασταλμένα άτομα, μπορεί να αντιμετωπιστεί επαρκώς μόνο με συμπτωματική και υποστηρικτική θεραπεία.

Η επιμόλυνση των τραυμάτων, είναι κοινή μεταξύ των αλιέων, και γενικά μπορεί να παρουσιαστεί όταν, μικρές πληγές εισέρχονται μέσα στο θαλασσινό νερό. Αυτή η μορφή, περιορίζεται σε πολλές περιπτώσεις στα ανώτερα στρώματα της επιδερμίδας, όμως, μπορεί να μετατραπεί σε νεκρωτική φλεγμονή, μια ασυνήθιστη λοίμωξη των μαλακών ιστών, που χαρακτηρίζεται από ταχεία εξάπλωση των βακτηριακών κυττάρων, με σχετιζόμενη φλεγμονή και νέκρωση των ιστών. Η σηψαιμία, εμφανίζεται όταν το *V. parahaemolyticus* εισέρχεται στην κυκλοφορία του αίματος του ασθενούς. Η συστηματική ανοσοποιητική ενεργοποίηση, οδηγεί σε φλεγμονή και αυξημένη αγγειακή διαπερατότητα. Αυτό, μπορεί να οδηγήσει σε

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:11:01 EEST - 18.116.85.64

εκδήλωση αντίδρασης σοκ, στην κατάρρευση πολλών συστημάτων και θάνατο. Ο πληθυσμός των ασθενών που διατρέχουν μεγαλύτερο κίνδυνο για σηψαιμία, περιλαμβάνει αυτούς με υποκείμενες ιατρικές παθήσεις, όπως ηπατική νόσο, διαβήτη, καρκίνο και κάποια τυχόν πρόσφατη χειρουργική επέμβαση. Τα ανοσοκατασταλμένα άτομα και τα άτομα με ηπατική ανεπάρκεια λόγω κίρρωσης ή ηπατίτιδας του ιού της ηπατίτιδας, φαίνεται να διατρέχουν τον μεγαλύτερο κίνδυνο σηψαιμίας, συγκριτικά με τους υπόλοιπους [63].

Η τροφιμογενής λοίμωξη που προκαλείται από αυτόν τον μικροοργανισμό, συμβαίνει συνήθως κατά την διάρκεια της θερμότερης περιόδου του έτους, από τον Ιούνιο έως τον Οκτώβριο, και συνδέεται κυρίως, με την κατανάλωση διάφορων ειδών αλιευμάτων [33]. Ανάμεσα σε όλα τα είδη αυτών των αλιευμάτων, τα οστρακοειδή, θεωρούνται ως τα τρόφιμα υψηλού κινδύνου, επειδή μπορεί να είναι επιμολυσμένα, με ιδιαίτερα υψηλούς πληθυσμούς του παθογόνου, οι οποίοι σε πολλές περιπτώσεις, καταγράφονται σε υψηλότερα επίπεδα από αυτά του περιβάλλοντος νερού [64].

Τα τυπικά κλινικά συμπτώματα της τροφιμογενούς λοίμωξης, είναι η οξεία δυσεντερία και ο κοιλιακός πόνος, που συνοδεύονται συνήθως από διάρροια, ναυτία, έμετο, πυρετό και ρίγη. Ορισμένοι ασθενείς που πάσχουν από σοβαρές υποκείμενες νόσους, μπορεί να οδηγηθούν σε σπασμούς και απώλεια συνείδησης.

Οι συνήθεις μέθοδοι αποτελεσματικής θεραπείας που χρησιμοποιούνται, περιλαμβάνουν συνήθως, την χορήγηση αντιβιοτικών και την ενυδάτωση του ασθενούς. Συνιστάται, η μη κατανάλωση ορισμένων ειδών αλιευμάτων, από ασθενείς που πάσχουν από σοβαρές ασθένειες ανοσοανεπάρκειας [65].

Όσον αφορά την παθοφυσιολογία του, το βακτήριο μπορεί να μολύνει τον ξενιστή, μέσω διαφορετικών οδών. Μόλις καταναλωθούν τα μολυσμένα αλιεύματα, τα βακτήρια, εισέρχονται στο γαστρεντερικό σύστημα. Τα βακτήρια, μπορεί επίσης να εισέλθουν στον ανθρώπινο οργανισμό μέσα από μία ανοικτή πληγή, κατά την έκθεση στο αλμυρό νερό.

Το *V. Parahaemolyticus,* έχει διάφορους παράγοντες μολυσματικότητας, κοινούς και σε άλλα βακτήρια. Ωστόσο, ο κύριος παράγοντας λοιμογόνος δράσης του, είναι η θερμοσταθερή άμεση αιμολυσίνη (TDH). Η τοξίνη TDH, είναι παρούσα στην πλειονότητα των κλινικών δειγμάτων (88% έως 96%), αλλά μόνο σε περίπου 1% των φυσικών πληθυσμών. Καθώς ο παράγοντας αυτός, έχει την ικανότητα να σχηματίζει πόρους, οι ερευνητές, ισχυρίζονται ότι αυτό, μπορεί να σχετίζεται με την ικανότητά του να προκαλεί γαστρεντερικά συμπτώματα. Αν και διαθέτει αρκετούς παράγοντες μολυσματικότητας, η πλειονότητα των μολύνσεων που προκαλούνται, έχει ως αποτέλεσμα μόνο την αυτοπεριοριζόμενη εντερίτιδα [62].

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:11:01 EEST - 18.116.85.64

Ένα λεπτομερές ιστορικό, είναι ζωτικής σημασίας για την έγκαιρη και επιτυχή διάγνωση μιας λοίμωξης, από *V. parahaemolyticus*. Οι ασθενείς, συνήθως εμφανίζουν συμπτώματα τύπου γαστρεντερίτιδας, όπως, κοιλιακές κράμπες, ναυτία, έμετο και πυρετό. Επειδή αυτά τα γενικά συμπτώματα, είναι κοινά επίσης και σε πολλές άλλες ασθένειες, η λίστα των ερωτήσεων, θα πρέπει να περιλαμβάνει κάθε πρόσφατο ταξίδι στον ωκεανό, ή κοντά στον ωκεανό, ή οποιαδήποτε κατανάλωση οστρακοειδών, ή αλιευμάτων, ιδιαίτερα ακατέργαστων στρειδιών. Η κατάσταση αυτή, είναι πιο κοινή στις παράκτιες πόλεις, αλλά υπάρχουν αρκετές περιπτώσεις, που καταγράφηκαν σε περιοχές, μακριά από τη θάλασσα. Αυτό, είναι αποτέλεσμα των ασθενών που εμφανίζουν συμπτώματα, μετά την επιστροφή στο σπίτι, από πρόσφατα ταξίδια. Ο μέσος χρόνος από την κατανάλωση μολυσμένων τροφίμων, μέχρι την εμφάνιση των συμπτωμάτων, είναι 17 ώρες [33].

4.2. Συχνότητα εμφάνισης λοιμώξεων

Τα αλιεύματα, είναι, πλούσια σε θρεπτικά συστατικά, αποτελούν μέρος μιας υγιεινής διατροφής και η κατανάλωσή τους, προσδίδει διάφορα οφέλη στην υγεία. Ωστόσο, μαζί με τα διατροφικά οφέλη από την κατανάλωση αλιευμάτων, συνυπάρχουν οι πιθανοί κίνδυνοι, να έχουν μολυνθεί. Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (ΠΟΥ), ορίζει την ασθένεια που προκαλείται από τρόφιμα, ως ασθένεια που, προκαλείται από την κατανάλωση επιμολυσμένων τροφίμων. Τα παθογόνα, όπως τα είδη *Vibrio, E. coli,* O157: H7, *Campylobacter, Salmonella* και *Listeria monocytogenes,* έχει διαπιστωθεί ότι, είναι υπεύθυνα για τις κυριότερες επιδημίες, παγκοσμίως [66]. Η κατανάλωση επιμολυσμένων αλιευμάτων, είναι γνωστός τρόπος μετάδοσης παθογόνων βακτηρίων, που προκαλούν τροφιμογενείς ανθρώπινες ασθένειες, παγκοσμίως. Στην Ασιατική περιοχή, τα είδη του γένους *Vibrio,* έχουν αναγνωριστεί ως η κύρια αιτία τροφιμογενών λοιμώξεων από την κατανάλωση αλιευμάτων σε πολλές χώρες, συμπεριλαμβανομένης της Ιαπωνίας, της Ινδίας, της Κίνας και της Ταϊβάν, της Κορέας και της Μαλασίας. Στην Ασία μάλιστα, αναγνωρίστηκε αρχικά το *V. Parahaemolyticus,* ως παθογόνος παράγοντας για τον άνθρωπο μόλις το 1951, στην Οσάκα, όπου, οι άνθρωποι καταναλώνουν συχνά ωμά ή ατελώς θερμικά επεξεργασμένα αλιεύματα [67]. Το βακτήριο, απομονώθηκε από την εκδήλωση μόλυνσης 272 περιπτώσεων και 20 θανάτων, που σχετίστηκαν με την κατανάλωση του σιρασού, δηλαδή των ιαπωνικών βρασμένων και ημι-αποξηραμένων σαρδελών. Από τότε, το *V. Parahaemolyticus,* έχει απομονωθεί από διάφορα είδη αλιευμάτων, συμπεριλαμβανομένων των γαρίδων, στις αγορές των χωρών της Νοτιοανατολικής Ασίας. Έχει απομονωθεί σε πολλά περιστατικά τροφιμογενών εξάρσεων, στην Ιαπωνία, στην Ταϊβάν, στην Κίνα από τις αρχές της δεκαετίας του 1990, στο Μπανγκλαντές, στο Λάος, στο Χονγκ Κονγκ και στην Ινδονησία [33]. Επίσης

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:11:01 EEST - 18.116.85.64

έχει απομονωθεί και στην Ταϊλάνδη, όπου είναι ο κύριος παραγωγός και εξαγωγέας των καλλιεργημένων γαρίδων, σε παγκόσμιο επίπεδο.

Μια πρόσφατη μελέτη, ανέφερε την παρουσία της αντιμικροβιακής αντοχής στελεχών του *V. Parahaemolyticus,* που απομονώθηκαν από γαρίδες που καλλιεργούνται σε λίμνες, στην Ταϊλάνδη [69]. Τέτοια παθογόνα στελέχη ανθεκτικά στα αντιβιοτικά, απομονώθηκαν επίσης, από γαρίδες στη Μαλαισία [68]. Εξάλλου, τα τελευταία χρόνια, το *V. Parahaemolyticus,* έχει αναφερθεί, ως μια από τις κύριες αιτίες, των τροφιμογενών ασθενειών στην Κίνα. Μια πρόσφατη μελέτη, ανέφερε την απομόνωση ενός παθογόνου στελέχους *V. Parahaemolyticus,* από τις γαρίδες, με πληθυσμούς μικρότερους από 100 MPN / g, σε δείγματα [33].

Στην Ινδία, το *V. Parahaemolyticus,* έχει απομονωθεί τόσο από κλινικά όσο και περιβαλλοντικά δείγματα. Σε μια πρόσφατη κλινική μελέτη, 178 στελέχη απομονώθηκαν από 13.607 ασθενείς με διάρροια, που γίνονταν δεκτοί στο νοσοκομείο των λοιμωδών νοσημάτων, στην Καλκούτα από το 2001 έως το 2012 [70]. Οι Reyhanath και Kutty (2014), έχουν αναφέρει, την ανίχνευση και απομόνωση του *V. Parahaemolyticus,* από μια αλιευτική περιοχή, στη Νότια Ινδία. Σε άλλη μελέτη, οι Sudha et al., (2014), απομόνωσαν παθογόνα και ανθεκτικά στα αντιβιοτικά στελέχη *V. Parahaemolyticus,* μαζί με άλλα στελέχη τύπου *Vibrio,* από αλιεύματα στο Cochin. Η πλειοψηφία των στελεχών αυτής της μελέτης, ήταν ανθεκτική στην αμπικιλλίνη [117].

Στην Ταϊβάν, μια μελέτη, ανέφερε την απομόνωση του μικροοργανισμού από στρείδια και αχιβάδες, σε συνθήκες περιβάλλοντος. Τα απομονωθέντα στελέχη, διέθεταν την παρουσία του γονιδίου tdh και του συστήματος T3SS.[57] Η εμφάνιση του παθογόνου στα θαλασσινά και το προφίλ της μικροβιακής αντοχής, είναι ανησυχητικό για τη δημόσια υγεία και απαιτεί άμεση προσοχή και πιθανόν την λήψη μέτρων, προς αυτή την κατεύθυνση [57].

Στην Ευρώπη, το *V. parahaemolyticus* έχει απομονωθεί στη Βαλτική Θάλασσα, στη Βόρεια Θάλασσα, στη Μεσόγειο Θάλασσα και στη Μαύρη Θάλασσα. Το 1978, έγιναν μελέτες στα παράκτια ύδατα της Γουαδελούπης και το*V. Parahaemolyticus,* απομονώθηκε στα 53 από τα 100 δείγματα ύδατος, που ερευνήθηκαν. Με την πάροδο των ετών, πολυάριθμες περιπτώσεις γαστρεντερίτιδας που οφείλονται στο παθογόνο, εντοπίστηκαν και απομονώθηκαν στην Ισπανία, στην Ελλάδα, στη Βρετανία, στην Τουρκία, στη Δανία και τις υπόλοιπες Σκανδιναβικές χώρες. Μια σοβαρή περίπτωση μόλυνσης, όπου έπληξε 44 ασθενείς, αφορούσε την κατανάλωση γαρίδων, που εισήχθησαν από την Ασία στη Γαλλία, το 1997 [71]. Το 1999, υπήρχε ένα περιστατικό στην Ισπανία, 64 περιπτώσεων, λόγω κατανάλωσης μη σωστά επεξεργασμένων στρειδιών. Το 2004, ένα άλλο επεισόδιο στην Ισπανία, αφορούσε

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:11:01 EEST - 18.116.85.64

80 άτομα σε ένα εστιατόριο, εξαιτίας της κατανάλωσης βρασμένων καβουριών, τα οποία δεν ήταν παρασκευασμένα, με τις απαραίτητες συνθήκες υγιεινής [72].

Πανδημικά στελέχη του βακτηρίου, έχουν απομονωθεί επίσης, στις Ηνωμένες Πολιτείες. Ο ορότυπος O4: K12, έδειξε τον υψηλότερο επιπολασμό, μεταξύ των κλινικών δοκιμασιών στα απομονωμένα δείγματα *του V. Parahaemolyticus,* στις ΗΠΑ, μεταξύ 1979 και 1995. Το 1998, ένα άλλο κρούσμα στις ΗΠΑ, οφειλόταν στην κατανάλωση στρειδιών. Από μελέτες σε δείγματα κοπράνων ασθενών, ο ορότυπος O3:K6 που απομονώθηκε, εμφανίζει σημαντικές ομοιότητες με τον πανδημικό ασιατικό ορότυπο O3: K6, που απομονώθηκε με τη μέθοδο PFGE [67]. Στα κλινικά στελέχη, στις ΗΠΑ, βρέθηκε το γονίδιο trh. Επιπλέον, παρατηρήθηκε, μία αύξηση των κλινικών δειγμάτων που διαθέτουν, είτε γονίδιο tdh, trh, ή και τα δύο, όπου σε αυτές τις σοβαρές περιπτώσεις, απαιτείται νοσηλεία [118]. Αυτά τα περιστατικά μόλυνσης των στρειδιών από *V. Parahaemolyticus,* αντικατοπτρίζουν, μια σοβαρή ανησυχία για την ασφάλεια των τροφίμων, στις ΗΠΑ.

Πρόσφατες μελέτες, αναφέρουν ότι ορισμένοι περιβαλλοντικοί παράγοντες, διαδραματίζουν τεράστιο αποτέλεσμα στην εξέλιξη ορισμένων παθογόνων. Επομένως, τα πανδημικά στελέχη που παρουσιάζουν ορισμένα βιολογικά χαρακτηριστικά, όπως η αυξημένη παραγωγή τοξινών, ή η δυνατότητα να ζήσουν μέσα στο φυσικό περιβάλλον, υποδεικνύουν την ύπαρξη μηχανισμών, που τους προσφέρουν αυτό το πλεονέκτημα [72].

Η παρουσία του *V. Parahaemolyticus,* επηρεάζεται από διάφορους περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως η θερμοκρασία του νερού, οι συγκεντρώσεις άλατος και οξυγόνου, η αλληλεπίδραση με το πλαγκτόν, η παρουσία ιζημάτων, οι οργανικές ουσίες σε εναιώρημα και οι θαλάσσιοι οργανισμοί [74]. Παρά την πρόοδο στην υγιεινή και την επεξεργασία τροφίμων, το παθογόνο που μεταδίδεται από τα τρόφιμα, εξακολουθεί να αντιπροσωπεύει μια σημαντική απειλή για την ανθρώπινη υγεία παγκοσμίως.

Η συλλογή κατά τα τελευταία χρόνια δεδομένων που, αποκτήθηκαν μετά από μια διεξοδική ανασκόπηση των κλινικών ερευνών που δημοσιεύθηκαν στην Ισπανία και από μη αναφερόμενες περιπτώσεις μολύνσεων από *V. Parahaemolyticus,* τα οποία εντοπίστηκαν στα Ισπανικά νοσοκομεία, έδειξαν ότι, οι λοιμώξεις του *V. parahaemolyticus* στην Ισπανία είναι πιο συχνές, από ότι είχε προηγουμένως θεωρηθεί [74]. Το παθογόνο, απομονώθηκε από ασθενείς με γαστρεντερίτιδα, στη Βαρκελώνη (1986, 1987 και 1999), τη Σαραγόσα (1993) και τη Μαδρίτη (1998 και 2000). Μόνο στη Γαλικία (βορειοδυτική Ισπανία), όπου παράγονται τα περισσότερα οστρακοειδή, 84 περιπτώσεις εμφάνισης λοίμωξης από *V. Parahaemolyticus,* εντοπίστηκαν αναδρομικά από τα νοσοκομειακά αρχεία, από το 1997 έως το 2000. Μια ενιαία εστία 64 περιπτώσεων, το 1999, αφορούσε κατανάλωση στρειδιών. Τα

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:11:01 EEST - 18.116.85.64

περισσότερα από τα ισπανικά κλινικά στελέχη, ήταν ορότυπος O4: K11 και η ανάλυση ηλεκτροφόρησης πηκτής-πεδίου (PFGE) κατέδειξε ότι, είναι ένας μοναδικός κλώνος, διαφορετικός από τα ασιατικά και αμερικανικά κλινικά στελέχη. Το παραπάνω γεγονός, υποδεικνύει ότι η συχνότητα της λοίμωξης, έχει ιδαίτερα αυξηθεί και καταγράφονται ολοένα και περισσότερα κρούσματα [74].

Τον Ιούλιο του 2004, σημειώθηκε μια έξαρση με 80 περιστατικά λοίμωξης από το *V. Parahaemolyticus,* στην Κορούνια της Ισπανίας. Όλοι οι ασθενείς, είχαν παρευρεθεί σε διαφορετική κοινωνική εκδήλωση, στο ίδιο εστιατόριο. Το βακτήριο, απομονώθηκε από δείγματα κοπράνων, από 3 ασθενείς. Τα απομονωμένα στελέχη, χαρακτηρίστηκαν από τον προσδιορισμό των οροτύπων, την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR), για ειδικά γονίδια (Vp-toxR και tlh), τα γονίδια που σχετίζονται με τη λοιμογόνο δράση (tdh και market) και την ομάδα (GS) -PCR ανίχνευση του πανδημικού κλώνου). Δύο απομονωθέντα στελέχη, ανήκαν στον ορότυπο O3: K6, ενώ το απομένον προϊόν απομόνωσης, ήταν O3: K μη προσδιορίσιμο. Και τα 3 προϊόντα απομόνωσης, είχαν τα γονίδια toxR, tlh και tdh και ήταν θετικά για τη δοκιμασία GS-PCR, για την ανίχνευση πανδημικών στελεχών. Τα αποτελέσματα αυτά, συνδέουν χωρίς αμφιβολία τα απομονωμένα στελέχη με τον πανδημικό κλώνο του O3: K6 του *V. parahaemolyticus* [3, 36].Για να επιβεβαιωθεί η σχέση με τον πανδημικό κλώνο, τα απομονωθέντα στελέχη, υποβλήθηκαν επιπλέον σε αναλύσεις αποτύπωσης DNA. Η PFGE και οι αναλύσεις PCR, έδειξαν ότι αυτά τα στελέχη εμφάνισαν ένα σχήμα, που δεν διακρίνονταν από εκείνα, των πανδημικών στελεχών από την Ασία. Η επιδημιολογική έρευνα που συσχετίζεται με την εστία, εντόπισε το βρασμένο καβούρι, που καταναλώνεται στο εστιατόριο, ως την πιο πιθανή πηγή της λοίμωξης. Τα ζωντανά καβούρια, εισήχθησαν στην Ισπανία από το Ηνωμένο Βασίλειο, υποβλήθηκαν σε επεξεργασία υπό ανθυγιεινές συνθήκες και αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία δωματίου, για αρκετές ώρες πριν καταναλωθούν [6].

