Vibrio parahaemolyticus – patogenní bakterie z mořských ryb a plodů moře

MVDr. Lenka Necidová, Ph.D., MVDr. Šárka Cupáková, Ph.D.

Ústav hygieny a technologie mléka, Fakulta veterinární hygiena a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

Abstrakt

Konzumace mořských ryb a plodů moře kontaminovaných *Vibrio parahaemolyticus* bývá spojována s výskytem onemocnění z potravin, projevujícím se zpravidla příznaky akutní gastroenteritidy. Protože se do států Evropské unie importují mořské produkty lovené v pobřežních vodách celého světa a také v souvislosti s cestováním a konzumací tradičních pokrmů v přímořských státech, je otázka jejich mikrobiologické bezpečnosti mimořádně důležitá i pro spotřebitele v České republice. Riziko onemocnění z potravin způsobené *V. parahaemolyticus* nastává zvláště v případech nedostatečného tepelného opracování mořských ryb a plodů moře.

Klíčová slova: *Vibrio parahaemolyticus*, mořské ryby, plody moře, onemocnění z potravin

Letní období s sebou každoročně přináší zvýšené riziko vzniku alimentárních onemocnění. Je to dáno zejména intenzivnějším cestováním a také jistou změnou stravovacích návyků. Mimo původců typických pro středoevropské podmínky, musíme počítat i s patogeny, se kterými jinak v průběhu roku nepřicházíme běžně do kontaktu. Jedním z nich je i *Vibrio parahaemolyticus*.

Bakterie rodu *Vibrio* jsou přirozenou součástí celosvětového mořského systému. Konzumace mořských ryb a plodů moře kontaminovaných *V. parahaemolyticus* bývá spojována s výskytem onemocnění z potravin. Výskyt tohoto onemocnění je popisován v různých zemích na celém světě, epidemie jsou často hlášeny v Japonsku a USA. Protože se do států Evropské unie importují rybí produkty lovené v pobřežních vodách celého světa, je otázka jejich mikrobiologické bezpečnosti mimořádně důležitá i pro spotřebitele v České republice.

Bakterie *V. parahaemolyticus* jsou pravidelně izolovány z mořských ryb (např. makrel, tuňáků, sardinek) a mořských plodů (např. korýšů, krevet, ústřic, humrů, slávek nebo chobotnic). Vyskytují se na jejich kůži, lasturách, žábrech a ve střevech. Epidemie vyvolané *V. parahaemolyticus* jsou spojovány s konzumací kontaminovaných mořských plodů konzumovaných v syrovém nebo nedostatečně tepelně opracovaném stavu (sushi), stejně tak je možná i křížová kontaminace prostřednictvím kontaminovaných nádob, rukou pracovníků atd. Poprvé byla tato halofilní bakterie identifikována jako původce onemocnění z potravin v Japonsku v roce 1950, když 272 osob onemocnělo a 20 zemřelo po konzumaci polosušených mladých sardinek Shirasu – tradičního japonského pokrmu (Fujino et al., 1953).

Charakteristika *Vibrio parahaemolyticus*

V. parahaemolyticus je typicky zakřivená nesporulující fakultativně anaerobní gramnegativní tyčinka o délce 1,4 - 2,6 µm (Obrázek 1). Ke svému růstu vyžaduje přídavek více než 2 % NaCl (je tedy halofilní). Bakterie jsou pohyblivé pomocí jednoho polárního bičíku, jsou oxidáza pozitivní, kataláza pozitivní a zkvašují glukózu (ČSN P ISO/TS 21872-1, 2009).

Optimální teplota růstu *V. parahaemolyticus* je 37 ºC. Minimální teplota pro růst je 15 ºC, maximální 44 ºC. V laboratorních podmínkách je růst popisován již od 5 ºC. Bakterie je velmi citlivá k nízkým i vysokým teplotám. Při chladírenských teplotách a vaření je rychle inaktivována. Chlazením mořských ryb a plodů po ulovení a/nebo jejich tepelným opracováním se tak riziko nákazy *V. parahaemolyticus* snižuje. V případě mořských plodů je

uváděna D-hodnota při 55 ºC v rozmezí 0,29 – 2,5 minuty, kdy dojde ke snížení počtu živých bakterií *V. parahaemolyticus* v produktu o jeden logaritmický řád (Fernandes, 2009).

