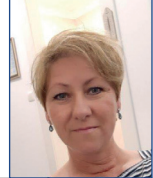


# Halofilni vibriji u školjkašima kao potencijalno patogeni uzročnici zoonoza u ljudi



N. Džafić\*, K. Kvirgić, L. Kozadžinski i A. Humski

## Sažetak

Uzgoj, izlov i promet školjkašima reguliran je brojnim zakonima kojima je cilj stavljanje na tržište zdrave hrane. Zakonodavstvo ne predviđa kontrolu *Vibrio* spp., što može rezultirati stavljanjem na tržište i konzumacijom školjkaša kontaminiranih bakterijama ovog roda te posljedično prouzročiti pojavu bolesti u ljudi. U radu je prikazano značenje najvažnijih potencijalno patogenih halofilnih vibrija poput *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* i *V. vulnificus* u infekciji ljudi. Tijekom zadnjih dvadesetak godina u zemljama mediteranske regije provedena su istraživanja, koja su redom potvrdila prisutnost vibrija u morskoj vodi, školjkašima, sedimentu i u otpadnim vodama. U Hrvatskoj je u rijetkim istraživanjima školjkaša dokazana duž Jadranske obale prisutnost *Vibrio* spp., uz dominaciju vrste *V. parahaemolyticus*. Sve izraženija pojava globalnog zatopljenja podudara se i s neočekivanim pojavama infekcija s *Vibrio* spp. na sjeveru Europe, ponajprije na području Baltičkog mora. Četiri su važne značajke pripadnika roda *Vibrio* koje ih čine pogodnima u procjeni klimatskih promjena. To su: osjetljivost na temperaturu

(jako dobro rastu pri temperaturama iznad 15 °C), brzo umnažanje, pojava u područjima gdje se nikada nisu javljali (kao što su sjeverna Europa, Aljaska, Čile, sjevero-istočno područje SAD) i mogućnost ulaska u organizam putem hrane i izlaganjem kontaminiranoj vodi. S gledišta sigurnosti hrane i školjkaša kao hrane, globalno zatopljenje i klimatske promjene imaju značajan utjecaj na dinamiku i rasprostranjenost potencijalno patogenih halofilnih vibrija na područja u kojima nisu povijesno dokazani kao uzročnici oboljenja ljudi. Posljednjih su desetljeća razvijane različite metode s ciljem pouzdanije identifikacije *Vibrio* vrsta. Radilo se na poboljšanju klasičnih mikrobioloških metoda, a većina je istraživanja usmjerena prema razvoju i primjeni molekularnih tehnika. Istraživanjima kojima su uspoređivani rezultati kulturnih mikrobioloških metoda i lančane reakcije polimerazom (PCR), dokazana je značajno veća osjetljivost i pouzdanost molekularnih metoda u dokazu uzročnika.

**Ključne riječi:** *dvoljuštorni školjkaši, Vibrio spp., potencijalni patogeni, zoonoze*

Mr. sc. Natalija DŽAFIĆ\*, dr. med. vet., (dopisni autor, e-mail: dzafic.vzr@veinst.hr), Kristina KVRGIĆ, dipl. san. ing., stručna suradnica, Hrvatski veterinarski institut, Veterinarski zavod Rijeka, Hrvatska; dr. sc. Lidija KOZADŽINSKI, dr. med. vet.; redovita profesorica, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Hrvatska; dr. sc. Andrea HUMSKI, dr. med. vet., znanstvena savjetnica, docentica, Hrvatski veterinarski institut, Zagreb, Hrvatska

## Uvod

Dvoljuštorni školjkaši (razred *Bivalvia*) su od davnih vremena prisutni kao kvalitetna hrana. Postoje mnoge vrste dvoljušturnih školjkaša, a u Republici Hrvatskoj najviše se uzgajaju dagnje (*Mytilus galloprovincialis*) i kamenice (*Ostrea edulis*) te se s njima potrošači najviše i susreću. Školjkaši se hrane filtriranjem morske vode u kojoj žive, a u jednom satu mogu profiltrirati i više od osam litara vode, pri čemu akumuliraju filtrirane čestice u tkivima i međuljuštornoj tekućini (Ribarić i sur., 2012.), ali i različite mikroorganizme i toksine. Neki od tih mikroorganizama služe školjkašima kao hrana (plankton) dok druge, neprobavljene akumuliraju u svojem tijelu. Tek nakon konzumacije sirovih ili toplinski nedovoljno obrađenih školjkaša, akumulirani mikroorganizmi prelaze u aktivni stadij i tada prouzroče bolest ili intoksikaciju koja može ozbiljno ugroziti ljudsko zdravlje, a ponekad mogu prouzročiti i smrt (Čadež i Teske-redžić, 2005.). Prema ranije objavljenim podacima nakon konzumacije školjkaša koji su sadržavali akumulirane mikroorganizme uzrok bolesti/trovanja ljudi su u 27 % slučajeva bili virusi, u 60 % bakterije a u 3 % paraziti (Mead i sur., 1999.). Trovanje biotoksinima javlja se ubrzo nakon konzumacije, najčešće sa želučano crijevnim i neurološkim znacima, a većina oboljelih opisuje višestruke znakove bolesti (Munday i Reeve, 2013.).

Najveći broj mikroorganizama u more dospijeva nepročišćenim ili djelomično pročišćenim gradskim otpadnim vodama, ali isto tako mikrobiološko onečišćenje može biti prouzročeno ispiranjem tla jakim kišom i vjetrom, kao i balastnim vodama iz brodova, a more mogu onečistiti i kupaći (Krstulović i Šolić, 1997.). Za razliku od drugih mikroorganizama, bakterije iz roda *Vibrio* (*V.*) prirodno su prisutne u morskoj vodi i njihove koncentracije variraju sezonski. Većina vrsta može živjeti u

širokom rasponu saliniteta, a brojnost im se povećava s porastom temperature (Wittman i Flick, 1995.).

Uzgoj, izlov i promet školjkašima reguliran je brojnim zakonima kojima je cilj stavljanje na tržište "sigurne" hrane. Zakonodavstvo Europske Unije (Uredba (EZ) 853/2004) (Anonymous, 2004.) zahtijeva da školjkaši u trenutku prodaje budu živi ili odgovarajuće prerađeni, besprijekornih senzornih značajki, ne prelaze dopuštene granice biotoksina i da udovoljavaju Uredbi (EZ) 2073/2005 (broj bakterija *Escherichia coli*) (Anonymous, 2005.). U Republici Hrvatskoj se praćenje kakvoće školjkaša sustavno provodi prema Planu praćenja kakvoće mora i školjkaša na proizvodnim područjima i područjima za ponovno polaganje školjkaša, a temelji se na određivanju prisutnosti bakterije *E. coli* kao indikatora mikrobiološkog onečišćenja, biotoksina, teških metala i benzo(a)pirena (Anonymous, 2021.).