Για έναν ασθενή με εικαζόμενη λοίμωξη από *V. parahaemolyticus*, η διαγνωστική μέθοδος επιλογής, είναι η απόκτηση καλλιέργειας κοπράνων, καθώς αναπτύσσεται ιδιαίτερα καλά, σε θειώδη άλατα ζωμού θειοθειικού κιτρικού (TCBS). Επιδεικνύουν αιμόλυση, καθώς και θετική ουρεάση. Εάν υπάρχει υποψία για σηψαιμία, ή επιμόλυνση τραύματος, μπορούν να ληφθούν και καλλιέργειες αίματος. Τόσο οι παράγοντες κινδύνου, όσο και οι «συννοσηρότητες», θα πρέπει να εξετάζονται. Οι ασθενείς που αναπτύσσουν λοίμωξη και συνυπάρχει ταυτόχρονα ηπατική νόσος, διαβήτης ή αλκοολισμός, έχουν φτωχή πρόγνωση και είναι πιθανότερο, να αναπτύξουν σηψαιμία.

Η γαστρεντερίτιδα που προκαλείται από το *V. Parahaemolyticus,* έχει σπάνια αναφερθεί σε Ευρωπαϊκές χώρες. Ωστόσο, πρόσφατες μελέτες, δείχνουν ότι ο αριθμός των μολύνσεων από

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:11:01 EEST - 18.116.85.64

V. Parahaemolyticus, φαίνεται να αυξάνεται και στην Ευρώπη. Μέχρι σήμερα, δεν είναι μια ασθένεια υποχρεωτικής δήλωσης στην Ευρώπη, σύμφωνα με τη νομοθεσία [33]. Οι εξάρσεις του *V. Parahaemolyticus,* έχουν αναφερθεί τακτικά από το 1999, με διάφορα κρούσματα να επηρεάζουν τη βορειοδυτική περιοχή της Ισπανίας. Το καλοκαίρι του 1999, εντοπίστηκε στην πόλη Vigo, μια έξαρση του *V. Parahaemolyticus,* που επηρέασε 64 άτομα που σχετίζονταν με κατανάλωση στρειδιών. Όλα τα στελέχη που απομονώθηκαν από τα δείγματα κοπράνων, ήταν ορότυπος 04: K11 και ανήκαν σε έναν και μοναδικό κλώνο, ενδημικό στην Ευρώπη. Ένα επιπλέον περιστατικό, εντοπίστηκε τον Ιούλιο του 2004 στην πόλη Coruña, με 80 περιπτώσεις, οι οποίες συνδέονταν αυτή τη φορά με πανδημικά O3: K6 στελέχη [75]. Όλα τα κλινικά περιστατικά που έχουν αναφερθεί μέχρι σήμερα στην Ισπανία, έχουν συνδεθεί αποκλειστικά με στελέχη tdh θετικά και αρνητικά στην αγορά. Αντίθετα, μεγάλες εστίες V. Parahaemolyticus, έχουν σπάνια αναφερθεί στην Ευρώπη, με την πλειονότητα αυτών, να οφείλονται σε σποραδικές περιπτώσεις.

Τις τελευταίες δύο δεκαετίες, έχουν αναφερθεί επιδημικές εξάρσεις *V. Parahaemolyticus,* μεγάλης κλίμακας στις ΗΠΑ. Μέχρι το 2012, οι μολύνσεις που σχετίζονται με αυτά τα βακτήρια, αναφέρθηκαν μόνο στην περιοχή του Βορειοδυτικού Ειρηνικού, ωστόσο, από το 2012, αναφέρθηκαν στη συνέχεια και λοιμώξεις κατά μήκος των ΒΑ ακτών των ΗΠΑ [76].
Ορισμένες χαρακτηριστικές επιδημιολογικές και μικροβιολογικές μελέτες που σχετίζονται με εξάρσεις του *V. Parahaemolyticus,* για τον εντοπισμό της πηγής των παθογόνων βακτηρίων, είναι οι παρακάτω:
Στις 19 Αυγούστου 2012, αναφέρθηκε έξαρση γαστρεντερίτιδας μεταξύ επιβατών που ταξίδευαν σε κρουαζιερόπλοιο, κοντά στην Ποντεβέδρα της Γαλικίας (ΒΔ Ισπανία). Το ταξίδι, περιελάμβανε δείπνο με τοπικά και εισαγόμενα αλιεύματα και προϊόντα αλιευμάτων. Στο δείπνο, συμμετείχαν συνολικά 114 άτομα, 54 από τα οποία, ανήκαν σε οργανωμένη ομάδα τουριστών. Τα είδη τροφίμων που προσδιορίστηκαν μέσω των ερωτηματολογίων ως ο πιθανότερος τρόπος διασποράς των λοιμώξεων, ήταν οι γαρίδες. Από την έρευνα που πραγματοποιήθηκε, το προϊόν αυτό ήταν μοναδικό στην εμφάνιση στατιστικά σημαντικής διαφοράς ($p = 0.006$) και της υψηλότερης RR [2.19 (0.98-5.40)]. Οι γαρίδες (κατεψυγμένες), που χρησιμοποιήθηκαν στο συμπόσιο, υποβλήθηκαν σε επεξεργασία με βραστό νερό για 1-2 λεπτά και στη συνέχεια, βυθίστηκαν σε νερό με πάγο, για γρήγορη ψύξη. Οι επακόλουθες έρευνες, έδειξαν ότι, ενδεχομένως ο πάγος που χρησιμοποιήθηκε για την ψύξη των προϊόντων, είχε έρθει προηγουμένως σε επαφή με νωπά μύδια, που ελήφθησαν από τοπικά εγκεκριμένα εργοστάσια καθαρισμού οστρακοειδών, μέχρι να βρασθούν. Προκαταρκτικές αναλύσεις, έδειξαν ότι, εντοπίστηκαν 51 περιστατικά, μεταξύ των 65 διαθέσιμων ατόμων που δείπνησαν στο κρουαζιερόπλοιο, να συνδέονται με αυτή την έξαρση. Η μέση περίοδος επώασης ήταν 14 ώρες, με ελάχιστο διάστημα 2 ωρών και μέγιστο 57 ωρών από την

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:11:01 EEST - 18.116.85.64

ανίχνευση των συμπτωμάτων. Τα συμπτώματα της νόσου ήταν: διάρροια (98%), κοιλιακό άλγος (51%), έμετος (33%), ναυτία (24%), χαμηλός πυρετός (18%) και πυρετός (2%). Η μέση διάρκεια των συμπτωμάτων, ήταν 56 ώρες, με ελάχιστο διάστημα 10 ωρών και μέγιστο 259 ωρών (10 ημέρες και 19 ώρες). Από το σύνολο των περιπτώσεων, 28 περιπτώσεις, χρειάστηκαν στη συνέχεια ιατρική φροντίδα [76].

Ένα ακόμα παράδειγμα, αποτελεί η έξαρση λοίμωξης από το *V. Parahaemolyticus,* στο Puerto Montt της Χιλής, που ξεκίνησε το 2004 και έφθασε στο αποκορύφωμά της, το 2005, με 3.600 κλινικά περιστατικά. Μέχρι το 2006, κάθε περιστατικό προκλήθηκε από το στέλεχος O3: K6. Το καλοκαίρι του 2007, μόνο 475 περιπτώσεις αναφέρθηκαν. Το 73%, αντιστοιχούσε στο πανδημικό στέλεχος. Αυτή η μείωση συσχετίστηκε με μια αλλαγή στον ορότυπο πολλών πανδημικών απομονώσεων στο O3: K59 και την εμφάνιση νέων κλινικών στελεχών. Ένα από αυτά τα στελέχη, που σχετίζονται με το 11% των περιπτώσεων, ήταν γονοτυπικά διαφορετικό από το πανδημικό στέλεχος, αλλά περιείχε γονίδια που ήταν πανομοιότυπα, με αυτά που βρέθηκαν στο αρχικό στέλεχος, υπεύθυνο για την έξαρση. Αυτά τα ευρήματα, υποδεικνύουν ότι τα γονίδια που σχετίζονται με την παθογένεια του *V. Parahaemolyticus,* επηρεάζονται από τον ποικίλο και μεταβαλλόμενο βακτηριακό πληθυσμό στα οστρακοειδή, στην περιοχή αυτή [74].

4.3. Σύνδεση με κλιματική αλλαγή

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, πρόσφατα δεδομένα, έδειξαν ότι η συχνότητα εμφάνισης ασθενειών που σχετίζονται με το *Vibrio,* αυξάνεται, σε αντίθεση με παθογόνα που παραδοσιακά εμπλέκονταν στην ασφάλεια των τροφίμων. Ιδιαίτερης σημασίας, είναι ένας πρωτοφανής αριθμός λοιμώξεων που εμφανίστηκαν στις Βόρειες Ευρωπαϊκές χώρες και σχετίζονταν, με την κολύμβηση σε κλειστό χώρο και τη κολύμβηση σε παράκτια ύδατα. Την ίδια χρονική περίοδο, η διάρκεια εκπομπής των καυσαερίων έχει κατακόρυφα αυξηθεί (π.χ. 1994, 1997, 2003, 2006, 2010) και αναμένεται ότι, καθώς η υπερθέρμανση του πλανήτη συνεχίζεται, τα γεγονότα αυτά, ενδέχεται να αυξηθούν σε συχνότητα και ένταση [77].

Το πανδημικό στέλεχος O3: K6 του *V. Parahaemolyticus,* εμφανίστηκε στην Ασία περίπου το 1996. Εμφανίστηκε στις Ηνωμένες Πολιτείες το 1998 και πιο πρόσφατα στη Χιλή, όπου προκάλεσε εκατοντάδες λοιμώξεις, με αποτέλεσμα την πρώτη πανδημία του *V. Parahaemolyticus,* στην ιστορία. Η εμφάνιση αυτού του μολυσματικού ορότυπου στην Ευρώπη, προκαλεί ανησυχία για τη δημόσια υγεία και τονίζει την ανάγκη να περιληφθεί το *V. Parahaemolyticus,* στη μικροβιολογική επιτήρηση και να επανεξεταστούν τα προγράμματα ελέγχου για τις περιοχές συγκομιδής οστρακοειδών και τα έτοιμα για κατανάλωση, θαλασσινά [36].

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:11:01 EEST - 18.116.85.64

Τα στελέχη που ανήκουν στο γένος *Vibrio,* αντιπροσωπεύουν ένα από τα μεγαλύτερα κλάσματα των θαλάσσιων μικροοργανισμών, συμπεριλαμβανομένων, περισσότερων από 110 αναγνωρισμένων ειδών, εκ των οποίων, πολλά, είναι γνωστά παθογόνα των ανθρώπων και των ζώων και είναι αυτόχθονα στο θαλάσσιο περιβάλλον.

Η χολέρα, μια ασθένεια με παγκόσμια εξάπλωση, προκαλείται από τον παθογόνο *V. cholerae* και είναι υπεύθυνη για περίπου 3-5 εκατομμύρια κρούσματα και 100.000-120.000 θανάτους, κάθε χρόνο. Τα παθογόνα στελέχη *V. parahaemolyticus* και *V. Vulnificus,* συνδέονται επίσης, με υψηλή νοσηρότητα και θνησιμότητα σε ολόκληρο τον κόσμο. Τα μέλη αυτών των ειδών, έχουν γίνει και εξακολουθούν να είναι, τρομερά παθογόνα, ιδιαίτερα τα *V. cholerae O1* και *V. parahaemolyticus serotype O3: K6*, τα οποία ευθύνονται για δύο από τις σημαντικότερες βακτηριακές πανδημίες [78].

Στο υδάτινο περιβάλλον, τα βακτήρια του είδους *Vibrio,* βρίσκονται συνδεδεμένα με οργανισμούς που περιέχουν χιτίνη, ειδικά με το ζωοπλαγκτόν, το οποίο αντιπροσωπεύει μία από τις σημαντικότερες περιβαλλοντικές δεξαμενές αυτών των βακτηρίων στη φύση. Υπάρχει περιορισμένη κατανόηση των παραγόντων που πυροδοτούν επιδημίες *Vibrio* σε παγκόσμια κλίμακα, καθώς και η παρουσία και η φύση μιας αιτιώδους συνάφειας, μεταξύ της εξάπλωσης των ασθενειών του *Vibrio* και της κλιματικής αλλαγής. Αυτός ο περιορισμός μπορεί να εξηγηθεί, τουλάχιστον εν μέρει, από την έλλειψη μεσοκλίμακων ιστορικών δεδομένων, από μικροβιολογικές μελέτες, κυρίως, λόγω του κόστους και των χρονικών περιορισμών, για τη διεξαγωγή μικροβιολογικής παρακολούθησης μεγάλης κλίμακας (78).

Σύμφωνα με τον Ευρωπαϊκό Οργανισμό Περιβάλλοντος, η αύξηση της παγκόσμιας θερμοκρασίας της επιφάνειας της θάλασσας (SST), είναι μία από τις σημαντικότερες φυσικές επιπτώσεις της κλιματικής αλλαγής. Ωστόσο, το SST στις παράκτιες ευρωπαϊκές θάλασσες, έχει αυξηθεί 4-7 φορές ταχύτερα τις τελευταίες δεκαετίες, από ότι στους παγκόσμιους ωκεανούς. Αυτή η τοπική αύξηση του SST, έχει συνδεθεί με εστίες νόσων που συνδέονται με *Vibrio,* που προκαλούνται από *V. cholerae non O1-non-O139, V. parahaemolyticus* και *V. Vulnificus,* σε αρκετές ευρωπαϊκές χώρες. Ωστόσο, η έλλειψη υποχρεωτικών συστημάτων κοινοποίησης για τις ασθένειες που σχετίζονται με το *Vibrio,* εμποδίζει την ακριβή εκτίμηση του αριθμού των μολύνσεων, που συμβαίνουν στην Ευρώπη. Η σχετική βιομηχανία απειλείται συνεχώς από το *V. salmonicida* και το *V. anguillarum*. Επιπλέον, τα διάφορα υποείδη του *Photobacterium damselae,* σχετίζονται με ασθένειες σε είδη καλλιεργούμενων ψαριών, όπως η γλώσσα, το λαβράκι, η τσιπούρα και το καλκάνι, ενώ το *V. Vulnificus,* προκαλεί αιμορραγική σηψαιμία στο χέλι, στο derbio, στην τιλάπια, στην πέστροφα και τις γαρίδες, αλλά μπορεί επίσης, να προκαλέσει σηψαιμία στους ανθρώπους. Οι λοιμώξεις των ειδών του γένους *Vibrio*, όπως του *V. coralliilyticus*, έχουν συνδεθεί με την αύξηση της

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:11:01 EEST - 18.116.85.64

μαζικής θνησιμότητας των βενθικών κοραλλιών, όπως του *Paramuricea clavata*, στη ΒΔ Μεσόγειο [71, 78].

Για την κάλυψη της μεγάλης ποικιλομορφίας μολυσματικών βακτηρίων, η ανάπτυξη λειτουργικών εργαλείων για τον εντοπισμό των εμφανιζόμενων παθογόνων παραγόντων, είναι ουσιώδης, για την παρακολούθηση των καλλιεργούμενων ειδών, καθώς και για τους άγριους πληθυσμούς, των θαλάσσιων οργανισμών. Ωστόσο, σε σύγκριση με τα ανθρώπινα πανδημικά στελέχη, λίγα είναι γνωστά για τους μηχανισμούς μολυσματικότητας των αναδυόμενων αυτών περιβαλλοντικών βακτηρίων. Αυτή η έλλειψη γνώσεων, μπορεί να αποδοθεί, στην υψηλή γενετική ποικιλομορφία των προϊόντων απομόνωσης των ειδών του γένους *Vibrio* και στην ποικιλομορφία / πληθώρα, των μηχανισμών μολυσματικότητας.

Μέχρι σήμερα, η παθογόνος ικανότητα τους, δεν μπορεί να συναχθεί από την ταξινομική σχέση, διότι, οι παράγοντες μολυσματικότητας (π.χ. συστήματα έκκρισης, τοξίνες), είναι σπάνια ειδικοί για το είδος και συχνά μοιράζονται μεταξύ των ειδών *Vibrio,* με μεταφορά γονιδίων. Επιπλέον, υπάρχουν πολύ λίγα ζωικά μοντέλα, για να διακρίνουν τα παθογόνα στελέχη και να επεκτείνουν την κατανόησή μας για τους μηχανισμούς που εμπλέκονται στις αλληλεπιδράσεις, ξενιστή-μικροβίου. Ως εκ τούτου, η διασαφήνιση της λοιμογόνου δράσης για τον παράγοντα και τον στόχο, αποτελεί προϋπόθεση, για την ανάπτυξη προληπτικών μεθόδων για την καταπολέμηση μολυσματικών ασθενειών [69, 78].

Λόγω της έκτασης των περιβαλλοντικών, οικονομικών και δημοσίων συνεπειών που προκύπτουν από τις λοιμώξεις του *Vibrio,* υπάρχει έντονη ερευνητική δραστηριότητα σχετικά με τα βακτήρια αυτά, στην Ευρώπη [79].

Το βακτήριο, έχει την ιδιότητα να αναπτύσσεται κατά προτίμηση, σε ζεστά (> 15 ° C), αλατούχα υδρόβια περιβάλλοντα. Η θέρμανση των θαλάσσιων και αλατούχων υδάτων, είναι πιθανό να υποστηρίξει μεγαλύτερους πληθυσμούς και κατά συνέπεια αυξημένο κίνδυνο μολύνσεων από το παθογόνο. Η αύξηση του επιπολασμού των λοιμώξεων του ανθρώπου, που προκαλούνται από τα *V. parahaemolyticus, V. cholerae non-O1-non-O139* και *V. Vulnificus,* έχει καταγραφεί στην Ευρώπη ακόμη και σε μεγάλα γεωγραφικά πλάτη. Στη Βόρεια Ευρώπη, η αύξηση των αναφερόμενων λοιμώξεων, αντιστοιχεί τόσο σε χρόνο όσο και σε διάστημα, με αιχμές στις εγχώριες περιπτώσεις *Vibrio,* σε ημερολογιακά έτη, με μεγαλύτερες θερμοκρασίες περιβάλλοντος. Ομοίως, τα δείγματα που συλλέχθηκαν τα τελευταία 60 χρόνια στα πλαίσια της έρευνας συνεχούς καταγραφής πλαγκτόν (CPR), έδειξαν ότι το γένος *Vibrio*, συμπεριλαμβανομένου του ανθρώπινου παθογόνου *V. cholerae*, έχει αυξηθεί τα τελευταία 44 χρόνια στις περιοχές της παράκτιας Βόρειας Θάλασσας και ότι η αύξηση αυτή, συσχετίζεται με τη θέρμανση του SST. Οι αυξημένες θερμοκρασίες νερού,

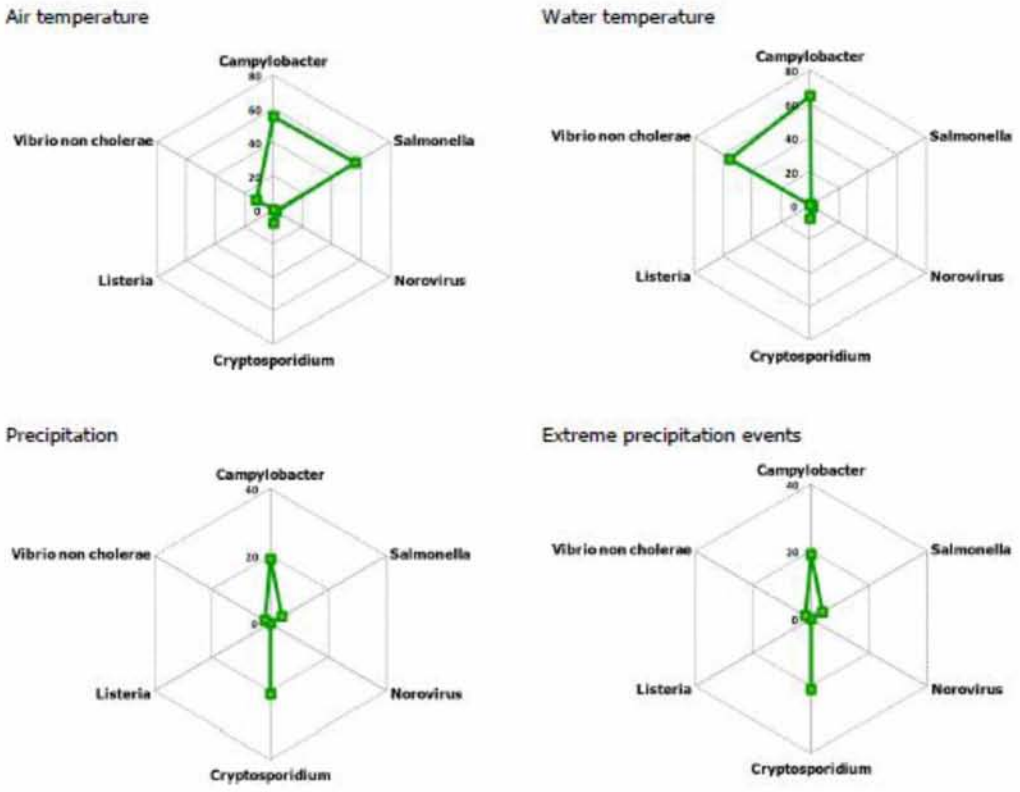
Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:11:01 EEST - 18.116.85.64

μπορούν επίσης να διευκολύνουν τη διάδοση παθογόνων στελεχών μέσω του εμπορίου των τροφίμων, το νερό, τους ταξιδιώτες, ή τα ζώα του φυσικού περιβάλλοντος. Για παράδειγμα, τα μεταναστευτικά πουλιά, μπορούν να δρουν, ως φορείς της διηπειρωτικής μεταφοράς του *V. cholerae*. Ως μελλοντική πρόκληση, απαιτούνται μακροοικονομικές μελέτες, σχετικά με τον αντίκτυπο της αλλαγής του κλίματος, στην επιμονή και διάδοση του *Vibrio* στο υδάτινο περιβάλλον, σε συνδυασμό με, μελέτες που διερευνούν τις επιπτώσεις της κλιματικής αλλαγής, σε επιδημιολογικά σημαντικές μεταβλητές, όπως η ευαισθησία και η έκθεση του ξενιστή, προκειμένου να βελτιωθεί σημαντικά η πρόβλεψη και ο μετριασμός, στρατηγικές, κατά της μελλοντικής εμφάνισης κρουσμάτων νόσου Vibrio [3].