Kmeny *V. parahaemolyticus* se dělí na základě svých somatických (O) a kapsulárních (K) antigenů. Významným sérotypem, který je globálně rozšířen, je sérotyp O3:K6 původem z Japonska, který byl příčinou mnoha epidemií po celém světě – v asijských zemích (Okuda et al., 1997), v USA (Chowdhury et al., 2000), v Mexiku (Velazquez et al., 2012) nebo Chile (Alerte et al., 2012). Častým původcem epidemií bývá dále sérotyp O4:K12.

Patogeneze a faktory virulence

V. parahaemolyticus je enteropatogenní bakterie způsobující akutní gastroenteritidy projevující se průjmem, bolestmi hlavy, zvracením, nevolností, křečemi břicha a nízkou horečkou. Zpravidla se jedná o krátkodobé akutní onemocnění a příznaky obvykle spontánně vymizí. Ve výjimečných případech může být *V. parahaemolyticus* příčinou infekcí očí, uší a ran. Za potencionálně infekční dávku je považováno množství $>10^5$ KTJ.g^{-1}, přesto některé studie uvádí i nižší počty bakterií vyvolávající onemocnění. Inkubační doba je v průměru 15 hodin (4 – 96) a onemocnění může trvat 2 – 3 dny. Díky produkci celé řady extracelulárních enzymů bakterie snadno proniká hlenem k povrchovým tkáním hostitele a ty kolonizuje. *V. parahaemolyticus* lyzuje lidské erytrocyty, což je označováno jako Kanagawa fenomén (Bhunia, 2008).

Ne všechny kmeny *V. parahaemolyticus* mají stejný patogenní potenciál. *V. parahaemolyticus* produkuje čtyři druhy hemolyzinů, z nichž primárním virulentním faktorem jsou termostabilní hemolyzin (TDH) a termolabilní TDH-related hemolysin (TRH). V případě TDH jde o termostabilní toxin, jehož aktivita zůstává zachována při 100 ºC až 10 minut. Geny kódující tvorbu uvedených hemolyzinů - *tdh* a *trh* - jsou prokazovány u 99 % klinických kmenů *V. parahaemolyticus*, přestože jejich výskyt u kmenů izolovaných z prostředí je relativně nízký (2 – 3 %) (Nischibuchi and Kaper, 1995).

Výskyt onemocnění vyvolaných *Vibrio parahaemolyticus*

Rozšíření této bakterie je závislé na teplotě vody, salinitě a dále na množství zooplanktonu a kyslíku. *V. parahaemolyticus* upřednostňuje vody s vyšší teplotou a salinitou, proto je jejich výskyt typický pro pobřežní vody. V mořských vodách s teplotou pod 19 °C nebývá detekován, jeho růst je možný v potravinách při 10 °C, rychlejší množení je zaznamenáno při teplotách nad 20 °C. Země v mírném pásu zaznamenávají větší počet epidemií během letních měsíců (Yeung and Boor, 2004), v tropickém pásu je jejich výskyt zaznamenáván během celého roku. Sezónní výskyt *V. parahaemolyticus* u krevet z oblasti jihozápadního Iránu hodnotili Zarei et al. (2012). V zimě byly pozitivní 4 %, v létě 18,6 % vzorků. Z celkového počtu všech 300 analyzovaných vzorků byly dva vzorky *tdh*-pozitivní, žádný *trh*-pozitivní.