Sobzirom da je u našoj zemlji razvijena djelatnost turizam, školjkaši su traženi specijalitet te je pri plasmanu na tržište važno osigurati zdravstveno ispravne školjkaše. Do 2015. godine, EFSA-ina godišnja izvješća nisu naglašavala *Vibrio* vrste kao pojedinačne uzročnike oboljenja u ljudi, već su ih svrstavale u kategoriju "ostalih bakterijskih uzročnika", da bi u izvješću za 2015. godinu bile evidentirane četiri epidemije u Francuskoj s 29 oboljelih osoba (EFSA/ECDC, 2016.). Europsko zakonodavstvo ne predviđa nadzor nad prisutnošću *Vibrio* spp., što može rezultirati stavljanjem na tržište i konzumacijom školjkaša kontaminiranih bakterijama ovog roda te posljedično prouzročiti pojavu bolesti u ljudi. U ovom radu prikazana je proširenost i uloga najznačajnijih potencijalno patogenih halofilnih vibrija poput *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* i *V. vulnificus*.

## Potencijalno patogeni halofilni vibriji

Porodica *Vibrionaceae* pripada redu Vibrionales, razredu Gammaproteobacteria. Bakterije porodice *Vibrionaceae* oblika su ravnih ili svinutih štapića, veličine 0,3-1,3 x 1,4-5,0 µm; pokretljive su i fakultativno anaerobne (Naglić i sur., 2005.). U rod *Vibrio* svrstane su mnoge vrste Gram-negativnih štapićastih bakterija. Opisano je 27 vrsta, od kojih je 12 važno za humanu medicinu, a kao uzročnicima infekcija u riba opisano je 15 vrsta (Koneman i sur. 2000.). Vrste *V. cholerae* (non-O1) *V. parahemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. fluvialis*, *V. furnisii*, *V. metschnikovii*, *V. mimicus*, *V. alginolitycus*, *V. harveyi* (*V. carchariae*), *Grimontia* (*Vibrio*) *hollisae* i *Photobacterium* (*Vibrio*) *damselae* uzrokuju bolest u akvatičnih životinja i ljudi. *Vibrio* infekcija prouzročena vrstom *V. vulnificus* dokazana je zoonoza, a ostale vrste pripadaju visoko rizičnim uzročnicima bolesti riba i ljudi koji su najčešće zaraženi konzumacijom sirove ribe, rakova i školjkaša. Različite vrste riba i vodene ptice su rezervoari i vektori ovih bakterija (Austin, 2010.).

Bakterije roda *Vibrio* prirodni su stanovnici mnogih mora, obala i rijeka, koji se, ovisno o okolišnim uvjetima, mogu dokazati kao slobodno živući organizmi u vodi, pričvršćeni na planktone, u sedimentu i različitim morskim organizmima. Zajednička karakteristika pripadnika roda je mogućnost preživljavanja u nepovoljnim okolišnim uvjetima u takozvanoj "viable but nonculturable state" (VNS) kada ih se ne može dokazati uzgojem na hranjivim podlogama, ali s nastankom povoljnih okolišnih uvjeta može se dokazati njihova prisutnost mikrobiološkim metodama (Huq i sur., 2013.).

### *Vibrio cholerae*

Najznačajnija od svih vrsta je *V. cholerae* koja je uzročnik kolere. *V. cholerae* je prema

Gramu negativna pokretna bakterija s jednom polarno smještenom flagelom. Proizvodi enterotoksin (kolera-toksin) odgovoran za razvoj simptoma bolesti. Na osnovi lipopolisahardnih somatskih O antigena sojevi te bakterije podijeljeni su u serološke skupine (De Magny i sur., 2011.). Poznato je više od 200 različitih O-antigenih tipova, a epidemije kolere prouzroče sojevi *V. cholerae* serogrupa O1 i O139. Serogrupa O1 pojavljuje se u 2 biotipa: klasični i El Tor, a oba se mogu klasificirati u tri serotipa: Ogawa, Inaba i Hikojima. Uzročnik kolere osjetljiv je na kiselost (pH <6 ga uništava, a dobro podnosi pH >6). Ostali sojevi koji nemaju O1 i O139 antigene (non-O1 i non-O139) ne proizvode kolera toksin, ali se po biokemijskim svojstvima ne razlikuju od uzročnika kolere i uglavnom prouzroče dijarealne bolesti (Rukavina, 2013.).

Do danas je prepoznato sedam svjetskih pandemija kolere; prvih šest prouzročeno je bakterijom serološke grupe O1, dok je sedma pandemija koja je započela 1961., a traje i danas, prouzročena novim biotipom bakterije *V. cholerae* O1, El Tor. Bolest prouzročena ovim uzročnikom obično nije tako teška kao kod oboljenja prouzročenih klasičnim O1 biotipom (Colwell, 1996.). Epidemija kolere iz 1992. godine prouzročena je serotipom O139 (Häse i Barquera, 2001.). Patogenost sojeva bakterija *V. cholerae* O1 i O139 ovisi o kombinaciji čimbenika virulencije koji uključuju enterotoksin (kolera toksin - CT, gen *ctxA*) te sposobnost vezivanja i kolonizacije stanica tankog crijeva (faktor kolonizacije, *tcpA*). Postoje i drugi čimbenici povezani s enteropatogenim učinkom poput hemolizina sličnog El Tor-u (*hlyA*), zatim termostabilni hemolizin enterotoksin (*stn/sto*), neuraminidaze (*nanH*), toksin nalik na *Shiga* toksin (*stx*) i drugi (Rivera i sur., 2001.).

Planktoni imaju važnu ulogu za preživljavanje bakterije *V. cholerae* u vodi, pri čemu u vrijeme cvjetanja mora dolazi do značajnog povećanja broja bakterija.

Dokazana je prirodna povezanost bakterije *V. cholerae* i zooplanktona kopepoda. Opisan je put širenja i razmnožavanja uzročnika u vodenom okolišu, za razliku dotadašnjem mišljenju epidemiologa koji su smatrali da su jedini rezervoar bakterije *V. cholerae* probavni organi ljudi i da u vanjskom okolišu uzročnik kratko preživljava (Huq i sur., 1983.). U istraživanju pojavnosti zooplanktona i incidencije kolere na dva područja Bangladeša, ustanovljeno je da su dominantne skupine zooplanktona kopepodi, rotiferi i kladocerani povezane s dokazom bakterije *V. cholerae* i/ili pojavom bolesti (De Magny i sur., 2011.). Prilikom pričvršćivanja na površinu fitoplanktona i zooplanktona, bakterija *V. cholerae* stvara biofilm, dok fitoplanktoni izlučuju cijeli niz organskih tvari koje podržavaju rast slobodno živućih bakterija *V. cholerae*. Pričvršćivanjem na plankton i stvaranjem biofilma olakšava se preživljavanje bakterije u okolišu, povećavajući njezinu toleranciju prema niskom pH i visokoj temperaturi (Suzita i sur., 2009.). U ekosustavu oceana, sposobnost bakterija za razgradnju hitina ima ključno ekološko značenje. *V. cholerae* ima hitinazu koja mu omogućuje korištenje hitina kao izvor ugljika, a posjeduje i sustav prepoznavanja hitina i sustav kolonizacije crijeva kopepoda. Poznato je da jedan kopepod može sadržavati  $10^4$  do  $10^6$  stanica *V. cholerae* (Lipp i sur., 2002.). Okoliš je važan čimbenik u epidemiologiji kolere. Gustoća naseljenosti, loša sanitarna i zdravstvena infrastruktura ozbiljni su nedostaci u kontroli i suzbijanju bolesti. Promjena temperature površinske vode i kontaminacija okoliša hranjivim tvarima dovodi do proliferacije fitoplanktona i zooplanktona uz posljedično povećanje brojnosti uzročnika kolere (Harris i sur., 2012.). Kopepodi (*Crustacean*), planktonski morski račići i trzalci (*Diptera*, *Chironomidae*), vodeni kukci, prirodni su rezervoari vrste *V. cholerae*.