Σε έρευνα που διενέργησε το ECDC και αφορούσε στη συσχέτιση της κλιματικής αλλαγής με την εμφάνιση στην Ευρώπη έξι παθογόνων μικροοργανισμών που αναπτύσσονται στο νερό και τα τρόφιμα και είναι υπεύθυνοι για την πρόκληση λοιμώξεων στον άνθρωπο, των *Campylobacter, Cryptosporidium, Listeria, Norovirus, Salmonella* και μη χολερογόνο *Vibrio*, με βάση τη μελέτη της σχετικής βιβλιογραφίας, προέκυψαν τα ακόλουθα συμπεράσματα:

- Η έρευνα, περιέλαβε επιστημονικές πηγές και άρθρα, που δημοσιεύτηκαν την περίοδο μεταξύ 1998 και 2009 και αφορούσαν στα συγκεκριμένα θεματικά και χωρικά (δηλαδή σχετιζόμενα με τη συγκεκριμένη γεωγραφική περιοχή), στοιχεία. Για τους σκοπούς της έρευνας, δημιουργήθηκε μια εξελιγμένη βάση δεδομένων για να διευκολύνει την ανάλυση των αποτελεσμάτων της ανασκόπησης της βιβλιογραφίας και να επιτρέψει τη διερεύνηση των σχέσεων μεταξύ κλιματικών μεταβλητών και παθογόνων βακτηρίων, που αναπτύσσονται στα τρόφιμα και στο νερό.
- Από τη συγκεκριμένη έρευνα, προέκυψε η ύπαρξη ενός σύνθετου δικτύου σχέσεων μεταξύ των κλιματολογικών και περιβαλλοντικών παραγόντων και των ασθενειών που οφείλονται στα τρόφιμα και τα ύδατα. Ειδικότερα, όλα τα παθογόνα που εξετάστηκαν σε αυτή τη μελέτη, αναφέρθηκαν από τη βιβλιογραφία συσχετίζονται με κάποια περιβαλλοντική μεταβλητή, που σχετίζεται με την αλλαγή του κλίματος, όπως προκύπτει και από το Σχήμα 2 [119].

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:11:01 EEST - 18.116.85.64



Σχήμα 2.: Συσχέτιση των παθογόνων, με τις παραμέτρους του κλίματος, θερμοκρασία αέρα (πάνω αριστερά), θερμοκρασία νερού (πάνω δεξιά), βροχοπτώσεις (κάτω αριστερά) και ακραίες βροχοπτώσεις (κάτω δεξιά) (ECDC, 2012) [119].

- Για παράδειγμα, ο κίνδυνος καμπυλοβακτηρίωσης, συνδέεται θετικά με την μέση εβδομαδιαία θερμοκρασία αρκετά συχνά, αν και αυτή η συσχέτιση, δεν προκύπτει από όλες τις μελέτες. Για τη σαλμονέλωση όμως, εμφανίστηκε υψηλή συσχέτιση με τη μέση εβδομαδιαία θερμοκρασία και επιπρόσθετα, αναφέρεται ότι στο ένα τρίτο των περιπτώσεων σαλμονέλωσης, το κύριο αίτιο είναι, οι διακυμάνσεις της θερμοκρασίας [119].
- Μη τακτικές και έντονες βροχοπτώσεις, συνδέονται με επιδημίες *Cryptosporidium* spp., ενώ το *Vibrio* sp., εμφανίζει αυξημένους ρυθμούς ανάπτυξης στα παράκτια ύδατα, κατά τη διάρκεια καλοκαιριών με υψηλές θερμοκρασίες. Έτσι λοιπόν, σύμφωνα με τις κλιματικές προβλέψεις, αναμένεται να είναι δυνητικά αυξημένη η μετάδοση των *Cryptosporidium* spp., του *Vibrio* spp., της *Salmonella* spp. και του *Campylobacter* spp., αποτελώντας, μεγαλύτερους κινδύνους για τη δημόσια υγεία [119].

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:11:01 EEST - 18.116.85.64

Κεφάλαιο 5: Αναδυόμενα στελέχη του V.parahaemoliticus και παράγοντες επικινδυνότητας.

Έχει παρατηρηθεί, πώς οι λοιμώξεις που προκαλούνται από το *V. parahaemolyticus*, ένα αλόφιλο μέλος του γένους *Vibrio*, έχουν αυξηθεί παγκοσμίως τα τελευταία 5 χρόνια. Πρόσφατα, τρείς μείζονες ορότυποι, οι O3: K6, 04: K68 και O1: K (KUT), που απαριθμούνται με χρονολογική σειρά εμφάνισης, διαπιστώθηκε ότι, έχουν προκαλέσει μια πανδημία, μέσω λοίμωξης από *V. parahaemolyticus*. Τα στελέχη αυτών των οροτύπων, είναι υπεύθυνα, για την εμφάνιση έξαρσης τροφιμογενούς γαστρεντερίτιδας στην Ινδία, καθώς και σε άλλες χώρες της Νοτιοανατολικής Ασίας και στις Ηνωμένες Πολιτείες [33]. Στην Calcutta, τα στελέχη του ορότυπου O3: K6, παρατηρήθηκε, μέσα από μελέτες που αναδρομικά πραγματοποιήθηκαν ότι, ήταν υπεύθυνα για την υψηλή συχνότητα εμφάνισης γαστρεντερίτιδας, από τον Φεβρουάριο του 1996. Ομοίως, αυτός ο ορότυπος, απομονώθηκε και σε άλλες ασιατικές χώρες, συμπεριλαμβανομένων των Λάος, Ταϊβάν και Ιαπωνίας, αλλά και τις Ηνωμένες Πολιτείες. Αυτή η ανησυχητική άνοδος ενός ορότυπου από το παρελθόν, που σχετίζεται μόνο με σποραδικά κρούσματα γαστρεντερίτιδας, παρακολουθήθηκε στενά.

Τα στελέχη O3: K6, που είχαν απομονωθεί πριν από το 1995 και εκείνα που απομονώθηκαν από το 1995 και νεότερα, αναλύθηκαν, ώστε να διαπιστωθούν παραλλαγές στη νουκλεοτιδική αλληλουχία της περιοχής toxRS, διαπιστώνοντας διαφορές, σταθερά εντός της περιοχής, σε επτά βάσεις μήκους 1,364 bp [63]. Δύο από τις επτά βάσεις, χρησιμοποιήθηκαν για να αναπτυχθούν συγκεκριμένες ομάδες, για αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράση (GS-PCR), ώστε να διακρίνονται μοριακά μεταξύ τους, τα νέα και παλιά στελέχη των O3: K6, που απομονώνονται. Η εξέταση των προϊόντων απομόνωσης με GS-PCR, έδειξε, ότι οι αλληλουχίες toxRS, των πρόσφατων απομονομένων οροτύπων O4: K68 και O1: KUT, ήταν πανομοιότυποι με αυτούς των νέων απομονωμένων οροτύπων O3: K6 [36]. Όλα τα στελέχη των νέων κλώνων, (ανεξάρτητα από τον ορότυπο ή τον τόπο απομόνωσης), έφεραν το γονίδιο tdh, αλλά όχι το γονίδιο trh. Το προφίλ PCR, είναι διαφορετικό από τα στελέχη άλλων οροτύπων, υποστηρίζοντας την υπόθεση, ότι τα στελέχη O4: K68 και O1: KUT, εξελίχθηκαν από το νεοεμφανιζόμενο κλώνο O3: K6.

Η οργάνωση των γονιδίων rrn, στο χρωμόσωμα του *V. Parahaemolyticus,* εξετάστηκε με Southern υβριδοποίηση BglIdigested, με rRNA-ειδικό DNA, μόριο υβριδισμού. Τα στελέχη του νέου οροτύπου O3: K6, του O4: K68 και του O1: KUT, παρουσίασαν το πρότυπο της ριβοσωμικής ταινίας R4, το οποίο, ήταν το κύριο μοτίβο που παρατηρήθηκε στο 76% των απομονώσεων του O3: K6, στην Ινδία. Ωστόσο, το O3: K6, στέλεχος FIHES98VI-32-4, που απομονώθηκε στην Ιαπωνία, το οποίο ήταν χωρίς το γονίδιο tdh, διέφερε στην περιοχή των 23,1 kb. Ένα άλλο στέλεχος O3: K6, το BE98-2062, που απομονώθηκε στις Ηνωμένες

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:11:01 EEST - 18.116.85.64

Πολιτείες, διέφερε από τα άλλα στελέχη, σε μία ζώνη κοντά στην περιοχή των 6.0 kb. Τα αντιπροσωπευτικά μη πανδημικά στελέχη, συμπεριλαμβανομένων του παλιού οροτύπου O3: K6 και του οροτύπου O1: KUT, αναλύθηκαν με παρόμοιο τρόπο, για την οργάνωση των γονιδίων rrn. Τα μη πανδημικά αυτά στελέχη, έδειξαν ετερογενή προφίλ από εκείνο που υπάρχει στα πανδημικά στελέχη. Εκτός από το tdh-αρνητικό O3: K6 στέλεχος, από την Ιαπωνία (FIHES98VI-32-4), φάνηκε ότι, όλα τα στελέχη O3: K6, έχουν σχεδόν ταυτόσημες μορφές RFLP. Στο O3: K6 στέλεχος, BE98-2062, απομονωμένο στις Ηνωμένες Πολιτείες, εμφανίστηκαν μικρές διαφοροποιήσεις από τα άλλα στελέχη, κοντά στην περιοχή των 58,5kb. Τα πρότυπα με τη μέθοδο ηλεκτροφόρησης PFGE, όλων των στελεχών O4: K68, που απομονώθηκαν από διαφορετικές γεωγραφικές τοποθεσίες, ήταν ίδια και σχεδόν παρόμοια, με τα αντίστοιχα πρότυπα των στελεχών O3: K6. Τα στελέχη αυτού του ορότυπου, ωστόσο, διέφεραν από τα στελέχη O3: K6 κατά μία ζώνη, κοντά στην περιοχή 240 kb και από την υψηλότερη ένταση μιας ζώνης, στην περιοχή των 194 kb, η οποία, μπορεί να υποδηλώνει τη συρροή περισσότερων της μιας, ζώνης. Δεδομένου ότι όλες οι απομονώσεις των τριών διαφορετικών οροτύπων, εκτός από το FIHES98VI-32-4, που ποικίλλει κατά μια ή δύο ζώνες, όλα, φαίνεται να προέρχονται, από έναν κοινό πρόγονο. Η διακύμανση, μπορεί να οφείλεται στη διαφορά της γενετικής οργάνωσης του O αντιγόνου και των συστάδων γονιδίων βιοσύνθεσης, του αντιγόνου K. Μέχρι πρόσφατα, η σποραδική και εντοπισμένη διάρροια, που προκαλούνταν από το *V. Parahaemolyticus,* ήταν περιορισμένη, σε αντιθεση με αυτήν που προκαλούν τα τοξογενικά στελέχη του *V. cholerae* O1 και O139 και δεν είχαν συνδεθεί ποτέ, μέχρι τα τελευταία χρόνια, με μια πανδημία. Ωστόσο, με την εμφάνιση των νέων στελεχών O3: K6, η επιδημιολογία αυτού του οργανισμού, άλλαξε απότομα. Η κυρίαρχη και συνεχιζόμενη εμφάνιση αυτού του ορότυπου, έχει αναφερθεί από οκτώ χώρες.

Η έκταση και η ταχύτητα διάδοσης των νέων στελεχών του ορότυπου O3: K6, ήταν εκείνα που σηματοδότησαν την αρχή της πρώτης πανδημίας του *V. parahaemolyticus*. Σημαντικό είναι ότι, ο πολυμορφισμός που παρατηρήθηκε μεταξύ των πανδημικών και μη πανδημικών στελέχων των διάφορων οροτύπων, υποδεικνύει, πώς υπάρχουν αναδυόμενα στελέχη, που έχουν εξελιχθεί και διατηρούν τους λοιμογόνους παράγοντες, όντας περισσότερο επικίνδυνους [63, 67].

Τις τελευταίες δύο δεκαετίες, οι μολύνσεις και οι εστίες του *V. Parahaemolyticus,* έχουν αυξηθεί σε ολόκληρο τον κόσμο. Οι περισσότερες από αυτές τις νέες περιπτώσεις, ανήκουν σε ένα πανδημικό σύμπλεγμα, γνωστό ως CC3, το οποίο εντοπίστηκε αρχικά, το Φεβρουάριο του 1996, στην Ινδία. Η εμφάνιση του CC3, προκάλεσε ανησυχίες για την δημόσια υγεία, σχετικά με τη δυνητική παγκόσμια εξάπλωση του μολυσματικού *V. parahaemolyticus*, το οποίο προηγουμένως, είχε περιοριστεί σε συγκεκριμένες περιοχές. Άλλα κλωνικά σύμπλοκα

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:11:01 EEST - 18.116.85.64

του *V. parahaemolyticus*, συγκεκριμένα CC36 και CC34, έχουν παρατηρηθεί μεταξύ των παράκτιων στελεχών των ΗΠΑ και τα στελέχη του Sequence Type (ST) 36, ο προγονικός τύπος του CC36, έχουν βρεθεί στη δυτική ακτή του Καναδά. Παρόλο που οι λοιμώξεις στις ΗΠΑ, προκαλούνται συνήθως από τα στελέχη CC36, τα οποία είναι ενδημικά στη Δυτική Ακτή [80], μια επιδημία στο Μέριλαντ το 2012, προκλήθηκε, από στελέχη που ανήκουν στον ορότυπο CC3 [33]. Οι τροφικές ασθένειες που οφείλονται στο *V.* Parahaemolyticus, αναφέρθηκαν ασυνήθιστα στις ΗΠΑ και στην πολιτεία του Maryland.

Ένα ξέσπασμα στην Ισπανία, το καλοκαίρι του 2012, αποδόθηκε σε στελέχη που ήταν ST36 και σχετίζονταν με μαγειρεμένα αλιεύματα που είχαν ψυχθεί, με μη επεξεργασμένο τοπικό θαλασσινό νερό [4], σε αντίθεση με τις λοιμώξεις στις ΗΠΑ, που συχνά συνδέονται με την κατανάλωση μολυσμένων στρειδιών. Οι αριθμοί των λοιμώξεων του *V. Parahaemolyticus,* φαίνεται να έχουν αυξηθεί περίπου 4 φορές στις ΗΠΑ, την τελευταία δεκαετία [37]. Οι Scallan et al. (2011), ανέφεραν ότι ο μέσος όρος περιστατικών για τις λοιμώξεις του *V. Parahaemolyticus,* ετησίως στις ΗΠΑ, ήταν περίπου 35.000 την περίοδο 2000-2008, ενώ οι Mead et al. (1999), ανέφεραν περίπου 8000 λοιμώξεις ετησίως, κατά την περίοδο 1992-1997. Ο αυξανόμενος αριθμός λοιμώξεων, θα μπορούσε να έχει επιζήμιες επιπτώσεις στη δημόσια υγεία και την οικονομική ανάπτυξη, ιδίως στις περιοχές, όπου η συγκομιδή και η κατανάλωση αλιευμάτων, είναι σημαντικές. Ωστόσο, η ενεργή παρακολούθηση, εξαρτάται από την ύπαρξη αποτελεσματικών τρόπων, για τον εντοπισμό και την παρακολούθηση της φύσης, ή της ταυτότητας των στελεχών του *V. parahaemolyticus,* που προκαλούν εστίες. Διάφορες μέθοδοι έχουν χρησιμοποιηθεί, για τη διάκριση απομονωθέντων στελεχών για επιδημιολογικές έρευνες. Η Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE), είναι μια μέθοδος για τον προσδιορισμό γονότυπων των απομονώσεων του *V. parahaemolyticus* [35] και θεωρείται το «χρυσό πρότυπο», για τις έρευνες εξάρσεων. Μία άλλη κοινή μέθοδος για τον χαρακτηρισμό των απομονώσεων του *V. Parahaemolyticus,* είναι η Multilocus Sequence Typing (MLST). Η μέθοδος αυτή, βασίζεται στην άμεση ανάλυση αλληλουχίας των γονιδίων που διατηρούνται σταθερά (housekeepinggenes), καθιστώντας την MLST καλύτερη για μακροπρόθεσμες εξελικτικές μελέτες [81]. Τα τελευταία 5 χρόνια, οι επιστήμονες έχουν αρχίσει να χρησιμοποιούν γονιδιωματικές τεχνικές, για να αναλύσουν ιστορικές συλλογές παθογόνων μικροοργανισμών και απομονωμένων στελεχών, προσφέροντας νέες παρατηρήσεις για τις έρευνες. Οι αναλύσεις δεδομένων για τον προσδιορισμό αλληλουχιών ολόκληρου του γονιδιώματος (WGS) και WGS-SNP, μας επιτρέπουν να κατανοήσουμε καλύτερα τη δυναμική των πληθυσμών και τους μηχανισμούς, που συμβάλλουν στην αύξηση της μολυσματικότητας μεταξύ των βακτηριακών παθογόνων, που μεταδίδονται με τρόφιμα, συμπεριλαμβανομένων των εστιών της Salmonella.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:11:01 EEST - 18.116.85.64

Γεγονός αποτελεί ότι, το *V. Parahaemolyticus,* είναι ένας εξαιρετικά διαφοροποιημένος μικροοργανισμός, τεκμηριωμένος από τον υψηλό αριθμό SNP, που περιέχει στο γονιδίωμά του. Παρόλα αυτά, μια παρόμοια ομαδοποίηση με εκείνη που επιτυγχάνεται με ανάλυση MLST, μπορεί να παρατηρηθεί για τα στελέχη *V. parahaemolyticus*, όπως πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια μίας έρευνας στο Maryland [82], όπου, παρατηρήθηκαν πέντε ομάδες σχετικών στελεχών, σύμπλεγμα I (ST36), σύμπλεγμα II (ST653), σύμπλεγμα III (ST113), σύμπλεγμα IV (ST631) και σύμπλεγμα V (ST3). Υπάρχουν αρκετοί διαφορετικοί υποτύποι του γονιδίου tdh, που εμφανίζουν κάποιες διαφορές μεταξύ τους (tdh1 έως tdh5), αλλά έχουν 96-98% ομοιότητα. Στην περίπτωση των γονιδίων trh, υπάρχουν δύο αναγνωρισμένοι υποτύποι (trh, trh2), οι οποίοι έχουν 84% ομοιότητα. Το μεγαλύτερο μέρος των κλινικών δειγμάτων του βακτηρίου που αναλύθηκαν, έφεραν tdh και / ή trh. Δέκα απομονωμένα στελέχη (28%), ήταν αρνητικά για το tdh και το trh, τα τρία (8%), ήταν μόνο tdh θετικά, τέσσερα (11%), ήταν μόνο θετικά trh και τα υπόλοιπα 19, (53%), περιείχαν και τα δύο γονίδια. Δεν ήταν ασυνήθιστο να διαπιστωθεί ότι, το 28% αυτών των κλινικών δειγμάτων, δεν έφερε tdh ή trh, καθώς αυτά τα στελέχη, θεωρούνται συνήθως μη παθογόνα [82]. Υπήρξαν μερικές πρόσφατες αναφορές του *V. Parahaemolyticus,* χωρίς τους δύο δείκτες παθογονικότητας, που προκαλούν σποραδικά κρούσματα ασθενειών. Οι Jones et al. (2012), ανέφεραν ότι το 27% των κλινικών στελεχών που συλλέχθηκαν σε όλες τις ΗΠΑ, από τον Ιούλιο του 2006 έως τον Νοέμβριο του 2007, ήταν αρνητικά στην παρουσία tdh / trh, ενώ οι Banerjee et al. (2014), ανέφεραν τον ίδιο γονότυπο, για το 4% των κλινικών στελεχών που συλλέχθηκαν στον Καναδά, κατά την περίοδο 2000-2009. Επιπλέον, η πλειονότητα των στελεχών tdh / trh αρνητικών (70%), απομονώθηκαν, είτε από μολύνσεις, είτε από τραύματα. Αυτό υποδηλώνει περαιτέρω, ότι αυτοί οι δύο δείκτες, δεν είναι απαραίτητοι για την αντιμετώπιση των λοιμώξεων, παρόλο που είναι πιθανό, αυτοί οι ασθενείς, να έχουν κάποιο είδος ανοσοανεπάρκειας, που θα τους καθιστούσε περισσότερο επιρρεπείς σε λοιμώξεις (χρόνια ηπατική νόσο), όπως παρατηρήθηκε για το *V. vulvifus* [83].