Mnohé studie také hodnotí výskyt *V. parahaemolyticus* v Evropě. Například Robert-Pillot et al. (2004) uvádí, že patogenní izoláty *V. parahaemolyticus* jsou přítomny jak v pobřežních oblastech Francie, tak i v mořských plodech importovaných do Francie. Oblastí s vysokou produkcí mořských plodů je severozápadní Španělsko (Galicie). Zde bylo v letech 1997-2000 hlášeno 84 případů infekce vyvolané *V. parahaemolyticus.* Nejrozsáhlejší epidemie proběhla v roce 1999, kdy příčinou onemocnění 64 pacientů byla konzumace ústřic (Martinez-Urtaza et al., 2005).

Výskyt onemocnění vyvolaného *V. parahaemolyticus* nemá vysokou frekvenci, zahraniční studie uvádí 0,5 případu na 100 tisíc obyvatel za rok. EFSA (2012) zmiňuje vzrůstající počet onemocnění a epidemií v roce 2000 ve Španělsku, Izraeli a v oblasti Baltského moře v souvislosti s oteplením pobřežních vod. Nálezy *V. parahaemolyticus* jsou v České republice

ojedinělé. Státní zdravotní ústav Praha potvrdil během posledních šesti let záchyt 3 kmenů *V. parahaemolyticus*, a to v letech 2008, 2010 a 2011.

Z mnoha dalších celosvětově popsaných infekcí vyvolaných *V. parahaemolyticus* lze uvést případ vodnatého průjmu u pasažérů výletní lodi z oblasti Aljašky (McLaughlin et al., 2005). Poté, co u některých výletníků vypukly příznaky typické pro infekci *V. parahaemolyticus* a po identifikaci původce onemocnění, bylo dodatečným průzkumem zjištěno, že 17 % všech dotazovaných pasažérů na sobě také pozorovalo příznaky infekce. Následné analýzy ukázaly, že příčinou onemocnění byly syrové ústřice podávané na lodi jako jeden z pokrmů. Studie prováděná CDC (2006) uvádí výskyt 177 případů infekce *V. parahaemolyticus* ve státech New York, Oregon a Washington během krátkého letního období od května do července 2006. Zdrojem onemocnění byly mořské ryby a plody moře konzumované v restauracích, zakoupené v tržní síti nebo získané při rekreačním rybolovu a sběru.

Stanovení *Vibrio parahaemolyticus* v potravinách

Průkaz *V. parahaemolyticus* se provádí dle ČSN P ISO/TS 21872-1 a vyžaduje čtyři po sobě následující stupně. Nejprve dochází k pomnožení vzorku v tekuté selektivní půdě - alkalizovaná peptonová voda s vyšším obsahem soli (ASPW), a to aerobně při teplotě 37 °C po dobu 6 hodin (hluboko zmrazené výroky) nebo při teplotě 41,5 °C po dobu 6 hodin (čerstvé výrobky). Následuje druhé pomnožení v tekuté selektivní půdě (ASPW) při teplotě 41,5 °C po dobu 18 hodin za aerobních podmínek. Následně se provede vyočkování na dvě selektivně-diagnostické půdy, z nichž povinný je agar s thiosulfátem, citranem, žlučí a sacharózou (TCBS). Inokulované misky se inkubují aerobně při 37 °C po dobu 24 hodin a zjišťuje se přítomnost suspektních kolonií *V. parahaemolyticus*. Na TCBS agaru roste *V. parahaemolyticus* v hladkých zelených koloniích o průměru 2-3 mm (Obrázek 2). Konfirmace vybraných suspektních kolonií zahrnuje stanovení oxidázy, mikroskopické vyšetření a vybrané biochemické testy.

Izoláty *V. parahaemolyticus* mají pozitivní oxidázovou reakci a poskytují pozitivní výsledky testu pohyblivosti. Při růstu na TSI agaru zkvašují glukózu bez tvorby plynu (svislá část TSI agaru u dna je okyselená – žlutá), ale nezkvašují laktózu a sacharózu (šikmá část TSI agaru je alkalizovaná – červená), neprodukují H_2S. Dále není pozorován jejich růst v peptonové vodě s 0 % a 10 % NaCl, zatímco v prostředí s 2, 6 a 8 % NaCl se bakterie množí. Reakce v ONPG testu (průkaz β-galaktosidázy) je negativní. *V. parahaemolyticus* je indol pozitivní. K potvrzení patogenity kmenů se provádí ve specializovaných laboratořích molekulární typizace izolátů.