Poznato je da mnoge vrste riba mogu biti rezervoari i vektori *V. cholerae*. Do sada je bakterija *V. cholerae* izdvojena iz 22 vrste slatkovodnih i 9 vrsta morskih riba, a u nekoliko slučajeva radilo se i o serovaru O1. Opisana je povezanost konzumacije ili rukovanja sirovom ribom u pojavi nekoliko epidemija kolere. Isto tako se može zaključiti da ribe mogu biti nositelji bakterije u nepovoljnim staništima te ih širiti u vodenom svijetu. *V. cholerae* je izdvojena iz ribljih crijeva, kože, bubrega, jetre i moždanog tkiva. Vodene ptice isto tako, jer se hrane inficiranim ribama, pogoduju širenju bakterije (Halpern i Izhaki, 2017.).

Različite vrste *V. cholerae* vrlo su proširene u prirodi, u morskoj i slatkoj vodi, obalama mora i koritima rijeka, a vrlo često se dokazuju u različitim vrsta akvatičnih životinja. Njihova prisutnost posebno je dobro dokumentirana u Aziji i Latinskoj Americi i u obalnim vodama Meksičkog zaljeva. Brojnost im se povećava, osobito u školjkašima i uvijek je povezana s visokom temperaturom površinske vode tijekom toplijih mjeseci i sekundarno s proliferacijom fitoplanktona i zooplanktona. Vibriji mogu preživjeti i razmnožavati se u onečišćenim vodama s povećanom koncentracijom soli pri temperaturi od 10 °C do 30 °C (Harris i sur., 2012.). U izolatima *V. cholerae* iz endemičnih područja kolere u Bangladešu, ustvrđena je tolerancija na 6 % soli u 85% izolata, u njih 45 % na 3 % soli dok niti jedan izolat nije preživio uzgoj pri koncentraciji od 8 % soli. Isti izolati testirani su na antimikrobnu rezistenciju, pri čemu je ustvrđeno da je većina rezistentna na barem dva uobičajena antimikrobna lijeka: 95,45 % je bilo rezistentnih na ampicilin, 50 % na eritromicin, 66,63 % na nalidiksičnu kiselinu, 27,27 % na cotrimoxazole. Rast svih izolata koji su pokazali antimikrobnu rezistenciju uspješno je inhibirao ekstrakt biljke *Terminalia arjuna*, što ukazuje na

mogućnost primjene biljnog ekstrakta za tretiranje multirezistentnih sojeva (Fakruddin i sur., 2011.).

### ***Vibrio parahaemolyticus***

Bakterija *V. parahaemolyticus* jedan je od glavnih uzročnika trovanja hranom posebno u zemljama poput Japana, Indonezije, Tajvana i drugih gdje se obilno konzumiraju sirovi morski plodovi. Uzročnik stvara enterotoksin koji prouzroči gubitak tekućine. Već 24 sata poslije konzumacije morskih plodova prisutni su: vodenasti proljev, abdominalni grčevi, glavobolja, povraćanje i blago povišenje temperature (Letchumanan i sur., 2014.).

U jednom od ranijih istraživanja ekologije bakterije *V. parahaemolyticus* potvrđena je ovisnost incidencije bakterije s temperaturom vode (Kaneko i Colwell, 1973.). Proširenost *V. parahaemolyticus* u morskoj vodi ovisi o temperaturi pa se rijetko pojavljuje dok temperatura mora ne dosegne 15 °C ili više. Budući da je prevalencija *V. parahaemolyticus* u školjkašima ovisna o temperaturi, mogućnost dokaza veća je u školjkaša izlovljenih tijekom proljeća i ljeta, nego zimi. Broj bakterija *V. parahaemolyticus* u školjkašima nakon izlovljavanja obično je manji od 10<sup>3</sup> cfu/g, no u uvjetima skladištenja pri temperaturama do 26 °C može se naglo umnožiti za 50 do 790 puta od početne vrijednosti tijekom 24 sata (Su i Liu, 2007.). Utvrđeno je da se uzročnik tijekom zimskih mjeseci pri temperaturi <14 °C, iako je prisutan u sedimentu ne može dokazati u vodi. Porastom temperature vode od kasnog proljeća do ranog ljeta, vibriji koji su prezimili u sedimentu oslobađaju se i šire vodom. Adsorpcija bakterije *V. parahaemolyticus* na hitin i kopepode, jedan je od najvažnijih čimbenika koji određuju prirodni habitat te bakterije i njenu ekološku nišu (Kaneko i Colwell, 1975.). Ustanovljen je utjecaj saliniteta na adsorpciju na način da povećanje saliniteta s 4,2 ‰ na 10-16

‰ smanjuje adsorpciju sa 100 % na 70-80 %, a utvrđen je i utjecaj pH pri čemu je 100 % adsorpcija dokazana pri pH 6, dok povećanjem pH na 9 adsorpcija pada na 60 %. Može se zaključiti da širenje ovog mikroorganizma ovisi o temperaturi, salinitetu, pH i drugim okolišnim čimbenicima. U tropskim i subtropskim područjima koja karakteriziraju visoke temperature tijekom cijele godine, nema većih razlika u brojnosti bakterije *V. parahaemolyticus* u morskoj vodi, sedimentu i školjkašima u odnosu na promjene temperature morske vode (Yu i sur., 2013.).

Godine 1996. dokazana je pojava pandemijskog klona bakterije *V. parahaemolyticus* O3:K6 u jugoistočnoj Aziji (Okuda i sur., 1997.), a 1998. godine uzročnik je dokazan i u Južnoj Americi, u Čileu (Gonzales-Escalona i sur., 2005.). U gradovima Puerto Montt i Antofagasta prouzročio je oboljenje u oko 1500 ljudi. Epidemija u Antofagasti povezana je s konzumacijom školjkaša i utvrđena je prisutnost istog uzročnika u izmetu ljudi i školjkaša. Pretpostavljalo se da je pojava patogenog uzročnika povezana s klimatološkim fenomenom El Niño (Córdova i sur., 2002.). Pandemijski soj je ostao prisutan na području Čilea još nekoliko godina, da bi tijekom ljeta 2006. godine opet masovno obolilo stanovništvo u Puerto Monttu, gdje je 50 % obrađenih uzoraka bilo pozitivno na *tdh+* gen pandemijskog soja O3:K6 (Fuenzalida i sur., 2007.).

Od 60-tih godina prošlog stoljeća, bakterija *V. parahaemolyticus* jedan je od najznačajnijih patogena koji se prenose hranom, a pandemijski soj O3:K6 prouzročio je veliku epidemiju u Japanu, u razdoblju od 1997. do 2001. godine. Proučavanjem velikog broja uzoraka morskih plodova utvrđena je stalna prisutnost pandemijskog soja bakterije uz značajno smanjenje broja oboljelih. Zaključeno je kako je za manji broj oboljelih zaslužno znatno



poboljšanje higijenskih postupaka u fazi distribucije do konzumacije morskih plodova. Ustvrdeno je da je i pohrana na temperaturi manjoj od 10 °C uz primjenu mikrobioloških standarda koji propisuju odsutnost *V. parahaemolyticus* u 25 g kuhanih plodova, odnosno manje od 100 MPN/g morskih plodova namijenjenih za konzumaciju u sirovom obliku, učinkovita (Hara-Kudo i sur., 2012.).