Μεταξύ των πολυανθεκτικών βακτηριακών στελεχών (MD), μόνο τρία, είχαν το γονίδιο tdh1 , αναγνωρίστηκαν ότι ανήκουν, στο πανδημικό κλωνικό σύμπλεγμα και ήταν ST3, ενώ μόνο δύο στελέχη MD, είχαν το γονίδιο trh2. Μια μελέτη του περιβαλλοντικού στελέχους στη Νορβηγία, αναγνώρισε στελέχη που περιείχαν μόνο το γονίδιο trh2, ωστόσο αυτά τα στελέχη, ανήκαν σε διαφορετικά STs [83]. Η διαθεσιμότητα αυτών των γονιδίων, θα μπορούσε να βοηθήσει στην ανίχνευση των άλλων γονιδίων εκτός από τα tdh και trh, για την παθογένεση αυτού του θαλάσσιου βακτηρίου. Τέσσερα άλλα στελέχη MD, έφεραν, είτε το γονίδιο VpaI1 (VP10), είτε VpaI2 (VP2 και VP14), έχοντας αλληλουχία, διαφορετική από εκείνη του πανδημικού στελέχους. Από τα 9 στελέχη MD χωρίς γονίδιο tdh ή trh, έξι, έφεραν ένα γονίδιο T6SS, διαφορετικό από αυτό, που ήταν υπεύθυνο για την πανδημία. Από τις

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:11:01 EEST - 18.116.85.64

παραπάνω μελέτες, διαπιστώθηκε ότι, τα γονίδια tdh, trh και το σύστημα T3SS2, είναι απαραίτητα για την παραγωγή λοιμώξεων στο εντερικό σύστημα, επειδή τα γονίδια tdh και trh, προκαλούν εντερική υγρή έκκριση, καθώς και κυτταροτοξικότητα σε μια ποικιλία τύπων κυττάρων, ενώ το TTSS2, έχει ρόλο στην εντεροτοξικότητα. Τα στελέχη αυτά, εξακολουθούν να περιέχουν και το σύστημα TTSS1, το οποίο συμβάλλει στην κυτταροτοξικότητα [83].

5.1.Παρουσία του Vibrio parahaemolyticus στα αλιεύματα.

Οι πληθυσμοί των παθογόνων στελεχών του *V. Parahaemolyticus* στα οστρακοειδή, εξαρτώνται, από τις φυσικές περιβαλλοντικές μεταβλητές, όπως η θερμοκρασία και η αλατότητα του νερού. Υπάρχουν όμως και βιολογικές μεταβλητές, οι οποίες επηρεάζουν την ικανότητα των ανταγωνιστικών, μη παθογόνων βακτήριων και βακτηριοφάγων, ικανών να θανατώνουν το *V. parahaemolyticus*. Οι περιπτώσεις διάρροιας, σχετιζόμενης με τα αλιεύματα, αυξήθηκε σημαντικά, με την άφιξη του πανδημικού στελέχους O3: K6, που παρατηρήθηκε αρχικά στη Νοτιοανατολική Ασία. Αυτό το στέλεχος, αντιστοιχεί σε ένα κλωνικό σύμπλεγμα. Η κλωνική φύση του *V. Parahaemolyticus,* διαπιστώθηκε από τον υψηλό βαθμό ομοιότητας μεταξύ των γονιδίων. Αυτή η σύγκριση, περιλαμβάνει την παρουσία ειδικών γενετικών δεικτών και την ομοιότητα των περιοριστικών προτύπων στα γονιδιώματά τους, που καταδεικνύεται από τα θραύσματα του γονιδιώματος, με νουκεάσες περιορισμού, με ηλεκτροφόρηση παλλόμενου πεδίου, κατευθείαν ανάλυση του γονιδιώματος με περιοριστικά ένζυμα (DGREA). Χαρακτηριστικά των απομονώσεων του πανδημικού κλώνου O3: K6, είναι τα O3: K6 αντιγόνα, μια ξεχωριστή αλληλουχία toxRS (toxRS new), τα γονίδια orf8 και tdh, και η απουσία του trh γονιδίου, που βρίσκεται σε ορισμένα παθογόνα στελέχη [84].

Μέχρι το 2007, περισσότερο από το 95% των περιπτώσεων, αφορούσαν την κλασική πανδημία του *V. Parahaemolyticus,* με το στέλεχος O3: K6 [83]. Παραλλαγές του πανδημικού στελέχους, παρατηρήθηκαν, όταν μειώθηκαν οι εστίες μόλυνσης, από τα μέχρι εκείνη τη στιγμή αναγνωρισμένα στελέχη, προσδιορίζοντας ένα καινούργιο πανδημικό στελέχος, το O3: K59. Μάλιστα, παρατηρήθηκε, η μεταβίβαση της παθογονικότητας του συστήματος έκκρισης τύπου III από έναν πανδημικό κλώνο, σε αυτόχθονο στέλεχος στη Χιλή. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πανδημικών στελεχών και της φυσικής μικροχλωρίδας, οδήγησαν, σε παραλλαγές στελεχών, που περιέχουν ένα 42-kb πλασμίδιο, που αντιστοιχεί σε ένα τελομερές, εύκρατο βακτηριοφάγο. Οι αλλαγές στην επιδημιολογία της διάρροιας που σχετίζεται με τα θαλασσινά, οφείλονται στη μείωση της ύπαρξης του πληθυσμού, στις εστίες ανάπτυξής του και σε μειωμένο επιπολασμό του πανδημικού στελέχους σε κλινικές περιπτώσεις. Το πανδημικό στέλεχος, έχει καταστεί, ως ένας σχετικά σταθερός υποπληθυσμός, του πληθυσμού του *V. parahaemolyticus* στα οστρακοειδή, ενώ

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:11:01 EEST - 18.116.85.64

παρουσιάστηκαν, παραλλαγές της πανδημικής ποικιλίας και στελέχη που δεν σχετίζονται με την πανδημία, να μπορούν να προκαλέσουν ασθένεια στον άνθρωπο [85]. Από τη μελέτη των Gonzalez-Escalona (2008), με τη μέθοδο MLST, προσδιορίστηκε η παρουσία πολλών διαφορετικών στελεχών του μελετούμενου μικροοργανισμού, καταδεικνύοντας το βαθμό ποικιλομορφίας που παρουσιάζουν, τα διαφορετικά στελέχη μεταξύ τους [85].

Το *V.parahaemolyticus,* εμφανίζεται σε μια ποικιλία ψαριών και οστρακοειδών, ανάμεσα στα οποία, περιλαμβάνονται τουλάχιστον 30 διαφορετικά είδη όπως, μύδια, στρείδια, αστακοί, χτένια, χταπόδια, καλαμάρια, σαρδέλα, σκρουμπρί, τόνος, πέρκα, γαρίδες και καβούρια. Δεδομένου, ότι απαντάται συχνότερα στα παράκτια ύδατα, δεν αποτελεί έκπληξη το γεγονός ότι, τα τρόφιμα από το περιβάλλον, είναι αυτά, που συχνότερα ενοχοποιούνται για τροφική δηλητηρίαση. Μύδια, στρείδια, αστακοί, χτένια, γαρίδες και καβούρια, έχουν εμπλακεί, ως επιβεβαιωμένα, εμπλεκόμενα τρόφιμα [4]. Σε μία μελέτη που διεξήγαγε η FDA, το 86% των δειγμάτων αλιευμάτων που εξετάστηκαν, ήταν θετικά για *V. parahaemolyticus*. Οι μετρήσεις, έχουν αναφέρει υψηλές συγκεντρώσεις 1300 CFU / g, στη σάρκα στρειδιών και 1000 CFU / g στη σάρκα του καβουριού, αν και τα επίπεδα των 10 / g είναι πιο χαρακτηριστικά για τα προϊόντα αλιευμάτων [96]. Σε μια 3-ετή έρευνα (Hackney et al., 1980), το 46% των δειγμάτων αλιευμάτων που εξετάστηκαν, βρέθηκαν θετικά, με ποσοστά θετικότητας 79% σε στρείδια, 83% σε αχιβάδες, 60% σε γαρίδες και 100% σε ζωντανά καβούρια. Οι Oliver και Kaper (1997), βρήκαν μια άλλη μελέτη στην οποία, τα θετικά δείγματα ήταν μεταξύ 69 έως 100% σε στρείδια, μύδια και γαρίδες που μελετήθηκαν και το 42% των καβουριών [4].

Ο επιπολασμός του βακτηρίου, σε φρέσκα αλιεύματα που πωλούνται στο Μεξικό, ήταν, 71,4% στα ψάρια, 44% στα στρείδια και 27,6% στις γαρίδες, με το μεγαλύτερο αριθμό θετικών δειγμάτων, να παρατηρούνται, κατά τους θερμότερους μήνες [33]. Στην Ιταλία, οι πληθυσμοί του *V.parahaemolyticus* στα αλιεύματα, είναι συνήθως, κάτω από 10^3 CFU / g, αλλά, μπορεί να αυξηθούν με την αύξηση της θερμοκρασίας των υδάτων [54]. Σε μια έρευνα των οστρακοειδών που συλλέχθηκαν από την Αδριατική θάλασσα, το *V. Parahaemolyticus*, ανιχνεύθηκε στο 1,6% των δειγμάτων [33].

Σε μια μεγάλη μελέτη των οστρακοειδών στα βρετανικά παράκτια ύδατα, οι Ayres και Barrow (1978), ανίχνευσαν το βακτήριο, στο 14% των οστρακοειδών που εξετάστηκαν, με το μεγαλύτερο ποσοστό των απομονώσεων, να πραγματοποιείται, κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού [25]. Χρησιμοποιήθηκαν δείγματα μιας ποικιλίας μαγειρεμένων αλιευμάτων, συμπεριλαμβανομένων των κοκάλων, των μυδιών και των κοκκινόψαρων, τα οποία, ύστερα από δειγματοληψία σε λιανικές εγκαταστάσεις, υποβλήθηκαν σε μια ποικιλία μικροβιολογικών δοκιμών [63]. Περίπου το ένα τρίτο των οστρακοειδών, διατηρήθηκε σε ξύδι, ή άλμη. Ο έλεγχος παρουσίας / απουσίας για τους παθογόνους μικροοργανισμούς,

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:11:01 EEST - 18.116.85.64

πραγματοποιήθηκε από τον εμπλουτισμό σε APW (με συμπλήρωμα ηλεκτρολυτών) και CB, που ακολουθείται επίστρωση, σε TCBS. Το Εργαστήριο Αναφοράς *Vibrio,* της Αγγλίας και της Ουαλίας, επιβεβαίωσε την αναγνώριση, των πιθανώς παθογόνων vibrios. Το *V. Parahaemolyticus,* ανιχνεύθηκε στο 3% των δειγμάτων, όπου έξι δείγματα περιείχαν πληθυσμούς, σε συγκεντρώσεις 200 CFU / g, ή υψηλότερες. Τριάντα εννέα δείγματα, περιείχαν συγκεντρώσεις, 10^3CFU, ή υψηλότερες.

Σε μια μελετη, που πραγματοποιήθηκε σε Αγγλία και τη Ουαλία, εξετάστηκαν συνολικά 91 δείγματα οστρακοειδών, για την παρουσία *Vibrio* spp., από τον Αύγουστο έως τον Οκτώβριο του 1999. Από αυτά, τα 25 δείγματα, (27,5%) περιείχαν *V. parahaemolyticus*, 6 δείγματα περιείχαν άλλα *Vibrio* spp., ενώ τα είδη V. *cholerae* και V. *Vulnificus,* δεν ανιχνεύθηκαν.

Στη Γαλλία (1999), απομονώθηκαν συνολικά 193 στελέχη *Vibrio* από αλιεύματα, τα οποία, εισάγονταν από 9 χώρες (Κίνα, Ισημερινό, Ινδία, Ιράν, Μαδαγασκάρη, Σενεγάλη, Τανζανία, Ταϊλάνδη και Βιετνάμ) [92].

Σε έρευνα που πραγματοποιήθηκε στο Βέλγιο, εξετάστηκαν συνολικά 1299 δείγματα αλιευμάτων και βρέθηκαν, 9 (0,7%) δείγματα, με V. *cholerae*, 311 με *V. Parahaemolyticus,* (24%), και 82 δείγματα (6,3%), με άλλα είδη *Vibrio* spp. [86]. Τα δείγματα, περιελάμβαναν ζώντα και επεξεργασμένα δίθυρα μαλάκια, καρκινοειδή και τα ψάρια διαφόρων τύπων, χρησιμοποιώντας επιλεκτικό εμπλουτισμό (2% NaCl, για αλοφιλικούς μικροοργανισμούς και 1% NaCl, για V. *cholerae*), σε TCBS και βιοχημική ταυτοποίηση.

Το *V. parahaemolyticus,* αποτελεί ένα από τα συχνότερα αίτια εκδήλωσης τροφιμογενών λοιμώξεων μετά από κατανάλωση νωπών και ατελώς θερμικά επεξεργασμένων αλιευμάτων, σε παγκόσμια κλίμακα [9]. Σε έρευνα που πραγματοποιήθηκε στην Ιταλία, αναφέρεται η απομόνωση του παθογόνου, σε ποσοστό 16% από 144 δείγματα μυδιών που εξετάστηκαν [120, 98]. Από τα στελέχη του *V. Parahaemolyticus* που απομονώθηκαν, το 30%, έφερε το γονίδιο *tdh,* ενώ όλα τα στελέχη, βρέθηκαν αρνητικά στην παρουσία του γονιδίου *trh.* Υψηλότερα ποσοστά του παθογόνου (24,3%), στην ίδια χώρα, αναφέρουν οι Ottaviani et al. (2005). Σε 144 δείγματα μυδιών, από την Αδριατική που εξετάστηκαν, τα 35, βρέθηκαν θετικά, στην παρουσία του *V. parahaemolyticus.* Τα γονίδια *tdh* και *trh,* ανιχνεύτηκαν σε 1 και 3 στελέχη του μικροοργανισμού, αντίστοιχα. Σε πρόσφατη μελέτη, οι Ottaviani et al. (2010), αναφέρουν την απομόνωση του πανδημικού στελέχους 03:K6, από κόπρανα ασθενούς, στην κεντρική Ιταλία.

Σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε στην Αγγλία, τη χρονική περίοδο 2002 έως 2006, οι Wagleyetal (2008), εξέτασαν 161 δείγματα διθύρων (στρείδια και μύδια). Από το 30% των δειγμάτων, απομονώθηκε *V. parahaemolyticus.*Το γονίδιο *tdh,* ανιχνεύθηκε στο 12% των

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:11:01 EEST - 18.116.85.64

δειγμάτων, ενώ όλα τα δείγματα, βρέθηκαν αρνητικά στην παρουσία του *trh.* Οι ερευνητές, αναφέρουν ότι τα ποσοστά απομόνωσης του παθογόνου, ήταν μεγαλύτερα κατά τους καλοκαιρινούς μήνες, ενώ δεν ανιχνεύθηκε το «πανδημικό» στέλεχος 03:K6.

Οι Chao et al. (2009), σε μελέτη που πραγματοποίησαν στην Κίνα, σε 574 δείγματα (γαρίδες, χέλια, χτένια, θαλάσσιους ιχθύες κ.α.) από ιχθυοπωλεία, ξενοδοχεία και εστιατόρια, αναφέρουν ότι, η παρουσία του *V. Parahaemolyticus* ήταν 47,2%. Από τα 341 στελέχη που απομονώθηκαν σε αυτή τη μελέτη, 80, έφεραν το γονίδιο *tdh* και 4 το γονίδιο *trh.*

Σε αντίστοιχη μελέτη, που πραγματοποιήθηκε στην Τουρκία, εξετάστηκαν 120 δείγματα νωπών και επεξεργασμένων ιχθύων, καθώς και μυδιών, από την περιοχή της Μαύρης θάλασσας [124]. Από το σύνολο των δειγμάτων, 32 βρέθηκαν θετικά στην παρουσία του *V. parahaemolyticus,* με μοριακές μεθόδους. Το 75% των θετικών δειγμάτων, προέρχονταν από μύδια και το 25% από τους ιχθύες. Τα 32 στελέχη του παθογόνου που απομονώθηκαν, εξετάστηκαν για την παρουσία των γονιδίων *tdh* και *trh.*Σε 13 στελέχη, ανιχνεύθηκε το *tdh, σε* 6 το *trh,* ενώ στα υπόλοιπα 13, ανιχνεύθηκαν και τα 2 γονίδια.

Οι Davies et al. (2001), αναφέρουν την παρουσία του *V. Parahaemolyticus, σε* 101 δείγματα ιχθύων (γαύρο, γόπα, σκουμπρί κ.α.) από την Ελλάδα, σε ποσοστό 14%. Σε άλλη μελέτη, που πραγματοποιήθηκε στη χώρα μας από τους Papadopoulou et al. (2007), εξετάστηκαν 360 δείγματα (θαλάσσιοι ιχθύες, ιχθύες γλυκού νερού, καλαμάρια, μύδια κ.α.). Το παθογόνο, ανιχνεύθηκε σε 2 δείγματα θαλάσσιων ιχθύων (γόπες).

Ο Yagnisis et al. (2007), σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε στη χώρα μας, αναφέρουν την απομόνωση, 729 στελεχών *Vibrio* (696 από δείγματα θαλάσσιων εκτρεφόμενων ιχθύων και 33 από δείγματα θαλασσινού νερού). Από τα 729 στελέχη που απομονώθηκαν, το πλέον διαδεδομένο είδος *Vibrio,* ήταν το *V. alginolyticus* (61,4%), ακολουθούμενο από το *Vibrio parahaemolyticus* με 18,6%. Σε αυτή τη μελέτη, το *Vibrio parahaemolyticus,* απομονώθηκε από λαβράκι, τσιπούρα και μυτάκι.

Σε μελέτη που διεξήχθη από τη Μονάδα Ελέγχου Μυδιών του Ινστιτούτου Ακλουτία, από τα 99 δείγματα μυδιών, από τη βορειοδυτική ακτή της Ισπανίας, το *V. Parahaemolyticus,* απομονώθηκε από το 8% των δειγμάτων, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο ISO 8914: 1990 [99].

Βάσει της οδηγίας για τα αλιευτικά προϊόντα (91/493 / ΕΟΚ), τα μαλακόστρακα και τα καρκινοειδή δίθυρα μαλάκια που μαγειρεύονται, μπορούν να ψυχθούν, είτε με πόσιμο νερό, είτε με νερό καθαρό θαλάσσιο νερό, που ορίζεται ως απαλλαγμένο από παθογόνους παράγοντες. Η πρακτική της χρήσης θαλασσινού νερού για τέτοια ψύξη, είναι ευρέως διαδεδομένη στην Ε.Ε.. Στο σύστημα ταχείας προειδοποίησης, έχει εισαχθεί το *V.*

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:11:01 EEST - 18.116.85.64

parahaemolyticus από το 1995 και έχει κοινοποιηθεί η ύπαρξή του σε θαλασσινά, που εισάγονται στην Ευρώπη από το Μπαγκλαντές, το Μπελίζ,, τον Καναδά, την Κίνα, τον Ισημερινό, την Ινδία, την Ινδονησία, την Ακτή του Ελεφαντοστού, την Μαλαισία, την Μοζαμβίκη, την Ναμίμπια, τις Κάτω Χώρες, την Νιγηρία, την Σενεγάλη, την Ισπανία,, την Σρι Λάνκα, την Τανζανία, την Ταϊλάνδη, την Τουρκία και το Βιετνάμ (85).