Závěr

Mořské ryby a plody moře jsou spojovány s mikrobiálním nebezpečím. Riziko onemocnění z potravin způsobené *Vibrio parahaemolyticus* nastává zvláště v případech absence baktericidních kroků v průběhu technologického opracování těchto produktů. Zvláště nedostatečné tepelné opracování může pro konzumenta představovat zdravotní riziko.

Použitá literatura

Alerte V., Cortes S., Diaz J., Vollaire J., Espinoza M. E., Solari V., Cerda J., Torres M. Foodborne disease outbreaks around the urban Chilean areas from 2005 to 2010. *Revista Chilena de Infectologia*, 2012, 29 (1), 26-31.

Bhunia, AK. Foodborne microbial pathogens. Mechanisms and pathogenesis. 1st ed. New York, USA: Springer Science+Business Media, LLC. 2008. 276 p. ISBN 978-0-387-74536-7

Centers for Disease Control and Prevention *Vibrio parahaemolyticus* infections associated with consumption ofraw shellfish-Three states, 2006. MMWR;55:854-6.

ČSN P ISO/TS 21872-1 (2009): Mikrobiologie potravin a krmiv - Horizontální metoda průkazu potenciálně enteropatogenních bakterií rodu Vibrio - Část 1: Průkaz *Vibrio parahaemolyticus* a *Vibrio cholerae.*

Fernandes, R. Microbiology handbook. Vol. 2: Fish and seafood. 1st ed. Leatherhead, UK: Leatherhead Food International Ltd. 2009. 258 p. ISBN 978-1-905224-76-0

Fujino, T., Okuno Y., Nakada D., Aoyama A., Fukai K., Mukai T., Uebo T. On the bacteriological examination of Shirasu food poisoning. *Med. J. Osaka Univ*., 1953, 4, 299-304.

Chowdhury N. R., Chakraborty S. Ramamurthy T., Nishibuchi M., Yamasa S., Takeda Y., Nair G. B. Molecular evidence of clonal *Vibrio parahaemolyticus* pandemic strains. *Emerging Infectious Diseases*, 2000, 6, 631-636.

Martinez-Urtaza J., Simental L., Velasco D., DePaola A., Ishibashi M., Nakaguchi Y., Nishibuchi M., Carrera-Flores D., Rey-Alvarez C., Pousa A. Pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6, Europe. *Center for Disease Control and Prevention*, 2005, vol. 11, Nr 8, ISSN:1080-6059.

McLaughlin, J. B., DePaola A., Bopp, Ch. A. et al. Outbreakof Vibrio parahaemolyticus Gastroenteritis Associated with Alaskan Oysters. *N Engl J Med*, 2005, 353, 1463-1470.

Nishibuchi M., Kaper J. B. Thermostable direct hemolysin gene of *Vibrio parahaemolyticus* a virulence gene acquired b marine bacterium. *Infection and Immunity*, 1995, 63, 2093-2099.

Okuda J., Ishibashi M., Hayakawa E., Nishino T., Takeda Y., Mukhopadhyay A. K., Bhattacharya S. K., Nair G. B., Nishibuchi M. Emergence of a unique O3:K6 clone of *Vibrio parahaemolyticus* in Calcutta, India, and isolatior strains from the same clonal group from southheast Asian travelers arriving in Japan. *Journal of Clinical Microbiology*, 1997, 35, 3150-3155.

Robert-Pillot A., Guénolé A., Lesne J., Delesmont R., Fournier J. M., Quilici M. L. Occurence of the tdh and trh genes in *Vibrio parahaemolyticus* isolates from waters and raw shellfish collected in two French coastal areas and from seafood imported into France. *Int J Food Microbiol*, 2004, 91 (3), 319-325.