### ***Vibrio vulnificus***

Bakterija *V. vulnificus* je Gram negativan, halofilni štapić, prvi put izdvojen 1964. godine u SAD (Baker-Austin i Oliver, 2018.). U morskoj vodi bakterije *Vibrio* spp. mogu biti slobodne ili pričvršćene na veće i manje planktone te u sedimentu, pri čemu je ustanovljeno da se na većim planktonima (>200 µm) može naći bakterija *V. alginolyticus*, dok je na manjim planktonima (0,45-200 µm) prisutna bakterija *V. vulnificus* (Montanari i sur., 1999.). Prisutnost bakterije *V. vulnificus* dokazana je u uzorcima većeg i manjeg planktona te u uzorcima morske vode, pri čemu je najveća gustoća ustvrđena na uzorcima manjeg planktona tijekom ljetnih mjeseci (Maugeri i sur., 2006.).

Izolati bakterije *V. vulnificus* proizvode čitavi niz čimbenika patogenosti, između ostalih to su polisaharidne kapsule, hemolizin, pili tipa IV, različite proteaze (uglavnom serinproteaze), metaloproteaza koju regulira tzv. *Quorum sensing*, koji je učinkovitiji na 25 °C nego na 37 °C, i za kojeg se pretpostavlja da bi mogao biti odgovoran za rane na koži udova jer imaju nižu temperaturu od ostatka tijela (Austin, 2010., Cvetnić, 2013.). Povećane koncentracije serumskog željeza važan su element u patogenezi *V. vulnificus*. Slobodnog željeza u organizmu nema te ga vibriji dobivaju putem siderofora koje se koriste željezom iz transferina ili laktoferina (Cvetnić, 2013.). Bakterija *V. vulnificus* simultano proizvodi fenolat

i hidrosamat siderofore, pri čemu hidrosamat siderofore omogućuju virulentnim sojevima prihvaćanje željeza od visokozasićenog transferina (Linkous i Oliver, 1999.).

Infekcija s *V. vulnificus* najčešće se pojavljuje kao bakterijska infekcija putem hrane i kao infekcija površinskih rana (Linkous i Oliver, 1999., Baker-Austin i Oliver, 2018.). Infekcija s *V. vulnificus* biogrupa 1, može prouzročiti septikemiju u imunokompromitiranih ljudi i onih s povećanim razinama serumskog, slobodnog željeza (obično nakon konzumacije sirovih školjkaša). Osim u vidu primarne septikemije, infekcija može nastati kontaminacijom postojećih rana morskom vodom ili u dodiru s morskim plodovima i ribama. Sojevi *V. vulnificus* biogrupa 2 poznati su kao uzročnici bolesti jegulja, rakova i riba uz napomenu da barem neki od sojeva unutar biogrupe 2 mogu biti patogeni za ljude (Linkous i Oliver, 1999., Austin, 2010., Cvetnić, 2013.). Ova je bakterija odgovorna za više od 95 % smrtnih slučajeva povezanih s morskom hranom u SAD-u, a i dalje su nepoznati mnogi aspekti vezani za biologiju, genom, virulenciju i epidemiologiju uzročnika. Kao poznatu činjenicu autori navode veću učestalost oboljenja u muškaraca (86 %) nego u žena (14 %), a uglavnom se javlja u starijih od 40 godina (Baker-Austin i Oliver, 2018.).

## **Metode za dokazivanje i identifikaciju potencijalno patogenih *Vibrio* spp.**

Postoji niz različitih metoda koje se primjenjuju za dokazivanje prisutnosti potencijalno patogenih *Vibrio* spp. Važeće izdanje norme HRN EN ISO 21872-1:2017 Mikrobiologija u lancu hrane – Horizontalna metoda za određivanje *Vibrio* spp. – 1. Dio: Dokazivanje prisutnosti potencijalno enteropatogenih

*Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae* i *Vibrio vulnificus*, u odnosu na prethodno, uključuje primjenu dvije temperature za inkubaciju bujonskih kultura, čime se poboljšava dokazivanje prisutnosti *V. vulnificus* (Anonymous, 2017.). Krute hranjive podloge koje se koriste za izolaciju bakterija *Vibrio* spp. sadrže različite komponente kojima je svrha inhibicija rasta neželjene mikroflora te poticanje rasta ciljnih mikroorganizama (Harwood i sur., 2004., Anonymous, 2017.). Razvojem metoda za dokazivanje prisutnosti potencijalno patogenih *Vibrio* spp. ustvrđena je važnost tekućeg medija koji se koristi za razrjeđivanje i obogaćivanje uzoraka (Azaña i sur., 1996.). Zahvaljujući rezistenciji bakterije *V. parahaemolyticus* na polimiksin B, razvijen je slani bujon s polimiksinom B, pH vrijednosti 7,4 koji je omogućio postizanje boljih rezultata kada se koristio kao drugi bujon za obogaćenje, jer je smanjio mogućnost razvoja kompetitivne mikroflora (Blanco-Abad i sur., 2009.). Vodič koji je izdao FAO/WHO (2016.) navodi mogućnost primjene različitih metoda dokazivanja i određivanja broja bakterija u odnosu na krajnji cilj koji se želi postići. Tako se za metode dokazivanja navodi da su primjenjive za monitoring i nadziranje izlovnih područja.

Bonnin-Jusserand i sur. (2017.) potvrdili su manjkavost klasičnih mikrobioloških metoda u smislu dugotrajnosti postupaka, manje specifičnosti te ograničenja biokemijske identifikacije, koja često daje krive rezultate zbog velike fenotipske sličnosti različitih *Vibrio* vrsta. Prema istim autorima preporučljivo je uključiti molekularne metode (PCR, qPCR, LAMP), s ciljem smanjenja pogrešne identifikacije, a navode i nedostatak klasične mikrobiološke metode u smislu nemogućnosti dokazivanja patogenosti dobivenih izolata.

Posljednjih desetljeća istraživane su različite metode s ciljem pouzdanije

identifikacije *Vibrio* vrsta. Neki su autori radili na poboljšanju mikrobioloških metoda (Pendru i sur., 2009.), dok je većina radova temeljena na razvoju i primjeni molekularnih tehnika - konvencionalni PCR (Bilung i sur., 2005.), PCR u stvarnom vremenu - RT PCR (Wang i Levin, 2007.), multiplex PCR (Lee i sur., 2003.). U nekim istraživanjima uspoređivani su rezultati kulturnih mikrobioloških metoda i PCR-a, gdje je dokazano da su molekularne tehnike znatno osjetljivije i pouzdanije u dokazu uzročnika (Rosec i sur., 2012.).

## **Vibrio spp. u zemljama Mediterana**

Tijekom zadnjih dvadesetak godina provedena su istraživanja u zemljama mediteranske regije koja su potvrdila prisutnost vibrija u morskoj vodi, školjkašima, sedimentu pa i u otpadnim vodama.