5.2. V. parahaemolyticus και κλιματική αλλαγή

Σύμφωνα με σχετικά συντηρητικές εκτιμήσεις, τις επόμενες δεκαετίες, η μέση ετήσια θερμοκρασία των θαλάσσιων υδάτων στις περιοχές της Νότιας Ευρώπης και της Μαύρης Θάλασσας, θα αυξηθεί κατά 4 - 5 °C, ενώ στη Δυτική Ευρώπη κατά 2,5 - 3,5 °C [100] . Ανάλογες εκτιμήσεις, έχουν γίνει και στις Η.Π.Α., όπου, η διαρκώς αυξανόμενη καταγραφή τα τελευταία 25 χρόνια των τροφιμογενών λοιμώξεων από αλιεύματα στις Ανατολικές Ακτές, έχει συσχετιστεί, με το φαινόμενο του El Nino [123] .

Είναι γνωστό ότι, τόσο η θερμοκρασία, όσο και η αλατότητα των υδάτων, σχετίζονται με τα επίπεδα των πληθυσμών του *V. parahaemolyticus* [101].

Αναφέρεται ότι, υψηλές πυκνότητες πληθυσμών του παθογόνου, καταγράφονται σε ύδατα με θερμοκρασίες, που κυμαίνονται μεταξύ, 20 και 30 °C [102]. Επίσης, αναφέρεται η απομόνωση του *V. Parahaemolyticus,* από τα παράκτια ύδατα στις παράκτιες περιοχές του Ειρηνικού ωκεανού των Η.Π.Α., καταγράφονταν μόνο, όταν η θερμοκρασία των υδάτων ήταν μεγαλύτερη από 17 °C και η αλατότητα χαμηλότερη από 13 ppt [103].

Σε μια άλλη μελέτη, το βακτήριο καταγράφηκε σε ποσοστό 94,2%, σε στρείδια που συλλέχθηκαν σε περιοχές, με θερμοκρασία υδάτων, μεγαλύτερη από 25 °C, ενώ το αντίστοιχο ποσοστό από ύδατα, με θερμοκρασία μικρότερη των 10 °C, ήταν μόλις 14,9% [104].

Ανάλογα αποτελέσματα, αναφέρονται από άλλους ερευνητές, οι οποίοι βρήκαν ότι οι μέσοι πληθυσμοί του *V. parahaemolyticus,* ήταν 13000 CFU/ 100 g οστρακοειδών, όταν η θερμοκρασία των υδάτων, ήταν μεγαλύτερη από 20 °C (από Απρίλιο έως Δεκεμβριο). Όταν η θερμοκρασία των υδάτων, ήταν χαμηλότερη από 20°C (από Ιανουάριο έως Μάρτιο), οι μέσοι πληθυσμοί του παθογόνου, βρέθηκαν σημαντικά χαμηλότεροι [104].

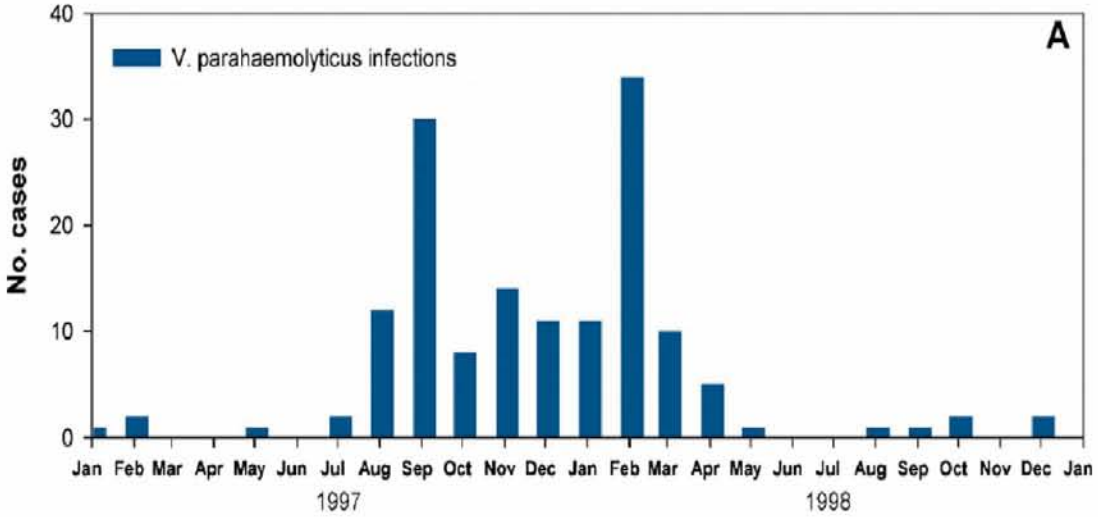
Ακόμα και μια μικρή αύξηση της θερμοκρασίας των υδάτων, κατά περίπου 5 °C, είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση των περιστατικών ανθρώπινων κρουσμάτων από παθογόνα στελέχη Vibrios [105]. Μερικές από τις μεγαλύτερες εξάρσεις του παθογόνου, έχουν συσχετιστεί με μη φυσιολογικές θερμοκρασιακές μεταβολές, κατά τις οποίες μεγάλες μάζες θερμών υδάτων, μεταφέρθηκαν εκατοντάδες ή χιλιάδες χιλιόμετρα, μακριά από τις περιοχές των εξάρσεων.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:11:01 EEST - 18.116.85.64

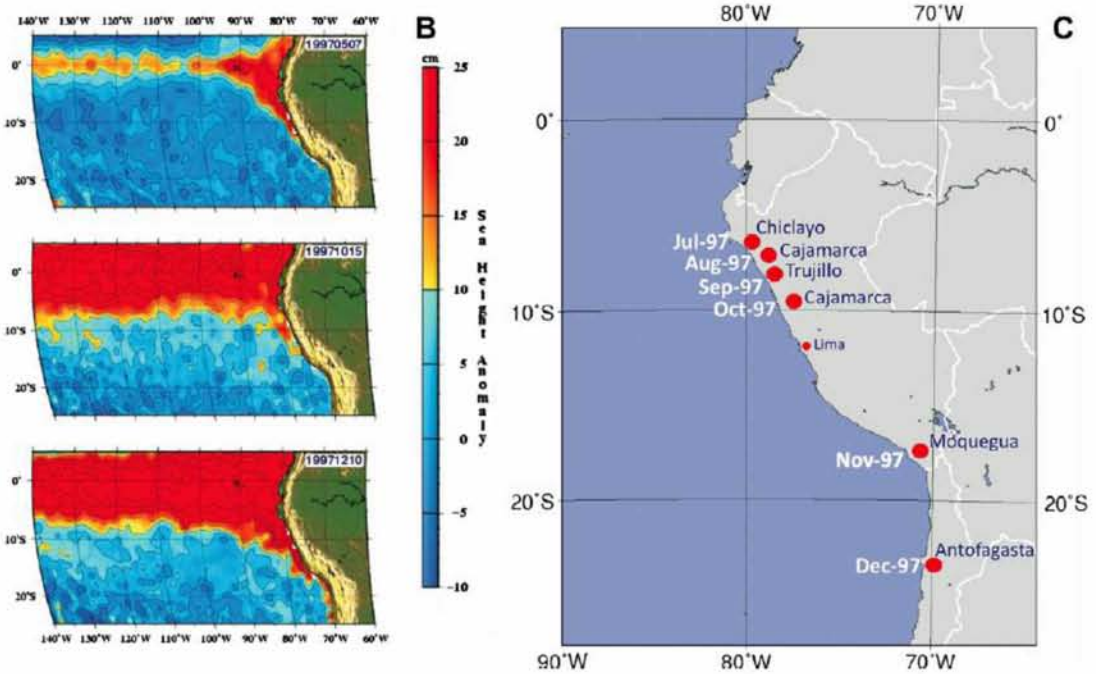
Δεδομένα από δορυφόρους, επιβεβαίωσαν την παρουσία αφύσικα υψηλών θερμοκρασιών των θαλάσσιων υδάτων, κατά την εκκίνηση των μεγάλων εξάρσεων σε Χιλή και Περού το 1997, στην Ισπανία το 1999 και στην Αλάσκα το 2004 [106, 107,108].

Μια ανασκόπηση των εξάρσεων στο Περού, έδειξε ότι τα περιστατικά καταγράφηκαν ταυτόχρονα με την εμφάνιση 2 επεισοδίων, του φαινομένου El Nino στις παράκτιες περιοχές της χώρας [108].

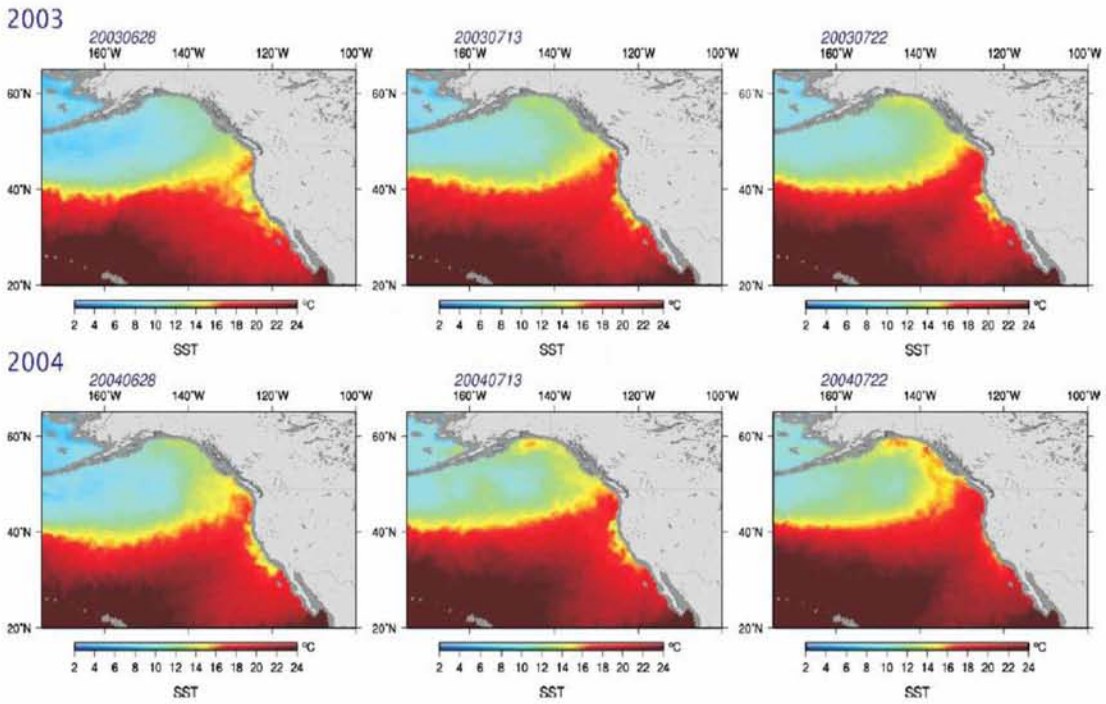
Έμμεσες επιδράσεις, που έχουν συσχετιστεί με την κλιματική αλλαγή, όπως η αύξηση της θερμοκρασίας των υδάτων, αλλά και η μείωση της αλατότητάς τους, εξαιτίας πλημμυρικών φαινομένων, έχουν συνδεθεί με την παγκόσμια εξάπλωση του *V. parahaemolyticus*. Επίσης, το παθογόνο, αναπτύσσεται κατά προτίμηση σε ύδατα, με σχετικά χαμηλή αλατότητα (< 30 ppt NaCl). Πλημμυρικά φαινόμενα, που σχετίζονται με αλλαγές στο επίπεδο της θάλασσας, κατά συνέπεια, μπορούν να μεταβάλλουν τις περιβαλλοντικές συνθήκες, δημιουργώντας ευνοϊκές συνθήκες, για την ανάπτυξη του παθογόνου [109][108].



Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:11:01 EEST - 18.116.85.64



Σχήμα 3. : Εξέλιξη της έξαρσης του *V. parahaemolyticus* στο Περού, σε συσχέτιση με την άφιξη και επέκταση, των θερμών υδάτων, λόγω του φαινομένου ElNino κατά την επιδημία –που καταγράφηκε το 1997-1998. (A) Αριθμός επίσημα καταγεγραμμένων περιστατικών, από τις κρατικές υπηρεσίες του Περού 1997-98, (B) γεωγραφική θέση των θερμών υδάτων, λόγω του φαινομένου El Nino κατά τους μήνες Μάιο, Οκτώβριο, και Δεκέμβριο του 1997, (C) ημερομηνίες καταγραφής των πρώτων περιστατικών λοιμώξεων από *V. Parahaemolyticus*, στις παράκτιες περιοχές του Περού το 1997 (Πηγή: Martinez-Urtaza et al. 2010) [106].



Σχήμα 4. : Περιστατικά λοιμώξεων από *V. parahaemolyticus* στην Αλάσκα, κατά την έξαρση του 2004 σε σχέση με την άφιξη και επέκταση θερμών υδάτων στις παράκτιες περιοχές της Αλάσκας. Παρατίθενται χάρτες, που δείχνουν την Θερμοκρασία της Επιφάνειας της Θάλασσας και τη μη φυσιολογική εξέλιξη του 2004, όταν τα θερμά αυτά ύδατα, ξεπέρασαν τον 40° παράλληλο. Αυτή η μη φυσιολογική παρατήρηση, συνέπεσε χρονικά, με την έξαρση των περιστατικών από *V. Parahaemolyticus* (από Martinez-Urtaza et al. 2010) *[106]*.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:11:01 EEST - 18.116.85.64

Κεφάλαιο 6: Επίδραση των διαφόρων μεθόδων επεξεργασίας των αλιευμάτων στην επιβίωση του V.parahaemoliticus.

Το *Vibrio parahaemolyticus,*εμφανίζεται στα ύδατα των ποταμών, σε όλο τον κόσμο και απομονώνεται εύκολα από τα παράκτια ύδατα, καθώς και από τα ιζήματα, στα οποία, τα σωματίδια και το πλαγκτόν, έχουν ανασταλεί, αλλά όχι στην ανοικτή θάλασσα. Έχει αποδειχθεί ότι το *V. parahaemolyticus,* σχετίζεται με το πεπτικό σύστημα των οστρακοειδών, όπως τα μύδια. [111]

Το *V. parahaemolyticus,* έχει περιστασιακά, απομονωθεί από περιοχές γλυκών υδάτων, αλλά μόνο σε εξαιρετικά χαμηλούς πληθυσμούς, (5 CFU /lt) και μόνο κατά τη διάρκεια των θερμότερων περιόδων του έτους. Σε μια μελέτη που εκπονήθηκε από τους Gjerde και Bøe, (1981), σε συνολικά 200 δείγματα μυδιών, από το θαλασσινό νερό, στα ιζήματα πυθμένα και στους ιχθύες που συλλέχθηκαν στα Νορβηγικά ύδατα, το παθογόνο εντοπίστηκε μόνο κατά τη διάρκεια του Ιουλίου και του Αυγούστου. Σε αυτή την έρευνα, στα μύδια,το *Vibrio parahaemolyticus,* ανιχνεύθηκε στο 10% των εξετασθέντων δειγμάτων, ενώ στα ιζήματα πυθμένα στο 4%. Για το θαλασσινό νερό, δεν βρέθηκαν θετικά δείγματα. Σε όλες τις περιπτώσεις ανίχνευσης, η θερμοκρασία του θαλασσινού νερού, ήταν 15 ºC, ή μεγαλύτερη. Κατά τη διάρκεια της ψυχρής περιόδου, δεν ήταν δυνατή η ανίχνευση του *V. parahaemolyticus*.

Το βακτήριο, απομονώθηκε από το νερό και τα αλιεύματα που συλλέχθηκαν από τον κόλπο Arcachon, που βρίσκεται στην ακτή του Ατλαντικού, στα νοτιοδυτικά της Γαλλίας [87].

Οι Macián et al. (2000), ανέφεραν μια μελέτη της ταυτότητας του *Vibrio* spp., από θαλάσσια φυσικά δείγματα, στις ακτές της Μεσογείου της Ισπανίας. Μεταξύ των 284 στελεχών που απομονώθηκαν, τα 14, (5%), προσδιορίστηκαν ως *V. parahaemolyticus*.
Σε μια διετή έρευνα που διεξήχθη στην Ιταλία, συγκεντρώθηκαν 726 στελέχη, από τα δείγματα θαλασσινού νερού και μαλακίων της Αδριατικής θάλασσας. Στελέχη του γένους *Vibrio,* απομονώθηκαν, συχνότερα από στελέχη άλλων γενών [80].

Οι περισσότερες τροφιμογενείς λοιμώξεις από *V. Parahaemolyticus,* οφείλονται σε επιμόλυνση των αλιευμάτων, μετά τη θερμική επεξεργασία. Για την καταστροφή του παθογόνου βακτηρίου, τα αλιεύματα, πρέπει να υπόκεινται σε επαρκή θερμική επεξεργασία (θερμοκρασία μεγαλύτερη από 85°C), η οποία, ακολουθείται από άμεση ψύξη.

Το *V. parahaemolyticus,* επιβιώνει στα ιζήματα κατά τη διάρκεια του χειμώνα και απελευθερώνεται στο νερό, όπου συνδέεται με το ζωοπλαγκτόν, όταν η θερμοκρασία του νερού, αυξάνεται και κυμαίνεται, μεταξύ 14-19 ºC. Αυτό το φαινόμενο, επηρεάζεται σε

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:11:01 EEST - 18.116.85.64

μεγάλο βαθμό και από την αλατότητα του νερού, αφού η προσρόφηση του βακτηρίου σε NaCl, είναι πιο αποτελεσματική σε χαμηλότερες αλατότητες [63].

Υπάρχει συσχέτιση μεταξύ της λοίμωξης από *V. parahaemolyticus* και της αυξησης της θερμοκρασίας, κατά τους καλοκαιρινούς μήνες του έτους. Αυτό παρατηρήθηκε στην Ασία και στις Ηνωμένες Πολιτείες, όπου, τα μεγαλύτερα ποσοστά απομόνωσης του παθογόνου, καταγράφονται κατά την περίοδο Ιουλίου-Οκτωβρίου [67, 112].

Το βακτήριο, επιβιώνει εντός της περιοχής τιμών pH 4,8-11 και ανέχεται μέχρι το 10% NaCI, [125] ενώ, μπορεί να μειωθεί σε χαμηλές θερμοκρασίες, αλλά να μην εξαλειφθεί. Η επιβίωση, που καθορίστηκε στους 4, 0, -18 και -24 ° C, έδειξε, ότι ο μειωμένος συνολικά πληθυσμός, εξαρτάται από τα επίπεδα των αρχικών αριθμών πληθυσμών των μικροοργανισμών και τη θερμοκρασία [88]. Έχει αναφερθεί, μία αρχικά γρήγορη μείωση των πληθυσμών του μικροοργανισμού, όταν συντηρούνται δείγματα ολόκληρων γαρίδων, ενοφθαλμισμένων με το παθογόνο στους 3, 7, 10 ή -18 ° C. Στην ίδια μελέτη, καταγράφηκε επίσης, η επιβίωση πληθυσμών του παθογόνου, μέχρι την 8^{η} ημέρα της μελέτης. Έτσι, φαίνεται, ότι ο πληθυσμός του μικροοργανισμού στο τρόφιμο, μπορεί να μειωθεί, αλλά να μην εξαλειφθεί, με τη ψύξη. Παρατηρήθηκε επίσης, ότι μπορεί να επιβιώνει σε ενοφθαλμισμένα δείγματα στρειδιών, για τουλάχιστον 3 εβδομάδες στους 4° C και ακολούθως, να πολλαπλασιάζεται μετά από επώαση, στους 35° C, για 2 έως 3 ημέρες [88].

Παρομοίως, οι πληθυσμοί του *V. parahaemolyticus,* μειώθηκαν σε σουρίμι, όταν αποθηκεύτηκαν τα δείγματα, στους 5 ° C για 48 ώρες, αλλά εμφανίστηκε ανάπτυξη τους, όταν το προϊόν, συντηρήθηκε στους 25 ° C. Ανάλογα συμπεράσματα, ανάπτυξης του *V. parahaemolyticus,* σε πολύ μεγάλους πληθυσμούς, καταγράφηκαν και σε άλλα δείγματα αλιευμάτων, όπως χταποδιού, μαγειρεμένων γαρίδων και καβουριών, όταν συντηρήθηκαν για ακόμη και σύντομες χρονικές περιόδους, κάτω από ακατάλληλη ψύξη [58].

Σε χαμηλότερες θερμοκρασίες, ο ρυθμός αύξησης των πληθυσμών του παθογόνου, είναι μικρότερος. Έτσι, σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε γαρίδες, οι πληθυσμοί του *V. parahaemolyticus,* αυξήθηκαν από 10^2 σε 10^8 CFU / g, μετά από 24 ώρες αποθήκευσης στους 25 ° C και από $5x10^3$, σε $5x10^8$ CFU / g, μετά από αποθήκευση 7 ημερών, στους 12 ° C, σε στρείδια [88].