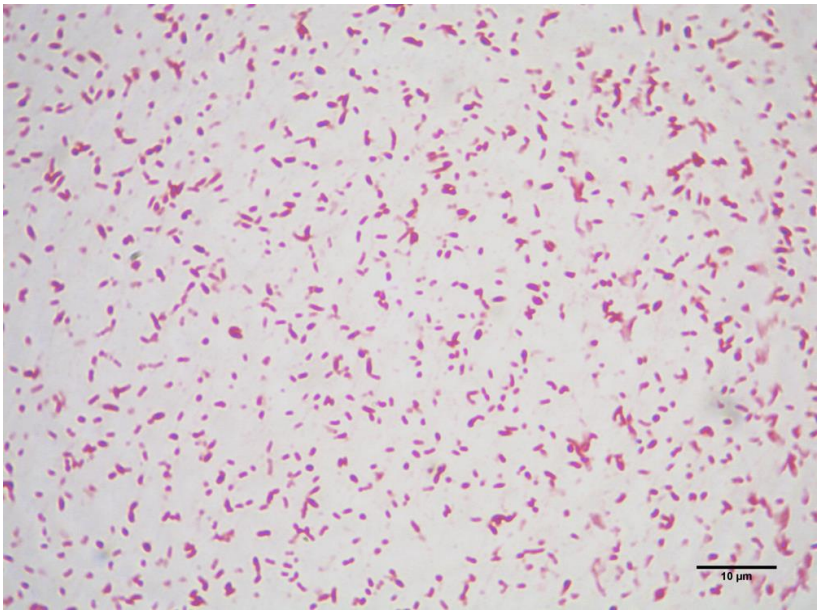
Velazquez R. J., León S. N., Villasenor F. H., Villafana R. S., Canizalez R. A. Association of Pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 Present in the Coastal Environment of Northwest Mexico with case sof Recurrent Diarrhea between 2004 and 2010. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78 (6), 1794-1803.

Yeung P. S. M., Boor K. J. Epidemiology, pathogenesis, and preventiv of foodborne *Vibrio parahaemolyticus* infections. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2004, 1, 74-88.

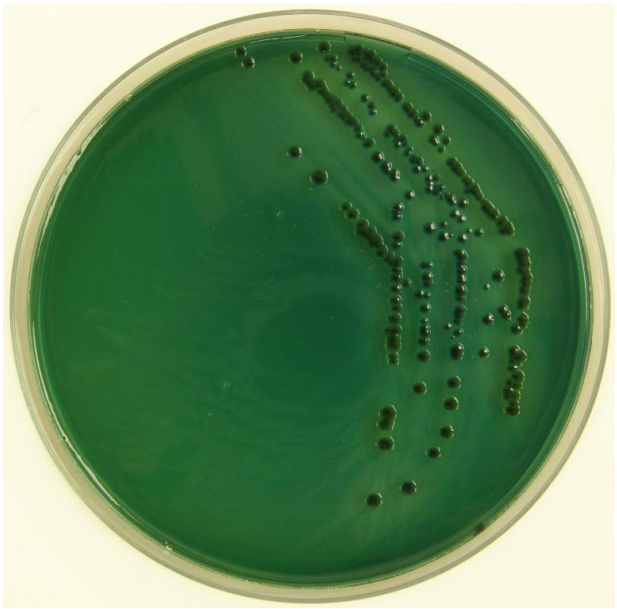
Zarei M., Borujeni M. P., Jamnejad A., Khezrzadeh M. Seasonal prevalence of *Vibrio* species in retail shrimps with an emphasis on *Vibrio parahaemolyticus*. Food kontrol, 2012, 25 (1), 107-109.

Článek byl publikován v roce 2012 v časopise Maso:

Necidová, L., Cupáková, Š. *Vibrio parahaemolyticus* – patogenní bakterie z mořských ryb a plodů moře. *Maso,* 2012, roč. 23, č. 4, s. 43-45.



Obrázek 1: *Vibrio parahaemolyticus* – barvení dle Grama, zvětšení 1000x


Obrázek 2: Růst *V. parahaemolyticus* na TCBS agaru