U Hrvatskoj je, a dijelom i u Sloveniji, ranijim istraživanjima duž Jadranskog mora (Izola, Poreč, Limski kanal, Rijeka, Krk, Novigrad, Biograd, Murter, Šibenik-Skradin, Pakoštane i Ston) u različitim uzorcima morske hrane dokazana prisutnost *Vibrio* spp. u 9,3 % od 150 obrađenih uzoraka. Najzastupljenija vrsta bila je *V. parahaemolyticus* u 6,7 % i *V. vulnificus* u 2,7 % obrađenih uzoraka. Pozitivni nalazi bili su utvrđeni na Krku u 20 % uzoraka, Biogradu (14,3 %), Novigradu (8,9 %), Šibeniku-Skradinu (8,3 %), Poreču (5,6 %) i Izoli (4,6 %) (Ivezić-Jakšić, 1986., cit. Mikuš i sur., 2010.). Jakšić i sur. (2002.) navode nalaz *V. parahaemolyticus* u morskoj hrani na tržnicama i u hotelskoj ponudi. Tako je na tržnicama postotak pozitivnih uzoraka varirao od 4 % do 12 %, s najučestalijim brojem dokaza u školjkašima, dok je u uzorcima morske hrane podrijetlom iz hotela taj postotak bio viši, a kretao se od 10 % do 50 %. Čanak i sur. (2018.) u određivanju mikrobiološke populacije u

svježoj ribi (lubin) i školjkašima (dagnje i kamenice) iz južnog Jadrana dokazali su *Vibrio* spp. u pet (33,3 %) od 15 obrađenih uzoraka. *V. cholerae* izdvojen je iz uzoraka crijeva i želuca jednog lubina, a iz četiri uzorka škrga, probavne žlijezde i želuca dagnji i kamenica izdvojen je *V. parahaemolyticus*.

U dagnjama izlovljenima na odobrenim uzgajalištima na talijanskom području Jadranskog mora dokazana je prisutnost bakterija *V. alginolyticus* u 32,2 % uzoraka, *V. vulnificus* u 17,7 % uzorka, *V. cincinnatiensis* u 3,2 % uzoraka te *V. parahaemolyticus*, *V. fluvialis* i *V. cholerae* non O1 u 1,6 % uzoraka (Ripabelli i sur., 1999.). U Jonskom moru (Tarantski zaljev, Mar Piccolo) najčešće je u morskoj vodi i u dagnjama izdvojena vrsta *V. alginolyticus* (Cavallo i Stabili, 2002.). Ottaviani i sur. (2005.) navode da je na odobrenim uzgajalištima dagnji na području Jadranskog mora (središnja Italija) ustvrđena prisutnost bakterije *V. parahaemolyticus*. Rezultati trogodišnjeg istraživanja pojavnosti bakterija *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* i mikroorganizama fekalnog podrijetla u dagnjama u maloprodaji u regiji Puglia, Italija, pokazali su da je od 600 pretraženih uzoraka *V. parahaemolyticus* dokazan u 47 (7,83 %), a *V. vulnificus* u 17 (2,83 %) uzoraka (Normanno i sur., 2006.). Istraživanjima dagnji iz Jadranskog mora na jugu Italije, dokazana je vrsta *V. parahaemolyticus* (Vernocchi i sur., 2007.). U razdoblju od lipnja 2006. godine do lipnja 2007. pretražena su 144 uzorka dagnji iz različitih centara za pročišćavanje na jugu Italije. Od 47 izolata za koje je pretpostavljeno da pripadaju vrsti *V. parahaemolyticus*, potvrđeno je biokemijskom identifikacijom njih 12 (25,5 %), da bi od toga njih 9 (19,1 %) bilo potvrđeno molekularnim tehnikama. Među istraživanim izolatima jedan je izdvojen i dokazan tijekom zimskih mjeseci (Di Pinto i sur., 2008.). Školjkaši podrijetlom iz regija Veneto i Sardinija,

Italija, pretraživani su od svibnja 2011. do kolovoza 2012. godine, *V. parahaemolyticus* je dokazan u 56,7 % uzoraka iz Sardinije te u 27,5 % uzoraka iz Veneta (Suffredini i sur., 2014.).

Prvi dokaz prirodno prisutne bakterije *V. vulnificus* u uzorcima morske vode i školjkašima bio je na području Španjolske u proljeće 1996. (Covadonga i sur., 1998.), dok je prisutnost iste bakterije u kanalizacijskim vodama, školjkašima i morskoj vodi na području Valencije u Španjolskoj dokazana 2009. godine (Canigral i sur., 2009.). Godine 1999. dokazani su slučajevi oboljenja ljudi izravno povezani s konzumacijom školjkaša u Španjolskoj (Galicija). U uzorcima stolice oboljelih ljudi dokazana je prisutnost bakterije *V. parahaemolyticus*, što je ujedno značilo prvu potvrdu prisutnosti tog patogena u morskom okolišu Europe (Lozano-Leon i sur., 2003.).

## Globalno značenje *Vibrio* spp.

Pojava bolesti prouzročenih vibrijima prije je bila ograničena na tropska i suptropska područja, zemlje u razvoju s netretiranim kanalizacijskim vodama te područja u kojima je tradicionalno uvriježena konzumacija sirovih školjkaša i drugih morskih plodova. Svjedoci smo pojave globalnog zatopljenja o čemu se govori u svim sferama ljudskog postojanja. S gledišta sigurnosti hrane i školjkaša kao hrane, globalno zatopljenje i klimatske promjene imaju značajan utjecaj na dinamiku i rasprostranjenost potencijalno patogenih halofilnih vibrija na područja u kojima nisu povijesno dokazani kao uzročnici bolesti u ljudi.

Korištenjem dugoročnih podataka o površinskoj temperaturi Baltičkog mora, ustvrđeno je dotad nezabilježeno povećanje temperature od 0,063 do 0,078 °C godišnje, što na stoljetnom nivou iznosi 6,3 do 7,8 °C. Navedeno zagrijavanje podudara se s neočekivanim pojavama



infekcija s *Vibrio* spp. na sjeveru Europe, ponajprije na području uz Baltičko more, pri čemu brojevi i distribucija slučajeva korespondiraju s prostornim i vremenskim pikovima površinske temperature mora. To je jedan od prvih dokaza da antropogena promjena klime dovodi od pojave infekcija s *Vibrio* spp. u umjerenim područjima kroz utjecaj na rezidentne bakterijske zajednice, implicirajući da taj proces utječe na preoblikovanje distribucije zaraznih bolesti na globalnoj razini (Baker-Austin i sur., 2012.). Ustanovljeno je i povećanje učestalosti pojave masovnih uginuća morskih životinja (Le Roux i sur., 2015.).