Είναι γνωστό και ευρέως αποδεκτό, ότι τα vibrio, συμπεριλαμβανομένων και των εντεροπαθογόνων ειδών, είναι εύαισθητα στην σωστή θερμική επεξεργασία των τροφίμων. Ωστόσο, η αντίσταση στη θερμότητα, εξαρτάται από πολλούς παράγοντες [84].

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:11:01 EEST - 18.116.85.64

Σε θερμοκρασίες στην περιοχή των 15-40 ° C, η ανάπτυξη του *V. parahaemolyticus* είναι πολύ γρήγορη, με χρόνο διπλασιασμού τόσο μικρό, όσο 8-9 λεπτά σε καλλιέργεια ζωμού, υπό βέλτιστες συνθήκες (37 ° C). Ένα μαθηματικό μοντέλο, για να περιγραφεί η επίδραση της θερμοκρασίας και της aw, στο ρυθμό ανάπτυξής του σε τρόφιμα, περιγράφεται παρακάτω. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι, οι προβλέψεις μοντέλων, συμφώνησαν καλά, με τα δημοσιευμένα δεδομένα [33] και ο ρυθμός ανάπτυξης, διαμορφώθηκε, ως συνάρτηση της θερμοκρασίας και της δραστηριότητας του νερού:

$\sqrt{K} = b(T - T_{min})\{ \quad 1 - \exp[c(T - T_{max})]\} \cdot \sqrt{(a_w - {}_{aw,min})}\{1 - \exp[d(a_w - {}_{aw,max})]\}$

όπου: K = ρυθμός ανάπτυξης

$a_{w,\,min}$, $_{aw,\,max}$ = θεωρητικά όρια δραστηριότητας νερού και ορίου

T = θερμοκρασία

T_{min}, T_{max} = η κατώτερη και ανώτερη θερμοκρασία, στην οποία είναι γεμάτη η εξίσωση, ισούται με το μηδέν

b, c, d = συντελεστές, προσαρμοσμένοι με μη γραμμική παλινδρόμηση

Η παρατηρούμενη ελάχιστη θερμοκρασία, για την ανάπτυξη του *V. parahaemolyticus,* ήταν 8.3ºC, ενώ η μέγιστη θερμοκρασία για την ανάπτυξη, ήταν 45.3ºC. Το βέλτιστο ήταν, μεταξύ 37 και 39 ° C. Τα στελέχη, αναπτύχθηκαν σε μια περιοχή δραστηριότητας νερού, από 0,936 έως 0,995, (9,6-0,4% NaCl) με βέλτιστο, μεταξύ 0,982-0,987. Ο τύπος ισχυρίζεται, ότι διατηρεί το εύρος του pH, μεταξύ 6,5-8,9.

Με βάση τις διαθέσιμες πληροφορίες, ο κίνδυνος εμφάνισης εξάρσεων τροφιμογενούς λοίμωξης από *V. Parahaemolyticus,* φαίνεται να είναι χαμηλός, στην Ε.Ε. Ο κίνδυνος μόλυνσης, σχετίζεται έντονα, με: (i) κατανάλωση ακατέργαστων, μη ορθά θερμικά επεξεργασμένων αλιευμάτων και (ii) επαγγελματική ή ψυχαγωγική χρήση φυσικών υδάτινων περιβαλλόντων.

Δεδομένου ότι οι παράγοντες αυτοί, αυξάνονται σαφώς τα τελευταία χρόνια, ο κίνδυνος μόλυνσης, θεωρείται ότι θα αυξηθεί στο μέλλον.Ένας αυστηρός ποσοτικός προσδιορισμός κινδύνου εξαιτίας της κατανάλωσης αλιευμάτων, θα απαιτούσε πληροφορίες σχετικά με:

α) Τα πρότυπα κατανάλωσης αλιευμάτων στην Ε.Ε., συμπεριλαμβανομένης μιας εκτίμησης για τον τρόπο, που πολλά έχουν συγκομισθεί σε τοπικό επίπεδο και πόσα έχουν εισαχθεί από υψηλά ενδημικές περιοχές, καθώς και των σχετικών ποσοτήτων που καταναλώνονται ακατέργαστα, ή/και μαγειρεμένα.

β) Ποσοτικά στοιχεία σχετικά με την εμφάνιση θετικών TDH- και TRH *V. parahaemolyticus,* στα αλιεύματα που συγκομίζονται στο εσωτερικό και εισάγονται στην Ε.Ε.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:11:01 EEST - 18.116.85.64

γ) Τη μολυσματική δόση του οργανισμού.

Η έλλειψη τέτοιων στοιχείων, σχετικά με την κατανάλωση αλιευμάτων στην ΕΕ, η ευρεία χρήση των δοκιμών παρουσίας / απουσίας, χωρίς απαρίθμηση, ή χαρακτηρισμό του λοιμογόνου χαρακτήρα του παθογόνου, σε μελέτες σχετικές με την εμφάνιση των οργανισμών σε αλιεύματα, μαζί με την απουσία συναίνεσης της επιστημονικής κοινότητας, όσον αφορά τη μολυσματική δόση, καθιστά αδύνατο, να καθοριστεί μια αριθμητική εκτίμηση του κινδύνου [76].

Ο προσδιορισμός της παθογένειας με βάση την ανίχνευση του Kanagawa, περιγράφεται σαν διαδικασία, από το FDA. Το 1968, ο Wagatsuma, πρότεινε ένα ειδικό άγαρ αίματος υψηλής περιεκτικότητας σε αλάτι, για την ανίχνευση της αιμολυτικής δραστικότητας του *V. parahaemolyticus*. Η μελέτη, αναπτύχθηκε στο Δημόσιο Νοσοκομείο Υγείας της περιοχής Kanagawa και η αιμόλυση των ανθρώπινων ερυθρών αιμοσφαιρίων, ερμηνεύτηκε ως θετικό ή Kanagawa θετικό φαινόμενο (KP-θετικό). Η αντίδραση, προκλήθηκε από μια τοξίνη, την άμεση αιμολυσίνη, με μοριακό βάρος περίπου 42.000 και ονομάστηκε, ως TDH (θερμοανθεκτική άμεση αιμολυσίνη) ή αιμολυσίνη Kanagawa. Αυτή η πρωτεΐνη, κωδικοποιείται από το WGK γονίδιο και μόνο μερικώς, αδρανοποιείται στους 100 ° C για 30 λεπτά, σε pH 6,0. Η πρωτεΐνη, είναι θανατηφόρα για τα ποντίκια, λύει τα ερυθροκύτταρα από μεγάλη ποικιλία ζώων, (αλλά όχι από άλογο) και η δράση της, εξαρτάται από τη θερμοκρασία [89]. Επιπλέον, οι Nishibuchi et al. (1989), διαπίστωσαν, ότι κατά τη διάρκεια μιας εκδήλωσης γαστρεντερίτιδας, KP-αρνητικά στελέχη, παρήγαγαν την αιμολυσίνη TRH, που κωδικοποιείται από το γονίδιο WUK. Αυτό το γονίδιο, μοιράζεται σημαντική νουκλεοτιδική ομολογία με το WGK. Βιολογικά, ανοσολογικά και φυσικοχημικά, οι ιδιότητες είναι παρόμοιες με εκείνες του TDH, αλλά όχι ταυτόσημες. Ετσι, το TRH, θα μπορούσε να αποτελέσει, σημαντικό λοιμογόνο παράγοντα και πιθανώς την αιτία διάρροιας, σε ασθενείς, από τους οποίους απομονώθηκαν μόνο αρνητικοί KP *V. Parahaemolyticus* μικροοργανισμοί.

Έχουν εφαρμοστεί, ευαίσθητες και ταχείες μοριακές μέθοδοι, χρησιμοποιώντας την PCR για τον εντοπισμό της παρουσίας των WGK και WUK γονιδίων. Ένας προσδιορισμός συνδεδεμένος με ενζυμική σύνδεση (ELISA), αναπτύχθηκε για την ανίχνευση του TDH με ευαισθησία <10 ng / ml. Στην Ιαπωνία, διατίθενται στο εμπόριο τέτοια κιτ ELISA και έχει αποδειχθεί, ότι αντιδρούν με την TRH, με ευαισθησία περίπου 10 ng / ml. Ωστόσο, παρατηρήθηκαν αποκλίσεις, μεταξύ της αντίδρασης Kanagawa, συμπεριλαμβανομένης της αναγνώρισης του γονιδίου WGK, με την τεχνική μοριακής ανίχνευσης και της αντίδρασης, σε εμπορική δοκιμασία (RPLA), με την τελευταία, να αποδίδει θετικά αποτελέσματα, σε μόνο στο 62,1% των KP θετικών απομονώσεων. Φαίνεται, ότι ο προσδιορισμός των γονιδίων

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:11:01 EEST - 18.116.85.64

WGK και / ή WUK με μοριακές μεθόδους, συσχετίζεται, με τη παθογένεια του βακτηρίου [36, 71, 73].

Τόσο η εμφάνιση του *V. parahaemolyticus* στις εκβολές ποταμών / θαλάσσιων στο περιβάλλον, όσο και η εμφάνιση ασθενειών, συνδέονται με το καλοκαίρι [5]. Ο έλεγχος με απαγόρευση της συγκομιδής οστρακοειδών, από περιοχές που έχουν συσχετιστεί με κρούσματα της ασθένειας, εάν η θερμοκρασία του θαλασσινού νερού ξεπεράσει ένα συγκεκριμένο εύρος, αποτελεί ένα αποτελεσματικό μέτρο, που έχει εφαρμοστεί. Η εκτεταμένη εμφάνιση των Kp αρνητικών στελεχών *V. Parahaemolyticus,* σε τροπικά, υποτροπικά και εύκρατα παράκτια ύδατα, προκαλεί δυσκολίες στους ελέγχους, που στηρίζονται μόνο στην εύρεση της παρουσίας, ακόμη και σε υψηλά επίπεδα πληθυσμών του μικροοργανισμού, στο περιβάλλον. Αυτή η κατάσταση, μπορεί να αλλάξει, με την περαιτέρω ανάπτυξη μεθόδων για την άμεση ανίχνευση και απαρίθμηση των TDH- και / ή TRH-θετικών παθογόνων, σε θαλασσινά και περιβαλλοντικά δείγματα.

Τα επίπεδα των παθογόνων βακτηρίων, φαίνεται, να αυξάνονται στα στρείδια μετά τη συγκομιδή τους, με τις αυξήσεις, να εξαρτώνται από τη θερμοκρασία. Τα *V. parahaemolyticus* και *V. Vulnificus,* δεν πολλαπλασιάστηκαν στα στρείδια που συντηρήθηκαν στους 10ºC. Τα επίπεδα των πληθυσμών όμως, του *V. Parahaemolyticus,* σε στρείδια, που συντηρήθηκαν πάνω από 10ºC, συχνά, προσέγγιζαν το μολυσματικό επίπεδο πληθυσμών, για KP-θετικά στελέχη των 10^5 έως 10^7CFU [113]. Ωστόσο, στα περισσότερα περιβαλλοντικά στελέχη του *V. Parahaemolyticus,* είναι KP- και ο πολλαπλασιασμός στα στρείδια, δεν υποδηλώνει απαραίτητα, κίνδυνο για την ανθρώπινη υγεία. Η μεταφορά των συλλεγέντων οστρακοειδών και αλιευτικών προϊόντων, θα πρέπει να διεξάγεται υπό συνθήκες ψύξης. Η ταχεία ψύξη, μετά τη συγκομιδή και η αποτελεσματική μετέπειτα θερμοκρασία, είναι πιθανό, να μειώσει τη συχνότητα εμφάνισης της νόσου στον άνθρωπο, τουλάχιστον στις υψηλά ενδημικές περιοχές [63].

Οι Son και ο Fleet (1980), διαπίστωσαν ότι ο αριθμός των *V. Parahaemolyticus,* μειώθηκε από 18 CFU / g, σε 5 CFU / g, σε διάστημα 2 ημέρων και παρέμεινε στα 5 CFU / g, για 6 ημέρες, σε στρείδια, κατά την απομάκρυνση, τη μετεγκατάσταση, και αποθήκευση.

Η επίδραση της θερμοκρασίας, κατά τη διαδικασία καθαρισμού σε στρείδια (*Crassostrea commersialis*), αξιολογήθηκε για την*Escherichia coli* και το *V. parahaemolyticus*. Η μελέτη, κατέληξε στο συμπέρασμα, ότι η *E.coli,* απομακρύνεται ταχέως, στους 8, 15 και 25 ° C, σε ένα σύστημα ανακύκλωσης, αλλά όχι το ίδιο, για το *V. parahaemolyticus*. Η πιο γρήγορη απομάκρυνση του *Vibrio,* ήταν στους 15 ° C και στους 8, ή 25 ° C και ήταν περίπου 1 log, μετά από 72 ώρες. Η επιμονή του *Vibrio,* μπορεί να ήταν αποτέλεσμα στενότερης

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:11:01 EEST - 18.116.85.64

συσχέτισης, μεταξύ των βακτηριακών κυττάρων και των εντερικών κυττάρων του ξενιστή [88].

Οι συνθήκες θερμικής επεξεργασίας που καθορίζονται για το *V.vulnificus,* μειώνουν και τη συγκέντρωση του *V. Parahaemolyticus,* σε ακατέργαστα οστρακόδερμα. Η μεταποίηση, ο χειρισμός και η μεταγενέστερη μεταφορά, θα πρέπει να διενεργούνται, σύμφωνα με τις συνθήκες, που εμποδίζουν την εκ νέου μόλυνση και ανάπτυξη των παθογόνων [114, 115]. Η θέρμανση των κυττάρων *V. Parahaemolyticus,* στους 60 °, 80 °, ή 100 ° C για 1 λεπτό, είναι θανατηφόρα, σε ένα μικρό πληθυσμό ($5x10^2$ CFU / ml), αφού, μερικά κύτταρα επιβιώνουν με θέρμανση στους 60 ° C και ακόμη και στους 80 ° C για 15 λεπτά [12].

Κεφάλαιο 7: Σχετική Νομοθεσία.

Η χρήση θαλασσινού νερού που περιέχει παθογόνους μικροοργανισμούς, σε άμεση επαφή με τα αλιεύματα, ενέχει κίνδυνο επιμόλυνσης του προϊόντος.Πρέπει να δίνεται ιδιαίτερη προσοχή, στην άντληση θαλασσινού νερού, που χρησιμοποιείται σε χερσαίες εγκαταστάσεις, από παράκτιες πηγές. Τέτοια σημεία, είναι δυνατό να είναι επιμολυσμένα, από παθογόνους παράγοντες, όπως το *V. Parahaemolyticus* [45].

Η χρήση των υγειονομικών εξετάσεων, για τον έλεγχο της περιττωματικής ρύπανσης στα ύδατα καλλιέργειας οστρακοειδών, αναθεωρήθηκε πρόσφατα από την ομάδα εμπειρογνωμόνων της EFSA για τους βιολογικούς κινδύνους, (BIOHAZ, 2011) και η διαδικασία αυτή, είναι ισοδύναμη, με εκείνη της αξιολόγησης για τον προσδιορισμό της ποιότητας του πόσιμου νερού, που χρησιμοποιείται στην κατανάλωση, ως μέρος του WSP και περιγράφεται στις κατευθυντήριες γραμμές, για την ποιότητα του πόσιμου νερού (WHO, 2011)[126].

Τα νομοθετικά πρότυπα, καθορίζουν την παραγωγή οστρακοειδών στην ΕΕ και στις τρίτες χώρες, που εισάγουν στην ΕΕ. Οι αρμόδιες αρχές των κρατών μελών της ΕΕ, υποχρεούνται να ορίζουν την τοποθεσία και τα όρια των περιοχών παραγωγής (και μετεγκατάστασης) και να ταξινομούν τις περιοχές, σύμφωνα με τρείς κατηγορίες. Απαιτείται επιπλέον, να καταρτίσουν ένα πρόγραμμα δειγματοληψίας (παρακολούθησης), το οποίο, θα πρέπει να είναι αντιπροσωπευτικό, ώστε, να εξασφαλιστεί ότι, τα δίθυρα μαλάκια που συγκομίζονται από την περιοχή, συμμορφώνονται με την καθιερωμένη ταξινόμηση. Εάν δεν συμμορφώνονται με τα κριτήρια, η αρμόδια αρχή, πρέπει να κλείσει ή να επαναταξινομήσει την περιοχή. Ένα ουσιαστικό πρώτο βήμα, πριν από τη θέσπιση ενός προγράμματος δειγματοληψίας, είναι, η πραγματοποίηση υγειονομικής έρευνας στην περιοχή παραγωγής, έτσι ώστε, τα σημεία δειγματοληψίας, να μπορούν να καθοριστούν ως αντιπροσωπευτικά,

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:11:01 EEST - 18.116.85.64

σύμφωνα με τις επιστημονικές αρχές. Αυτή η υγειονομική έρευνα, αποτελεί απαίτηση, τόσο των κανονισμών US17, όσο και των κανονισμών της ΕΕ. Ωστόσο, στην ΕΕ, αυτό ισχύει μόνο για περιοχές που έχουν ταξινομηθεί μετά το 2006 και επομένως τα προγράμματα παρακολούθησης, για την πλειοψηφία των περιοχών παραγωγής στην ΕΕ, που δημιουργήθηκαν πριν από το 2006, είναι με βάση τις υγειονομικές έρευνες. Η νομοθεσία της ΕΕ, δεν περιέχει λεπτομερείς κανόνες για την εφαρμογή προγραμμάτων παρακολούθησης, για παράδειγμα, δεν προσδιορίζονται βασικές πτυχές, όπως η απαιτούμενη συχνότητα παρακολούθησης [72].

Μια ομάδα εργασίας της ΕΕ, έχει καταρτίσει λεπτομερείς οδηγίες βέλτιστης πρακτικής. Ωστόσο, η τήρηση των κανόνων αυτών, δεν είναι επί του παρόντος υποχρεωτική. Για παράδειγμα, η μελλοντική νομοθεσία, ενδέχεται να απαιτεί υποχρεωτική ζώνη απαγόρευσης της συγκομιδής γύρω από όλες τις πηγές ανθρώπινης απόρριψης, (θα μπορούσε να καθοριστεί ένα ελάχιστο κριτήριο απόστασης ή αραίωσης). Τέτοια μέτρα, έχουν ήδη ενσωματωθεί στη νομοθεσία περί υγιεινής των δίθυρων μαλακίων, σε χώρες εκτός της Ε.Ε. Επομένως, αυτό θα μπορούσε να εφαρμοστεί, μόνο εάν είχε πραγματοποιηθεί υγειονομική έρευνα στην περιοχή παραγωγής, και επομένως, οι πηγές ρύπανσης, να είναι τεκμηριωμένες. Το μέτρο αυτό, θα απαιτούσε την πραγματοποίηση υγειονομικών ερευνών, για όλες τις περιοχές παραγωγής, ως πρώτο βήμα. Οι υγειονομικές έρευνες, παρέχουν επίσης τα βασικά δεδομένα, σχετικά με τις επιπτώσεις της ρύπανσης που απαιτούνται, για να εξεταστεί η προληπτική διαχείριση των ζωνών παραγωγής [90].

Παρόλο που, οι υγειονομικές έρευνες παρέχουν πληροφορίες, σχετικά με τις βέλτιστες τοποθεσίες αφαίρεσης, για τον έλεγχο των πηγών μόλυνσης των κοπράνων, θα χρειαστούν πρόσθετες εκτιμήσεις, για τη μείωση της μόλυνσης από την ενδογενή θαλάσσια χλωρίδα (συμπεριλαμβανομένων των παθογόνων *Vibrio* spp. και *Clostridium botulinum*). Δεδομένου ότι οι κίνδυνοι αυτοί, σχετίζονται με την θερμοκρασία και την αλατότητα (Vibrio spp.), καθώς και τα ιζήματα (*C. botulinum*), η άντληση θαλασσινού νερού, με υψηλή αλατότητα και χωρίς σωματίδια, ειδικά σε νερά θερμοκρασιών κάτω των 20 ºC, είναι απαγορευτική. Η επιλογή, για την αντιμετώπιση των κινδύνων στο καθαρό θαλασσινό νερό, περιλαμβάνει συνδυασμό υγειονομικών ερευνών, με μικροβιολογικά πρότυπα και κατάλληλη επεξεργασία νερού. Η ισχύς αυτής της προσέγγισης, είναι ότι, η αποτυχία ενός φραγμού, μπορεί να αντισταθμιστεί με την αποτελεσματική λειτουργία των εναπομενόντων φραγμών, ελαχιστοποιώντας έτσι, την πιθανότητα κινδύνου να διέρχεται από όλο το σύστημα και να υπάρχει στο τελικό επεξεργασμένο νερό. Οι επιλογές θεραπείας, θα πρέπει να σχεδιάζονται κατά περίπτωση και να λαμβάνονται υπόψη, τόσο οι κίνδυνοι από τη μόλυνση των κοπράνων, όσο και οι κίνδυνοι από την ενδογενή θαλάσσια χλωρίδα [90].