Do 2015. godine, EFSA-ina godišnja izvješća nisu razlučivala *Vibrio* vrste kao pojedinačne uzročnike bolesti u ljudi, već su ih svrstavali u kategoriju "ostalih bakterijskih uzročnika", da bi u izvješću za 2015. godinu evidentirali četiri epidemije u Francuskoj s 29 oboljelih osoba (EFSA/ECDC, 2016.). Na području Švedske i Finske 2014. godine zabilježeno je 89 slučajeva infekcije *Vibrio* vrstama što je značajno više u odnosu na dotad prijavljene slučajeve u sjevernoj Europi. Pojava infekcije vezana je uz neuobičajeno povišene temperature mora u srpnju i kolovozu, kad je evidentirana temperatura bila nekoliko stupnjeva viša od prethodno najviših temperatura evidentiranih ranih 1980-ih godina (Baker-Austin i sur., 2016.). Četiri su važne značajke pripadnika roda *Vibrio* koje ih čine pogodnim za korištenje kao "barometar" klimatskih promjena. To su: osjetljivost na temperaturu (svi pripadnici roda jako dobro rastu pri temperaturama iznad 15 °C), brzo umnažanje (u povoljnim uvjetima vrijeme umnažanja je 8 do 9 minuta), pojava u područjima gdje prije nisu bili dokazani (pojava bolesti u područjima koja povijesno nisu povezana s *Vibrio* infekcijama, kao što su sjeverna Europa, Aljaska, Čile, sjeveroistočno područje SAD). Posebnost vibrija je i u činjenici da imaju više mogućnosti

ulazaka u organizam putem hrane, ali i izlaganjem kontaminiranoj vodi (Baker-Austin i sur., 2017.).

Prema Europskoj agenciji za okoliš globalno povišenje površinske temperature mora je jedan od najvažnijih fizikalnih pokazatelja promjene klime. Povećanje površinske temperature mora na području Europe raste 4-7 puta brže tijekom zadnjih desetljeća u odnosu na svjetske oceane. To povećanje je povezano s pojavom bolesti u ljudi prouzročenih s *V. cholerae* non-O1 non-O139, *V. parahaemolyticus* i *V. vulnificus*.

## Literatura

1. Anon. (2004): UREDBA (EZ) br. 853/2004 EUROPSKOG PARLAMENTA I VIJEĆA od 29. travnja 2004. o utvrđivanju određenih higijenskih pravila za hranu životinjskog podrijetla. SL L 139, 30.04.2004., str. 55.
2. Anon. (2005): UREDBA KOMISIJE (EZ) br. 2073/2005 od 15. studenog 2005. o mikrobiološkim kriterijima za hranu (Tekst značajan za EGP). SL L 338, 22.12.2005., str. 1.
3. Anon. (2021): Plan praćenja kakvoće mora i školjkaša na proizvodnim područjima i područjima za ponovno polaganje živih školjkaša. <http://veterinarstvo.hr/default.aspx?id=124>
4. Anon. (2017): HRN EN ISO 21872-1:2017, Mikrobiologija u lancu hrane – Horizontalna metoda za određivanje *Vibrio* spp. – 1. Dio: Dokazivanje prisutnosti potencijalno enteropatogenih *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae* i *Vibrio vulnificus*, Hrvatski zavod za norme.
5. AUSTIN, B. (2010): Vibrios as causal agents of zoonoses. *Vet. Microbiol.* 140, 310-317.
6. AZANZA, P. V., K. A. BUCKLE and G. H. FLEET (1996): Effect of diluents on enumeration of the *Vibrio vulnificus*. *Inter. J. Food Microb.* 30, 385-390.
7. BAKER-AUSTIN, C., J. A. TRINANES, N. G. H. TAYLOR, RACHELL HARBINELL, ANJA SIITONEN and J. MARTINEZ-URTAZA (2012): Emerging *Vibrio* risk at high latitudes in response to ocean warming. *Nature Climate Change. Letters.* <http://www.nature.com/doi/10.1038/nclimate1628>.
8. BAKER-AUSTIN, C., J. TRINANES, N. GONZALES-ESCALONA and J. MARTINEZ-URTAZA (2017): Non-Cholera Vibrios: The Microbial Barometer of Climate Change. *Trends Microbiol.* 25, 76-84.
9. BAKER-AUSTIN, C., J. TRINANES, S. SALMENLINNA, M. LOFDAHL, A. SIITONEN, N. G. H. TAYLOR and J. MARTINEZ-URTAZA (2016): Heat Wave-Associated Vibriosis, Sweden and Finland, 2014. *Emer. Infect. Dis.* 22, 1216-1220.

10. BAKER-AUSTIN, C. and J. D. OLIVER (2018): *Vibrio vulnificus*: new insights into a deadly opportunistic pathogen. *Environ. Microbiol.* 20, 423-430.
11. BILUNG, L. M., S. RADU, A. R. BAHAMAN, R. A. RAHIM, S. NAPIS, M. W. C. V. LING, G. B. TANIL and M. NISHIBUCHI (2005): Detection of *Vibrio parahaemolyticus* in cockle (*Anadara granosa*) by PCR. *FEMS Microbiol. Letters* 252, 85-88.
12. BLANCO-ABAD, V., J. ASEDE-BERMEJO, A. RODRIGUEZ-CASTRO and J. MARTINEZ-URTAZA (2009): Evaluation of different procedures for optimized detection of *Vibrio parahaemolyticus* in mussels and environmental samples. *Int. J. Food Microbiol.* 129, 229-236.
13. BONNIN-JUSSERAND, M, S. COPIN, C. LE BRIS, T. BRAUGE, M. GAY, A. BRISABOIS, T. GRARD and G. MIDELET-BOURDIN (2017): *Vibrio* species involved in seafood-borne outbreaks (*Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus* and *V. vulnificus*): Review of microbiological versus recent molecular detection methods in seafood products. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 59, 597-610.
14. CANIGRAL, I., Y. MORENO, J. L. ALONSO, A. GONZALEZ and M. A. FERRUS (2009): Detection of *Vibrio vulnificus* in seafood, seawater and wastewater samples from a Mediterranean coastal area. *Microbiol. Res.* 165, 657-664.
15. CAVALLO, R. A. and L. STABILI (2002): Vibrios in seawater and *Mytilus galloprovincialis* from the Mar Piccolo of Taranto (Ionian Sea). *Water Res.* 36, 3719-3726.
16. COLWELL, R. R. (1996): Global Climate and Infectious Disease: The Cholera Paradigm. *Science, New Series*, Vol. 274, No. 5295, 2025-2031.
17. CORDOVA, J. L., J. ASTORGA, W. SILVA and C. RIQUELME (2002): Characterization by PCR of *Vibrio parahaemolyticus* isolats collected during the 1997-1998 Chilean outbreak. *Biolog. Res.* 35, 3-4.
18. COVADONGA R. A., R. AZNAR, M. JESUS PUJALTE and E. GARAY (1998): A Comparison of Strategies for the Detection and Recovery of *Vibrio vulnificus* from Marine Samples o the Western Mediterranean coast. *Syst. Appl. Microbiol.* 21, 128-134.
19. CVETNIĆ, Ž. (2013): Bakterijske i gljivične zoonoze. Medicinska naklada Zagreb i Hrvatski veterinarski institut. Infekcije vrstama iz roda *Vibrio*, 183-187.
20. ČADEŽ V. and E. TESKEREDŽIĆ (2005): Patogeni mikroorganizmi i toksini koje prenose školjkaši iz onečišćenih područja-zoonoze. *Ribarstvo* 63, 135-145.
21. ČANAK, I., K. MARKOV, A. GAVRILOVIĆ, P. BOSANAC, J. JUG-DUJAKOVIĆ, Ž. JAKOPOVIĆ, D. KOSTELAC, J. PLEADIN and J. FRECE (2018): Mikrobiološki i kemijski parametri ribe i školjkaša. *Croat. J. Food Technol. Biot. Nut.* 13, 44-49.
22. DE MAGNY, G. C., P. K. MOZUMDER, C. J. GRIM, N. A. HASAN, M. N. NASER, M. ALAM, B. SACK, A. HUQ and R. R. COLWELL (2011): Role of Zooplankton Diversity in *Vibrio Cholerae* Population Dynamics and in the Incidence of Cholera in the Bangladesh Sundarbans. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 6125-6132.
23. DI PINTO, A., G. CICCARESE, R. DE CORATO, L. NOVELLO and V. TERIO (2008): Detection of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in southern Italian shellfish. *Food Control.* 19, 1037-1041.
24. FAKRUDDIN, M., K. M. A. ALAM, R. M. MAZUMDAR, S. ISLAM, M. N. NIPA, A. IQBAL and H. R. BHUIYAN (2011): Anti-bacterial Activity of the Extract of *Terminalia arjuna* Against Multi Antibiotic Resistant *Vibrio cholerae*. *J. Sci. Res.* 3, 129-137.
25. FAO/WHO (Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization) (2016): Selection and application of methods for the detection and enumeration of human-pathogenic halophilic *Vibrio* spp. in seafood: Guidance. *Microbiological Risk Assessment Series* No. 22. 74 p.
26. FUENZALIDA, L., LORENA ARMIJO, BEATRIZ ZABALA, CRISTINA HERNANDEZ, M. LUISA RIOSECO, C. RIQUELME, R. T. ESPEJO (2007): *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated during investigation of the summer 2006 related diarrhea outbreaks in two regions of Chile. *Int. J. Food Microbiol.* 117, 270-275.
27. GONZÁLEZ-ESCALONA, N., V. CACHICAS, C. ACEVEDO, M. L. RIOSECO, J. A. VERGARA, F. CABELLO, J. ROMERO and R. T. ESPEJO (2005): *Vibrio parahaemolyticus* Diarrhea, Chile, 1998 and 2004. *Emer. Inf. Dis.* 11, 129-131.
28. HALPERN, M. and I. IZHAKI (2017): Fish as host of *Vibrio cholerae*. *Front. Microbiol.* 8, 282.
29. HARRIS, J. B., R. C. LA ROCQUE, F. QADRI, E. T. RYAN and S. B. CALDERWOOD (2012): Cholera. *Lancet*, 379, 2466-2476.
30. HARA-KUDO, Y., S. SAITO, K. OHTSUKA, S. YAMASAKI, S. YAHIRO, T. NISHIO, Y. IWADA, Y. OTOMO, H. KONUMA, H. TANAKA, H. NAKAGAWA, K. SUGIYAMA, Y. SUGITA-KONISHI and S. KUMAGAI (2012): Characteristics of a sharp decrease in *Vibrio parahaemolyticus* infections and seafood contamination in Japan. *Int. J. Food Microbiol.* 157, 95-101.
31. HARWOOD, V. J., J. P. GANDHI and A. C. WRIGHT (2004): Methods for isolation and confirmation of *Vibrio vulnificus* from oysters and environmental sources: a review. *J. Microbiol. Met.* 59, 301-316.
32. HÄSE, C. C. and B. BARQUERA (2001): Role of sodium bioenergetics in *Vibrio cholerae*. *Bioch. Biophys. Acta.* 1505, 169-178.
33. HUQ, A., E. B. SMALL, P. A. WEST, M. I. HUQ, R. RAHMAN and R. R. COLWELL (1983): Ecological Relationships Between *Vibrio cholere* and Planktonic Crustacean Copepods. *Appl. Environ. Microbiol.* 45, 278-283.
34. HUQ, A., B. J. HALEY, E. TAVIANI, A. CHEN, N. A. HASAN and R. R. COLWELL (2013): Detection, Isolation and Identification of *Vibrio cholerae* from the Environment. *National Institute of Health. Curr Protoc Microbiol.*; CHAPTER: Unit6A.5.Doi: 10.1002/9780471729259.mc06a05s26.