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:11:01 EEST - 18.116.85.64

Ο έλεγχος αυτών των κινδύνων, απαιτεί ένα στάδιο επικύρωσης, για να αποδειχθεί ότι οι διαδικασίες επεξεργασίας, μπορούν να επιτεύχθουν, τα απαιτούμενα επίπεδα μείωσης, ενός ευρέος φάσματος κινδύνων. Αυτή η επικύρωση, θα πρέπει να καθοριστεί κατά περίπτωση, για τις διάφορες εφαρμογές που εξετάζονται. Η επικύρωση, θα πρέπει να πραγματοποιείται κατά τη διάρκεια πιλοτικών μελετών, ή κατά τη διάρκεια της αρχικής εφαρμογής του συστήματος επεξεργασίας νερού. Πρέπει να παρέχει, τη διασφάλιση επαρκούς μείωσης των κινδύνων από τη μόλυνση των κοπράνων, καθώς και εκείνων, που προέρχονται από την ενδογενή θαλάσσια χλωρίδα, αλλά δεν χρησιμοποιείται, για καθημερινή επιχειρησιακή παρακολούθηση [83].

Οι συμβουλές της WHO (2011), για την ποιότητα των υδάτων, ισχύουν εξίσου για το θαλασσινό νερό, που χρησιμοποιείται σε περιβάλλον παραγωγής χερσαίων τροφίμων, όπως περιγράφεται παραπάνω. Ανάλογα με τα θέματα, σχετικά με την πολυπλοκότητα, την ευαισθησία της ανίχνευσης, το κόστος και την επικαιρότητα της απόκτησης αποτελεσμάτων, οι δοκιμές για συγκεκριμένα παθογόνα, περιορίζονται γενικά, στην αξιολόγηση της ποιότητας των ακατέργαστων υδάτων, ως βάση για τον προσδιορισμό στόχων επιδόσεων και επικύρωσης, ή άλλη διαδικασία, αποτελεσματική στην απομάκρυνση των οργανισμών-στόχων [90].

Επιπλέον, η Παγκόσμια Οργάνωση Υγείας κατέληξε στο συμπέρασμα ότι:

- Η ασφάλεια του νερού είναι εξασφαλισμένη, με εφαρμογή ενός πακέτου μέτρων (WSP), το οποίο περιλαμβάνει, την παρακολούθηση της αποτελεσματικότητας των μέτρων ελέγχου, χρησιμοποιώντας κατάλληλα επιλεγμένους καθοριστικούς παράγοντες. Εκτός από αυτήν την επιχειρησιακή παρακολούθηση, απαιτείται τελική επαλήθευση της ποιότητας. Η επαλήθευση, είναι η χρήση μεθόδων, διαδικασιών ή δοκιμών, επιπρόσθετων εκείνων που χρησιμοποιούνται στην επιχειρησιακή παρακολούθηση, για να προσδιοριστεί κατά πόσον, η απόδοση της παροχής πόσιμου νερού, είναι σύμφωνη με τους αναφερόμενους στόχους, που ορίζονται, από τους στόχους που βασίζονται στην υγεία και αν το WSP, χρειάζεται τροποποίηση, ή επανεπικύρωση. Η επιχειρησιακή παρακολούθηση των μέτρων ελέγχου που εφαρμόζονται στα θαλάσσια ύδατα, εξαρτάται από, την εφαρμοζόμενη επεξεργασία και οι μικροβιακές παράμετροι, είναι πιθανόν να είναι ακατάλληλες για το σκοπό αυτό. Τέτοιες παράμετροι, μπορεί να περιλαμβάνουν, συγκέντρωση απολυμαντικού και χρόνο επαφής, ένταση υπεριώδους ακτινοβολίας, pH, απορροφητικότητα φωτός, ακεραιότητα μεμβράνης, θολότητα και χρώμα κλπ. Ωστόσο, για επικύρωση, οι παράμετροι που επιλέγονται, αντικατοπτρίζουν τους μικροοργανισμούς, στους οποίους στοχεύουν. Συνεπώς, ανάλογα με την επεξεργασία που εφαρμόζεται στο θαλασσινό νερό, οι παράμετροι για τα κριτήρια υγιεινής, που βασίζονται σε μικροβιολογικούς δείκτες που χρησιμοποιούνται για το πόσιμο

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:11:01 EEST - 18.116.85.64

νερό, μπορούν να παρέχουν παρόμοιο επίπεδο προστασίας της υγείας. Εάν όμως οι υγειονομικές έρευνες, είναι αποτελεσματικές για την εξαίρεση των μολυσματικών περιττωμάτων, η ανίχνευση πρόσθετων δεικτών βασισμένων στη θαλάσσια μικροβιοτική, μπορεί να είναι απαραίτητη, για τα κριτήρια υγιεινής, δεδομένου ότι, η *E.coli* και οι *Enterococci,* δεν θα υπάρχουν στο νερό. Ως εκ τούτου, προτείνεται να συμπεριληφθούν πρόσθετα κριτήρια υγιεινής, βασισμένα στην ανίχνευση, όλων των ειδών *Vibrio*, δεδομένου ότι, είναι πιθανότερο να υπάρχουν σε όλα τα θαλάσσια ύδατα και μπορούν να λειτουργήσουν ως δείκτης, για την απομάκρυνση των παθογόνων *Vibrio* spp. και έτσι παρέχουν έναν στόχο, για την επεξεργασία του νερού.

Όσον αφορά τα σχέδια διαχείρισης, αυτά, περιγράφουν τα μέτρα που πρέπει να ληφθούν για τη διατήρηση της βέλτιστης λειτουργίας, υπό κανονικές συνθήκες λειτουργίας. Πρέπει να τεκμηριώνονται όλες οι δραστηριότητες, συμπεριλαμβανομένων των τυποποιημένων διαδικασιών λειτουργίας που εφαρμόζονται κατά τις συνήθεις συνθήκες και των προγραμματισμένων απαντήσεων, σε συμβάντα και καταστάσεις έκτακτης ανάγκης. Τα κρίσιμα όρια, θα πρέπει να καθοριστούν κατά περίπτωση, ως αποτέλεσμα των επικυρωμένων και πιλοτικών μελετών και όπως προαναφέρθηκαν, αποτελούν, συνήθεις πρακτικές στον τομέα της ύδρευσης.

Παρόλο που, η παρακολούθηση, δεν θα πρέπει να είναι τόσο εκτεταμένη, όσο για την παροχή πόσιμου νερού, εξακολουθεί να υπάρχει ανάγκη εποπτείας της δημόσιας υγείας και διαδικασιών έγκρισης, σχεδίων ασφάλειας των υδάτων. Η έγκριση αυτή, θα περιλαμβάνει κατά κανόνα την αναθεώρηση της αξιολόγησης του συστήματος, τον εντοπισμό κατάλληλων μέτρων ελέγχου και προγραμμάτων στήριξης και τα επιχειρησιακά σχέδια παρακολούθησης και διαχείρισης. Θα πρέπει να διασφαλίζει ότι το WSP, καλύπτει τις κανονικές συνθήκες λειτουργίας και τα προβλέψιμα περιστατικά (αποκλίσεις) και έχει σχέδια έκτακτης αντιμετώπισης, σε περίπτωση έκτακτης ανάγκης ή απρογραμμάτιστων συμβάντων. Η διαδικασία επιτήρησης και επαλήθευσης, θα έχει κοινά χαρακτηριστικά, με εκείνη που διέπει την παραγωγή οστρακοειδών.

Σύμφωνα με την νομοθεσία, (Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 2073/2005 και την τροποποίηση του, Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 1441/2007) μεταξύ των μικροβιολογικών κριτηρίων για τα τρόφιμα, δεν προβλέπεται ο έλεγχος των αλιευμάτων για *Vibrio parahaemolyticus.* Η αυξανόμενη παρουσία του παθογόνου στην Ευρώπη, παρουσιάζει ιδιαίτερη σημασία για τη Δημόσια Υγεία και υπογραμμίζει, την ανάγκη ένταξης του *V. Parahaemolyticus,* στα προγράμματα επιτήρησης και ελέγχου.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:11:01 EEST - 18.116.85.64

Συμπεράσματα

Οι ανησυχίες, σχετικά με τις συνέπειες για την ανθρώπινη υγεία από τα είδη Vibrio, ιδίως όταν τα θαλασσινά, χρησιμεύουν ως όχημα μεταφοράς για τον παθογόνο μικροοργανισμό Vibrio, είναι πιθανό να συνεχιστούν στο μέλλον.

Κατά την τελευταία δεκαετία, τουλάχιστον ένα νέο είδος Vibrio έχει επανεμφανιστεί ανά έτος, το οποίο, μπορεί να μεταδοθεί μέσω του περιβάλλοντος, ως νέα απειλή για τη δημόσια υγεία. Αυτό οφείλεται, σε διάφορους παράγοντες, όπως: i) η πρόοδος στη μοριακή βιολογία, η οποία επιτρέπει την ταυτοποίηση νέων στελεχών και εντοπίζει την πηγή τους, ii) η εξέλιξη των παθογόνων οργανισμών και (iii) η εφαρμογή της αξιολόγησης του μικροβιακού κινδύνου για τον ποσοτικό προσδιορισμό των κινδύνων, από περιβαλλοντικά μεταδιδόμενα παθογόνα. Ως εκ τούτου, για τη θέσπιση αποτελεσματικών μέτρων ελέγχου για τη μείωση της λοίμωξης από τον κίνδυνο αυτού του βακτηριδίου και τη διασφάλιση της ασφάλειας των τροφίμων, απαιτείται, επιτήρηση και επιδημιολογική μελέτη, καθώς και χρήση των μοριακών μεθόδων, για την ανίχνευση του *V. parahaemolyticus* στα τρόφιμα και το περιβάλλον.

Σύμφωνα με την νομοθεσία (Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 2073/2005 και την τροποποίηση του, Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 1441/2007), μεταξύ των μικροβιολογικών κριτηρίων για τα τρόφιμα, δεν προβλέπεται ο έλεγχος των αλιευμάτων για *Vibrio parahaemolyticus.* Η αυξανόμενη παρουσία του παθογόνου στην Ευρώπη, παρουσιάζει ιδιαίτερη σημασία για τη Δημόσια Υγεία και υπογραμμίζει την ανάγκη ένταξης του *V. Parahaemolyticus,* στα προγράμματα επιτήρησης και ελέγχου.

Το γεγονός αυτό, ενισχύεται από την πρόβλεψη, με σχετικά συντηρητικές εκτιμήσεις, ότι τις επόμενες δεκαετίες, η μέση ετήσια θερμοκρασία των θαλάσσιων υδάτων, θα αυξηθεί κατά 4 - 5 °C στις περιοχές της Νότιας Ευρώπης και της Μαύρης Θάλασσας, ενώ στη Δυτική Ευρώπη κατά 2,5 - 3,5 °C (European Commission 2007).

Ανάλογες παρατηρήσεις έχουν γίνει στις Η.Π.Α., όπου το φαινόμενο του El Nino συσχετίζεται με την διαρκώς αυξανόμενη καταγραφή τα τελευταία 25 χρόνια των τροφιμογενών λοιμώξεων από αλιεύματα στις Ανατολικές Ακτές [110].

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:11:01 EEST - 18.116.85.64

Βιβλιογραφία

1.Ceccarelli D, Hasan NA, Hug A, Colwell RR. *Distribution, and dynamics of epidemic, and pandemic Vibrio (parahaemolyticus) virulence factors*. Front. Cell. Infect. Microbiol. 2013;3:97.

2.Gode-Potrat CJ, Kustusch RJ, Breheny PJ, Weiss DS, and McCarter LL. *Surface sensing in Vibrio parahaemolyticus triggers a programme of gene expression that promotes colonization and virulence*. Mol. Microbiol. 2011;79:240–263.

3.Nair GB, Ramamurthy T, Bhattacharya S, Dutta B, Takcda Y and Sack DA. *Global dissemination of Vibrio parahaemoiyücus serotype 03:K6 and its serovarianls.* J Clin Microbiol Rev. 2007;20:39-48.

4.Newton A, Kendall M, Vugia DJ, Henao OL, and Mahon BE. *Increasing rates of vibriosis in the United States, 1996–2010*: review of surveillance data from 2 systems. Clin. Infect. Dis. 2012; 54:S391–S395.

5.Zarei M, Borujeni MP, Jamnejad A, and Khezrzadeh M. *Seasonal prevalence of Vibrio species in retail shrimps with an emphasis on Vibrio parahaemolyticus*. Food Control 2012;25:107–109.

6.Zhang L, and Orth K. *Virulence determinants for Vibrio parahaemolyticus infection*. Curr.Opin.Microbiol. 2013;16:70–77.

7. Κοτζεκίδου – Ρουκά Π, "*Μικροβιολογία τροφίμων*" Γιαχούδη – Γιαπούλη. Θεσσαλονίκη. 2009.

8.Mc Laughlin JB, DePaola A, Bopp CA, Martinek KA, Napolilli NP, Allison CG, Murray SL, Thompson EC, Bird MM, Middaugh JP. *Outbreak of Vibrio parahaemolyticus gastroenteritis associated with Alaskan oysters.* New England Journal of Medicine. 2005;353(14):1463-1470.

9. Su CY, and Liu C. *Vibrio parahaemolyticus: a concern of seafood safety*. Res. Microbiol. Elsevier. 2007;24:549–558.

10. Yang ZQ, Jiao XA, Zhou XH, Cao GX, Fang WM, Cm RX. *Isolation and molecular characterization of Vibrio parahaemolyiicus from fresh, low-temperature preserved, dried, and salted seafood products in two coastal areas of eastern China*. IntJFoodMicrobiol. 2008;125:279-285.

11. Παπαντωνίου Δ. *"ΜικροβιολογίαΤροφίμων"*. ΑΤΕΙΘεσσαλονίκης. Θεσσαλονίκη. 2011.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:11:01 EEST - 18.116.85.64

12. Vanderzant C, and Nickelson R. *Survival of Vibrio para· haemo{vticus in shrimp tissue under various environmental conditions*. Appl. Microbiol. 1972;23:34-37.

13. Jackson H. *Temperature relationships of Vibrio parahaemolyticus.* 1974;139-145. InT. Fujino, G. Sakaguchi, R. Sakazaki, andY. Takeda (ed.), International symposium on Vibrio parahaemolyticus. Saikon Pub!.co., Ltd. Tokyo.

14. Beuchat LR. *Interacting effects of pH, temperature, and salt concentration on growth and survival of Vibrio parahaemolyticus*.Appl. Microbial. 1973;25:844-846.

15. Thomson, W. K., and C. L. Thacker. 1973. *Effect of temperature on Vibrio parahaemolyticus in oysters at refrigerator and deep freeze tempeatures*. Can. Inst. Food Sci. Techno!. J. 6:156-158.

16. Sakazaki, R. *Control of contamination with Vibrio parahaemolyticus in seafoods and isolation and identification of the vibrio*. 1973;375-385. /n B. C. Hobbs and J. H. B. Christian (ed.), The microbiological safety of foods. Academic Press Inc., London.

17. Liston, J. Influence of U.S. seafood handling procedures on Vibrio parahaemolyticus. 1974;123-128. InT. Fujino, G. Sakaguchi, R. Sakazaki, and Y. Takeda (ed.), *International symposium on Vibrio parahaemolyticus.* Saikon Pub!. Co., Ltd. Tokyo

18. Johnson HC, and Liston J. *Sensitivity of Vibrio parahaemolyticus to cold oysters, fish fillets and crabmeat*. J. Food Sci. 1973;38:437-441.

19. Johnson WG, Salinger AC, and King WC.*Survival of Vibrio parahaemolyticus in oyster shellstock at two different storage temperatures.*Appl. Microbial. 1973;26:122-123.

20. Molenda JR, Johnson WG, Fishbein M, Wentz B, Mehlman IJ, and Dadisman TA. *Vibrio parahaemolyticus gastroenteritis in Maryland*: Laboratory aspects. Appl. Micro bioi. 1972;24: 444-448.

21. Kaneko T, and Colwell RR.*Ecology of Vibrio parahaemolyticus in Chesapeake Bay*. J. Bacterial. 1973;113:24-32

22. Nickelson R, and Vanderzant C. *Vibrio parahaemo{vticusA review*. J. Milk Food Techno. 1971;34:447-452.

23. Zen-Yoji H, Hitokoto H, Morozumi S, and LeClair RA. *Purification and characterization of a hemolysin produced by Vibrio parahaemolyticus*. J. Infect. Dis. 1971;123:665-667.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:11:01 EEST - 18.116.85.64

24. Lee JS. *What seafood processors should know about Vibrio parahaemolyticus*. J. Milk Food Techno. 1973;36:405-408.

25. Beuchat LR. *Combined effects of water activity, solute, and temperature on the growth of Vibrio parahaemolyticus*.Appl. Microbial. 1974;27:1075-1080.

26. Kaysner CA and DePaola A. Vibrio. In: *Bacteriological Analytical Manual. 8th Ed., U.S,* Food and Drug Administration, Arlington, Chapter 9;2004.

27. Gonzalez-Escalona N, Martinez-Urtaza J, Romero J, Espejo RT, Jaykus LA, DePaola A. *Determination of molecular phylogenetics of Vibrio parahaemolyticus strains by multilocus sequence typing*. J Bacteriol. 2008;190(8):2831–40.

28. Vanderzant, C., and R. Nickelson. *Survival of Vibrio parahaemolvticus in shrimp tissue under various environmental conditions.* Appl. Microbiol. 1972;23:34-37.

29. Temmyo R. *Studies on the prevention of outbreaks of food poisoning caused by Vibrio parahaemolyticus.* Bull. Tokyo Med. Dent. Univ. 1966;13:489-510.

30. Baab, P. J., and M.G. Johnson. 1974. *Resistance of Vibrio parahaemolyticus to sub-lethal heat when grown in batch and continuous cultures*. Abst.Ann. Mtg. Amer. Soc. Microbial.p. 17.

31. Goldmintz D. *Food technological aspects of Vibrio parahaemolyticus in market seafoods*. 1974;147-152. In T. Fujino, G. Sakaguchi, R. Sakazaki, andY. Takeda (ed.), International symposium on Vibrio parahaemolyticus. Saikon Pub!.Co., Ltd. Tokyo.

32. Covert D, and Woodburn M. *Relationships of temperature and sodium chloride concentration to the survival of Vibrio parahaemolyticus in broth and fish homogenate*.Appl. Microbial. 1972;23: 321-325.

33. Letchumanan V, Chan K, and Lee L. *Vibrio parahaemolyticus: a review on the pathogenesis, prevalence, and advance molecular identification techniques*. Frontiers in Microbiology, 2014;5.

34. ChatterjeE BD, Neogy KN, Gorbach SL. Study of Vibrio parahaemolyticus from cases of diarrhae in Calcutta. Indian J Med Res., 1970;58:234-238.

35. Pan TM, Wang TK, Lee CL, Chien SW, Horng CB. *Food-borne disease outbreaks due to bacteria in Taiwan, 1986-1995*.Journal of Clinical Microbiology. 1995;35: 1260-1262.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:11:01 EEST - 18.116.85.64

36. Matsumoto C, Okuda J, Ishibashi M, Iwanaga M, Garg P, Ramamurthy T, et al. *Pandemic spread of an O3:K6 clone of Vibrio parahaemolyticus & emergence of related strains evidenced by Arbitrarily Primed PCR & toxRS sequence analysis*. J. Clin. Microbiol. 2000;38:578–585.

37. Mead PS, Slutsker L, Dietz V, McCaig LF, Bresee JS, Shapiro C, Griffin PM, and Tauxe RV. *Food-Related Illness and Death in the United States*. Emer. Infect. Dis. 1999;5(5):607-625.

38. Makino K, Oshima K, Kurokawa K, Yokoyama K, Uda T, Tagomori K, et al. *Genome sequence of Vibrio parahaemolyticus: a pathogenic mechanism distinct from that of Vibrio cholerae*. Lancet 2003;361:743–749.

39. Paranjpye R, Hamel OS, Stojanovski A, and Liermann M. *Genetic diversity of clinical and environmental Vibrio parahaemolyticus strains from the Pacific Northwest*. Appl. Environ. Microbiol. 2012;78:8631–8638.

40. Burdette DL, Yarbrough ML, Orvedahl A, Gilpin CJ, and Orth K. *Vibrio parahaemolyticus orchestrates a multifaceted host cell infection by induction of autophagy, cell rounding, and then cell lysis.* Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2008;105:12497–12502.

41. Broberg CA, Calder TJ, and Orth K. *Vibrio parahaemolyticus cell biology and pathogenicity determinants*. Microbes Infect. 2011;13:992–1001.

42. Krachler AM, and Orth K. *Functional characterization of the interaction etween bacterial adhesin multivalent adhesion molecule 7 (MAM7) protein and its host cell ligands*. J. Biol. Chem. 2011;286,:38939–38947.

43. Zhang L, and Orth K. *Virulence determinants for Vibrio parahaemolyticus infection*.Curr.Opin.Microbiol. 2013;16:70–77.

44. Krachler AM, Ham H, and Orth K. *Turnabout is fair play: use of the bacterial multivalent adhesion molecule 7 as an antimicrobial agent*. Virulence. 2012;3:68–71.

45. Yoh M, Honda T, Miwatani T, Nishibuchi M. *Characterization of thermostable direct hemolysins encoded by four representative tdh genes of Vibrio parahaemolyticus*. Microb.Pathog. 1991;10:165-172.

46. Raimondi F, Kao JPY, Kaper JB, Guandalini S, and Fasano A. *Calcium dependent intestinal chloride secretion by Vibrio parahaemolyticus thermostable direct hemolysin in a rabbit model*. Gastroenterology. 1995;109:381-386.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:11:01 EEST - 18.116.85.64

47. Alipour M, Issazadeh K, and Soleimani J. *Isolation and identification of Vibrio parahaemolyticus from seawater and sediment samples in the southern coast of the Caspian Sea.* Comp. Clin. Path. 2014;23:129–133.

48. Cornelis GR. *The type III secretion injectisome*. Nat. Rev. Microbiol. 2006;4:811–825.

49. Izore T, Job V, and Dessen A. *Biogenesis, regulation, and targeting of the type III secretion system.* Structure 2011;13:603–612.

50. Paranjpye R, Hamel, OS, Stojanovski A, and Liermann M. *Genetic diversity of clinical and environmental Vibrio parahaemolyticus strains from the Pacific Northwest*. Appl. Environ. Microbiol. 2012;78:8631–8638.

51. Zhou X, Konkel ME, and Call DR. *Regulation of type III secretion system 1 gene expression in Vibrio parahaemolyticus is dependent on interactions between ExsA, ExsC, and ExsD*. Virulence. 2010;1:260–272.

52. Sreelatha A, Bennett TL, Zheng H, Jiang QX, Orth K, and Starai VJ. *Vibrio effector protein, VopQ, forms a lysosomal gated channel that disrupts host ion homeostasis and autophagic flux*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2013;110:11559–11564.

53. Ceccarelli D, Hasa NA, Hug A, Colwell RR. *Distribution, and dynamics of epidemic, and pandemicVibrio. (parahaemolyticus) virulence factors.* Front. Cell. Infect. Microbiol. 2013;3:97.

54. De Paola A, Nordstrom JL, Bowers JC, Wells JG, Cook DW. *Seasonal abundance of total and pathogenic Vibrio parahaemolyticus in Alabama oysters.* Appl Environ Microbiol 2003;69:1521-6.

55. Makino K, Oshima K, Kurokawa K, Yokoyama K, Uda T, Tagomori K, et al. *Genome sequence of Vibrio parahaemolyticus: a pathogenic mechanism distinct from that of Vibrio cholerae*. Lancet. 2003;361:743–749.

56. Trosky JE, Mukherjee S, Burdette DL, Roberts M, McCarter L, Siegel RM, et al. *Inhibition of MAPK signalling pathways by VopA from Vibrio parahaemolyticus*. J. Biol. Chem. 2004;279:51953–51957.

57. Yu WT, Jong KJ, Lin YR, Tsai SE, Tey YH, and Wong HC.*Prevalence of Vibrio parahaemolyticus in oyster and clam culturing environments in Taiwan*.Int. J. Food Microbiol. 2013;160:185–192.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:11:01 EEST - 18.116.85.64

58. Zhang L, and Orth K. *Virulence determinants for Vibrio parahaemolyticus infection*.Curr.Opin.Microbiol. 2013;16:60–77.

59. Sun X, Xu Q, Pan Y, Lan W, and Vivian CH. *A loop-mediated isothermal amplification method for rapid detection of Vibrio parahaemolyticus in seafood*. Ann. Microbiol. 2011;62:263–271.

60. Zhou X, Konkel ME, and Call DR. *Regulation of type III secretion system 1 gene expression in Vibrio parahaemolyticus is dependent on interactions between ExsA, ExsC, and ExsD.* Virulence. 2010;1:260–272.

61. Salomon D, Gonzalez H, Updegraff BL, and Orth K. *Vibrio parahaemolyticus type VI secretion system 1 is activated in marine conditions to target bacteria, and is differentially regulated from system 2*. PLoS ONE. 2013;8:61086.

62. Sarkar BL, Nair GB, Sircar BK, Pal SC: *Incidence and level of Vibrio parahaemolyticus associated with freshwater plankton.* Appl Environ Microbio. 1983;46(1):288–290.

63. Okuda J, Ishibashi M, Hayakawa E, Nishino T, Takeda Y, Mukhopadhyay AK, Garg S, Bhattacharya SK, Nair GB, Nishibuchi M: *Emergence of a unique O3: K6 clone of Vibrio parahaemolyticus in Calcutta, India, and isolation of strains from the same clonal group from Southeast Asian travelers arriving in Japan.* J Clin Microbiol 1997;35(12):3150–3155.

64. Peng FM, Jiang DY, Ruan HH, Liu HQ, and Zhou LP. *Pathogenic investigation on a food poisoning induced by Vibrio parahaemolyticus.* Prev. Med. Tribune. 2010;16746–747.

65. Broberg, C. A., Zhang, L., Gonzalez, H., Laskowski-Arce, M. A., and Orth, K. *A Vibrio effector protein is an inositol phosphatase and disrupts host cell membrane integrity*. Science. 2010;329:1660–1662.

66. Velusamy V, Arshak K, Korostynska O, Oliwa K, and Adley C. *An Overview of foodborne pathogen detection: in the perspective of biosensors.* Biotech. Adv. 2010;28:232–254.

67. Daniels NA, Ray B, Easton A, Marano N, Kahn E, McShan AL, et al. *Emergence of a new O3:K6 Vibrio parahaemolyticus serotype in raw oysters.* JAMA. 2000b;284:1541–1545.

68. Kubota, K., Kasuga, F., Iwasaki, E., Inagaki, S., Sakurai, Y., Komatsu, M., et al. *Estimating the burden of acute gastroenteritis and foodborne illness caused by Campylobacter, Salmonella, and Vibrio parahaemolyticus by using populationbased*

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:11:01 EEST - 18.116.85.64

telephone survey data, Miyagi Prefecture, Japan, 2005 to 2006. J. Food Prot. 2011;74:1592–1598.

69. Yano Y, Hamano K, Satomi M, Tsutsui I, Ban M, and Aue-Umneoy D. *Prevalence and antimicrobial susceptibility of Vibrio species related to food safety isolated from shrimp cultured at inland ponds in Thailand*. Food Control. 2014;38:30–36.

70. Pazhani GP, Bhowmik SK, Ghosh S, Guin S, Dutta S, Rajendran K, et al. *Trends in the epidemiology of pandemic and non-pandemic strains of Vibrio parahaemolyticus isolated from diarrheal patients in Kolkata, India*. PLoS Negl. Trop. Dis. 2014;8:2815.

71. Robert-Pillot A, Copin S, Gay M, Malle P, and Quilici ML. *Total and pathogenic Vibrio parahaemolyticus in shrimp: fast and reliable quantification by real time PCR*. Int. J. Food Microbiol. 2010;143:190–197.

72. Wilson BA, and Salyers AA. *Is the evolution of bacterial pathogens an out-of-body experience?* Trends Microbiol.2003;11:347–350.

73. Robert-Pillot A, Copin S, Himber C, Gay M, Quilici ML. *Occurrence of the three major Vibrio species pathogenic for human in seafood products consumed in France using real-time PCR.* Int J Food Microbiol. 2014;189:75–81.

74. Liston J. *Microbial hazards of seafood consumption*. Food Technol-Chicago. 1990;44(12):58–62.

75. Martinez-Urtaza J, Simental L, Velasco D, De Paola A, Ishibashi M, Nakaguchi Y, et al. *Pandemic Vibrio parahaemolyticus O3:K6, Europe*. Emerg. Infect. Dis. J. 2005;11:1319–1320.

76. Newton A, Kendall M, Vugia D, Henao L, and Mahon BE. *Increasing rates of vibriosis in the United States, 1996–2010*: review of surveillance data from 2 systems. Clin. Infect. Dis. 2002;54:S391–S395.

77. Nordstrom JL, and DePaola. A. *Improved recovery of pathogenic Vibrio parahaemolyticus from oysters using colony hybridization following enrichment*. J. Microbiol. Methods. 2003;52:273–277.

78. Daniels NA, Ray B, Easton A, Marano N, Kahn E, McShan AL, Del Rosario L, Baldwin T, Kingsley MA, Puhr ND, Wells JG, and Angulo FJ. *Emergence of a new Vibrio parahaemolyticus serotype in raw oysters.*JAMA. 2000;84:1541–1545.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:11:01 EEST - 18.116.85.64

79. Paydar, M, The CSJ, and Thong KL. *Prevalence and characterisation of potentially virulent Vibrio parahaemolyticus in seafood in Malaysia using conventional methods*, PCR and REP-PCR.Food Control. 2013;32:13–18.

80. Martinez-Urtaza JM, Bowers JC, Trinanes J, DcPaola L. *Climatic anomalies and the increasing risk of Vibrio parahaemoiyücus and Vibrio vulnificus illnesses- Food Res Intern. 2010*;43:1780-1790.

81. Yu X, Wu Q, Zhang J, Cheng J, Zhang S, and Wu K. *Prevalence, pathogenicity, and serotypes of Vibrio parahaemolyticus in shrimp from Chinese retail markets.* Food Control. 2014;46:81–85.

82. Igbinosa EO, and Okoh AI. *Emerging Vibrio species: an unending threat to public health in developing countries.* Res. Microbiol. 2008;159:495–506.

83. De Paola A, Ulaszek J, Kaysner CA, Tenge BJ, Nordstrom JL, Wells J, Puhr N, Gendel SM. *Molecular, serological, and virulence characteristics of Vibrio parahaemolyticus isolated from environmental, food, and clinical sources in north America and Asia*. Appl Environ Microb. 2003;69(7):3999–400.

84. Joseph SW,Colwell RR, Kaper JB. *Vibrio parahaemoiyücus and related halophilic Vibrios*.Crit Rev Microbiol. 1982;10:77-124.

85. Klein SL, Gutierrez West CK, Mejia DM, Lovell CR. *Genes similar to the Vibrio parahaemolyticus virulence-related genes tdh, tlh, and vscC2 occur in other vibrionaceae species isolated from a pristine estuary.* Appl Environ Microbiol. 2014;80(2):595–602.

86. Shirai H, Ito H, Hirayama T, Nakamoto Y, Nakabayashi N, Kurnagai K, Takeda Y, Nishibuchi M. *Molecular epidemiologic evidence for association of thermostable direct hemolysin (TDH) and TDH-rclatcd hemolysin of Vibrio parahaemolyiicus with gastroenteritis.* Infect Immunol. 1990;58:3568-3573.

87. Ottaviani 13, Leoni F, Rocchcgiani E, Canonico C, Potcnziani S, Santarelli S, Masini L, Scuola S, Carraturo A. *Vibrio parahaemolyticius accosiated gastroenteritis in Italy; persistent occurrence of O3 ; K6 pandemic clone and emergence of Ol ;KUT serotype*. Diagn Microbiol Infect Diseas 2010;66:452-455.

88. Joseph SW,Colwell RR, Kaper JB. *Vibrio parahaemoiyücus and related halophilic Vibrios*.Crit Rev Microbiol. 1982;10:77-124.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:11:01 EEST - 18.116.85.64

89. Greenberg EP, Dubois M, Palhof B. *The survival of marine vibrios in Mercenaria mercenaria, the hardshell clam.*J Food Saf. 1982;4:113-23.

90. Velusamy V, Arshak K, Korostynska O, Oliwa K, and Adley C. *An Overview of foodborne pathogen detection: in the perspective of biosensors.* Biotech. Adv. 2010;28:232–254.

91. Asakawa, Y., S. Akabane, and M. Noguchi: *Studies ofVibrio parahaemolyticus. 5. Distribution of the organism in Lake Hamana and overwintering experiments*. Jap. J. Pub. Health13, 158 (1966).

92. Galan JE. *Common themes in the design and function of bacterial effectors*. Cell Host Microbe. 2009;5:571–579.

93. ΕΛΣΤΑΤ. Δελτίο τύπου, *Έρευνα θαλάσσιας αλιείας με μηχανοκίνητα σκάφη: Έτος 2017.*https://www.statistics.gr/statistics/-/publication/SPA03/-.

94. FAO, ΣΕΘ, 2018: *The State of World Fisheries and Aquaculture*. https://www.fgm.com.gr/uploads/file/FGM_18_GR(2).pdf

95. Papadopoulou C, Economou E, Zakas G, Salamoura C, Dontorou C, Apostolou J (2007) *Microbiological and pathogenic contaminants of seafood in Greece*. J Food Qual 30: 28–42.

96. Oliver J.D, Kaper J.B. Vibrio *species*. In: Doyle M.P, Beuchat L.R, Montville T.J, editors. Food Microbiology. Washington DC USA: Fundamentals and Frontiers ASM Press; 1997. [Google Scholar]

97. ΕΛΣΤΑΤ. Δελτίο τύπου, *Ερευνα υδατοκαλλέργειών, έτος 2017.*

98. Solomakos N., Pexara A. 1,, Govaris A. 1 *Vibrio parahaemolyticus* in seafood – associated outbreaks 1Laboratory of Hygiene of Foods of Animal Origin, Faculty of Veterinary Medicine, University of Thessaly,43100 Karditsa, Greece J HELLENIC VET MED SOC 2012, 63(1): 65-73

99. Martinez-Urtaza JM, Bowers JC, Trinanes J, DePaola A (2010) *Climatic anomalies and the increasing risk of Vibrio parahaemolyticus and Vibrio vulnificus illnesses*. Food Res Intern 43: 1780–1790.

100.European Commission (2007) *Adapting to Climate Change in Europe – Options for EU Action.* Green Paper from the Commission to the Council, the European Parliament, the European Economic and Social Committee and the Committee of the Regions, COM

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:11:01 EEST - 18.116.85.64

(2007) 354 final, SEC (2007) 849. European Commission Brussels.

101. Drake SL, DePaola A, Jaykus LA (2007) *An Overview of Vibrio vulnificus and Vibrio parahaemolyticus.* Comp Rev Food Sci Food Saf 6: 120 -144.

102. Tantillo GM, Fontanarosa M, Di Pinto A, Musti M (2004) *Updated perspectives on emerging Vibrios associated with human infections.* Lett Appl Microbiol 39: 117–126.

103.Kelly MT and Stroh EM (1988) *Temporal relationship of Vibrio parahaemolyticus in patients and the environment.* J Clin Microbiol 26:1754–6.

104. Gooch JA, DePaola A, Bowers J, Marshall DL (2002) *Growth and survival of Vibrio parahaemolyticus in postharvest American oysters.* J Food Prot 65:970–974.

105. Huq A, Sack RB, Nizam A, Longini IM, Nair GB, Ali A (2005) *Critical factors influencing the occurrence of Vibrio cholerae in the environment of Bangladesh*. Appl Environ Microbiol 71: 4645–4654.

106. Martinez-Urtaza JM, Bowers JC, Trinanes J, DePaola A (2010) *Climatic anomalies and the increasing risk of Vibrio parahaemolyticus and Vibrio vulnificus illnesses*. Food Res Intern 43: 1780–1790

107. Baker-Austin C, Stockley L, Rangdale R, Martinez-Urtaza J (2010) *Environmental occurrence and clinical impact of Vibrio vulnificus and Vibrio parahaemolyticus*: a European perspective. Environ Microbiol Rep 2: 7-18.

108. Martinez-Urtaza JM, Simental L, Velasco D, DePaola A, Ishibashi M, Nakaguchi Y, Nishibuchi M, Carrera-Flores D, Rey-Alvarez C, Pousa A (2005) *Pandemic Vibrio parahaemolyticus O3:K6, Europe*. Emerg Infect Dis 8: 1319–1320

109.Garcia K, Torres R, Uribe P, Hernandez C, Rioseco ML, Romero J (2009) *Dynamics of clinical and environmental Vibrio parahaemolyticus strains during seafood-related summer diarrhea outbreaks in southern Chile*. Appl Environ Microbiol 75: 7482–7487.

110. Harvell, C., K. Kim, J. Burkholder, R. Colwell, P. Ep-stein, J. Grimes, E. Hofmann, E. Lipp, A. Osterhaus,R. Overstreet, J. Porter, G. Smith, and G. Vasta(1999). *Emerging marine diseases: Climate linksand anthropogenic factors.* Science285: 1505 – 1510.

111. Baumann P, Baumann L. *Biology of the marine enterobacteria: genera Beneckea and Photobacterium*. Annu Rev Microbiol. 1977;31:39–61. [PubMed] [Google Scholar]

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:11:01 EEST - 18.116.85.64

112. Geneste C, Dab W, Cabanes PA, Vaillant V, Quilici ML, Fournier JM. *Les vibrioses noncholériques en France: cas identifiés de 1995 à 1998 par le Centre National de Référence*. Bull Epidémiologie Hebdomadaire. 2000;9:38–40. [Google Scholar]

113. Cook DW, Ruple AD. 1989. *Indicator bacteria andVibrionaceae multiplication in post-harvest shellstock oysters.* J Food Prot 52:343–9.

114. Blake, P.A., Weaver, R.L. and Hollis, D.G. (1980). *Diseases of humans (other than cholera) caused by vibrios*. Annu. Rev. Microbiol., 34: 341-367.

115. Paparella, M. V. (1984). *Sanitary precautions for the seafood packer in preventing disease caused by Vibrio species*. In Vibrios in the Environment (ed. Colwell, R. R.), pp. 593–599. New York: John Wiley & Sons, Inc. Google Scholar

116. Πατσιούρα Ελένη(2009), *Επιθεώρηση αλιευμάτων (ιχθύων), σύμφωνα με την Ευρωπαική Ένωση*, ΑΤΕΙ Θες/νικης Σχολή Τεχνολογίας Γεωπονίας Τμήμα Ζωικής Παραγωγής

117. Sudha S., Mridula C., Silvester R., Hatha A. A. M. (2014). *Prevalence and antibiotic resistance of pathogenic Vibrios in shellfishes from Cochin market. Indian J. Geo Mar. Sci.* 43 815–824. [Google Scholar]

118. FAO/WHO. (2011). *Risk assessment of* Vibrio parahaemolyticus *in seafood: interpretative summary and Technical report*. Food and agriculture organization of the united nations/world health organization. *Microbiol. Risk Assess.* 16 193. [Google Scholar]

119. ECDC ,European Centre for Disease Prevention and Control. *Assessing the potential impacts of climate change on food and waterborne diseases in Europe*. Stockholm: ECDC; 2012, ISBN 978-92-9193-339-6 doi 10.2900/27022

120. Di Pinto A, Ciccarcsc G, Dc Corato R, Novello L, Tcrio V (2008) *Detection of pathogenic Vibrio parahaemoìyticus in southern Italian shellfish.* Food Cont 19: 1037-1041

121. Ottaviani D, Leoni F, Rocchcgiani E, Santarelli S, Canonico C, Masini L (2008) *First clinical report of pandemic Vibrio parahaemolyiicus 03:K6 infection in Italy*. J Clin Microbiol 46: 2144-2145.

122. Ottaviani 13, Leoni F, Rocchcgiani E, Canonico C, Potcnziani S, Santarelli S, Masini L, Scuola S, Carraturo A (2010) Vibrio parahaemoh'//CÎJ.V-associat cd gastroenteritis in Italy; *persistent occurrence of 03;K ópandemic clone and emergence of Ol ;KUT serotype*. Diagn Microbiol Infect Disease 66: 452-455.

123. Harvell, C. D., and Coauthors, 1999: *Emerging marine diseases:Climate links and anthropogenic factors.* Science, 285, 1505 – 1510.

124. Terzi, G., Buyuktanır, O. & Yurdusev, N. (2009). *Detection of the tdh and trh genes in Vibrio parahaemolyticus isolates in fish and mussels from Middle Black Sea Coast of Turkey*. Lettters Applied Microbiology 49: 757–763.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:11:01 EEST - 18.116.85.64

125. Food and Drug Administration (FDA). 1998b. *Guidance for industry: Guide to minimize microbial food safety hazards for fresh fruits and vegetables*. Available at: http://www.fda.gov/Food/Guidance Regulation/Guidance Documents Regulatory Information/Produce Plant Products/ucm064574.htm. Accessed 5 Jun. 2018.

126.World Health Organization. (2011). *Guidelines for drinking-water quality*, 4th ed. World Health Organization. http://www.who.int/iris/handle/10665/44584

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/06/2024 13:11:01 EEST - 18.116.85.64