35. JAKŠIĆ, S., S. UHITIL, T. PETRAK, D. BAŽULIĆ and L. G. KAROLY (2002): *Vibrio* spp. in sea fish, shrimps and bivalve molluscs from Adriatic Sea. Food Control 13, 491-493.
36. KANEKO, T. and R. R. COLWELL (1973): Ecology of *Vibrio parahaemolyticus* in Chesapeake Bay. J. Bacteriol. 113, 24-32.
37. KANEKO, T. and R. R. COLWELL (1975): Adsorption of *Vibrio parahaemolyticus* onto Chitin and Copepods. Appl. Microbiol. 2, 269-274.
38. KONEMAN, E. W., S. D. ALLEN, W. M. JONDA, P. C. SCHRECKENBERGER and W. C. WINN (2000): Diagnostic Microbiology. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia. Part 2: The Families *Vibrionaceae* and «*Aeromonadaceae*». Pp. 339-348.
39. KRSTULOVIĆ, N. i M. ŠOLIĆ (1997): Mikrobiološko zagađenje mora. Hrvatska vodoprivreda VI, 31-35.
40. LETCHUMANAN, V., C. KOK-GAN and L. LEARN-HAN (2014): *Vibrio parahaemolyticum*: a review on the pathogenesis, prevalence, and advance molecular identification techniques. Front. Microbiol. 5, 705.
41. LEE, C.Y., G. PANCIKER and A. K. BEJ (2003): Detection of pathogenic bacteria in shellfish using multiplex PCR followed by CovaLink™ NH microwell plate sandwich hybridization. J. Microbiol. Met. 53, 199-209.
42. LE ROUX, F., K. M. WEGNER, C. BAKER-AUSTIN, L. VEZZULLI, C. R. OSORIO, C. AMARO, J. M. RITCHIE, T. DEFOIRD, D. DESTOUMIEUX-GARZÓN, M. BLOKESCH et al. (2015): The emergence of *Vibrio* pathogens in Europe: ecology, evolution, and pathogenesis. Front. Microbiol. 6:830.
43. LINKOUS, D. A. and J. D. OLIVER (1999): Pathogenesis of *Vibrio vulnificus*. FEMS Microbiol. Letters. 174, 207-214.
44. LIPP, E. K., A. HUG and R. R. COLWELL (2002): Effects of global climate on infectious disease: The cholera model. Clin. Microbiol. Rev. 15, 757-770.
45. LOZANO-LEON, A., J. TORRES, C. R. OSORIO and J. MARTINEZ-URTAZA (2003): Identification of *tdh*-positive *Vibrio parahaemolyticus* from an outbreak associated with raw oyster consumption in Spain. FEMS Microbiology Letters 226, 281-284.
46. MEAD, P. S., L. SLUTSKER, V. DIETZ, L. F. MCCAIG, J. S. BRESEE, C. SHAPIRO, P. M. GRIFFIN and R. V. TAUXE (1999): Food-related illness and death in the United States. Emerg. Infect. Dis. 5, 607-625.
47. MAUGERI, T. L., M. C., M. T. FERA and C. GUGLIANDOLO (2006): Detection and differentiation of *Vibrio vulnificus* in seawater and plankton of a coastal zone of the Mediterranean Sea. Res. Microbiol. 157, 194-200.
48. MIKUŠ, T., S. UHITIL, A. BENUSSI SKUKAN, B. NJARI i L. KOZAČINSKI (2010): Rizici infekcije s *V. parahaemolyticus* u hrani morskog podrijetla. Meso, 5, 294-298.
49. MONTANARI, M. P., C. PRUZZO, L. PANE and R. R. COLWELL (1999): Vibrios associated with plankton in coastal zone of the Adriatic Sea (Italy). FEMS Microbiol. Ecol. 29, 241-247.
50. MUNDAY, R. and J. REEVE (2013): Risk Assessment of Shellfish Toxins. Toxins (Basel), 5, 2109-2137.
51. NAGLIĆ, T., D. HAJŠIG, J. MADIĆ i LJ. PINTER (2005): Veterinarska mikrobiologija. Specijalna bakteriologija i mikologija. Veterinarski fakultet sveučilišta u Zagrebu, Hrvatsko mikrobiološko društvo. Rod *Vibrio*, 47.
52. NORMANNO, G., A. PARISI, N. ADDANTE, N. C. QUAGLIA, A. DAMBROSIO, C. MONTAGNA and D. CHIOCCO (2006): *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus* and microorganisms of fecal origin in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) sold in the Puglia regio (Italy). Int. J. Food Microbiol. 106, 219-222.
53. OKUDA, J., M. ISHIBASHI, E. HAYAKAWA, T. NISHINO, Y. TAKEDA, A. K. MUKHOPADHYAY, S. GARG, S. K. BHATTACHARYA, G. B. NAIR and M. NISHIBUCHI (1997): 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. 35, 3150-3155.
54. OTTAVIANI, D., S. SANTARELLI, S. BACCHIOCCHI, L. MASINI and C. GHITTINO, I. BACCHIOCCHI (2005): Presence of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* strains in mussels from the Adriatic Sea, Italy. Food Microbiol. 22, 585-590.
55. PENDRU, R., I. KARUNASAGAR and I. KARUNASAGAR (2009): Improved isolation and detection of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* from seafood using a new enrichment broth. Int. J. Food Microbiol. 129, 200-203.
56. RIBARIĆ, B., L. KOZAČINSKI, B. NJARI i Ž. CVRTILA (2012): Toksini školjkaša. Meso, 14, 145-151.
57. RIPABELLI, G., M. L. SAMMARCO, G. M. GRASSO, I. FANELLI, A. CAPRIOLI and I. LUZZI (1999): Occurrence of *Vibrio* and other pathogenic bacteria in *Mytilus galloprovincialis* (mussels) harvested from Adriatic Sea, Italy. Int. J. Food Microbiol. 49, 43-48.
58. RIVERA, I., N., J. CHUN, A. HUQ, B. B. SACK and R. R. COLWELL (2001): Genotypes Associated with Virulence in Environmental Isolates of *Vibrio cholerae*. Appl. Environ. Microbiol. 45, 2421-2429.
59. RUKAVINA, T. (2013): Vibrioni i srodne bakterije. Vibrio. U: Kalenić, S. i sur. Medicinska mikrobiologija. Medicinska naklada, Zagreb. Str. 201-205.
60. ROSEC, J. P., V. CAUSSE, B. CRUZ, J. RAUZIER and L. CARNAT (2012): The international standard ISO/TS 21872-1 to study the occurrence of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio cholerae* in seafood: ITS improvement by use of a chromogenic medium and PCR. Int. J. Food Microbiol. 157, 189-194.
61. SU, Y. C. and C. LIU (2007): Review *Vibrio parahaemolyticus*: A concern of seafood safety. Food Microbiol. 24, 549-558.
62. SUZITA, R., A. S. ABDULAMIR, F. ABU BAKAR and R. SON (2009): A Mini Review: Cholera Outbreak via Shellfish. Amer. J. Inf. Dis. 5, 40-47.

63. SUFFREDINI, E., R. MIONI, R. MAZZETTE, P. BORDIN, P. SERRATORE, F. FOIS, A. PIANO, L. COZZI and L. CROCI (2014): Detection and quantification of *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish from Italian production areas. *Int. J. Food Microbiol.* 184, 14-20.
64. VERNOCCHI, P., M. MAFFEL, R. LANCIOTTI, G. SUZZI and F. GARDINI (2007): Characterization of Mediterranean mussels (*Mytilus galloprovincialis*) harvested in Adriatic Sea (Italy). *Food Control.* 18, 1575-1583.
65. WANG, S. and R. E. LEVIN (2007): Thermal factors influencing detection of *Vibrio vulnificus* using real-time PCR. *J. Microbiol. Met.*, 69, 358-363.
66. WITTMAN R. J. and G. J. FLICK (1995): Microbial contamination of shellfish: Prevalence, risk to human health, and control strategies. *Ann. Rev. Pub. Health* 16, 123-140.
67. YU, W. T., K. J. JONG, Y. R. LIN, S. E. TSAI, Y. H. TEY and H. C. WONG (2013): Prevalence of *Vibrio parahaemolyticus* in oyster and clam culturing environments in Taiwan. *Int. J. Food Microbiol.* 160, 185-192.

## Halophilic vibrios in shellfish as potentially pathogenic causative agents of zoonoses in humans

Natalija DŽAFIĆ, DVM, MSc, Expert Associate, Kristina KVRGIĆ, BSc. Sanit. Ing., Expert Associate, Croatian Veterinary Institute, Veterinary Department Rijeka, Croatia; Lidija KOZAČINSKI, DVM, PhD, Full Professor, Faculty of Veterinary Medicine University of Zagreb, Croatia; Andrea HUMSKI, DVM, PhD, Scientific Advisor, Assistant Professor, Croatian Veterinary Institute, Zagreb, Croatia

Breeding, collection and trade of bivalve molluscs is regulated by a number of laws aimed at placing healthy food on the market. The legislation does not provide for the control of *Vibrio* spp., which may result in the marketing and consumption of bivalve molluscs contaminated with *Vibrio* spp. bacteria, ultimately causing human disease. The significance of the most important potentially pathogenic halophilic vibrios, such as *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* and *V. vulnificus*, in human infection is presented in this paper. Over the last twenty years, research has been conducted in the countries of the Mediterranean region, confirming the presence of vibrios in seawater, shellfish, sediment and wastewater. In Croatia, the presence of *Vibrio* spp. has been proven in rare studies along the Adriatic coast, with the dominance of *V. parahaemolyticus* in shellfish. The increasingly pronounced phenomenon of global warming coincides with the unexpected occurrence of *Vibrio* spp. infections in northern Europe, primarily in the Baltic Sea. Four important features of the members of the genus *Vibrio* make them suitable for assessing climate change. These

are temperature sensitivity (very good growth at temperatures above 15°C); rapid replication; occurrence in areas where they have never occurred (such as northern Europe, Alaska, Chile, northeast USA), and the possibility of entering the body through food consumption and exposure to contaminated water. From the point of view of food and shellfish safety as food, global warming and climate change have a significant impact on the dynamics and distribution of the potentially pathogenic halophilic vibrios in areas where they have not historically been proven to cause human diseases. In recent decades, various methods have been developed with the aim of more reliable identification of *Vibrio* species. The aim was to improve classical microbiological methods, while numerous studies were based on the development and application of molecular techniques. Studies comparing the results of culture microbiological methods and polymerase chain reaction (PCR) have proven to have significantly higher sensitivity and reliability in the detection of pathogens.

**Key words:** *bivalve molluscs; Vibrio spp.; potential pathogens; zoonoses*