

Streszczenie

Vibrio parahaemolyticus to bakterie naturalnie bytujące w środowisku morskim, które jest głównym ich rezerwuarem. Występują w ciepłych wodach u wybrzeży wielu kontynentów, a najwyższy ich poziom stwierdza się w miesiącach letnich. Do zakażenia ludzi dochodzi najczęściej drogą pokarmową, po spożyciu surowych lub poddanych niedostatecznej obróbce termicznej ryb, skorupiaków i mięczaków. Chorobotwórcze *V. parahaemolyticus* powodują przede wszystkim zakażenia przewodu pokarmowego, przebiegające z gwałtowną wodnistą biegunką, nudnościami i bólami brzucha. W zakażeniach o ciężkim przebiegu klinicznym może dochodzić do rozwoju posocznicy i uogólnionego procesu chorobowego, kończącego się niekiedy śmiercią. W krajach azjatyckich i w USA od wielu lat bakterie te uznawane są za jedną z najczęstszych przyczyn zatruc pokarmowych u ludzi. Biorąc pod uwagę obserwowane w ostatnich latach w Europie, w tym również w Polsce, rosnące spożycie żywności pochodzenia morskiego i związany z tym wzrost zatruc pokarmowych na tle *V. parahaemolyticus* w krajach UE, wydaje się uzasadnione podjęcie badań opisanych w obecnej pracy.

W pierwszym etapie określono występowanie *V. parahaemolyticus* w żywności pochodzenia morskiego dostępnej na polskim rynku. Łącznie zbadano 595 próbek, w tym 495 mały blaszkoskrzelnych oraz 100 ryb morskich. Obecność *V. parahaemolyticus*, na podstawie identyfikacji biochemicznej, stwierdzono w 113 (19,0%) próbkach, które następnie poddano identyfikacji molekularnej z wykorzystaniem opracowanych w niniejszej pracy testów PCR opartych na gatunkowo-specyficznych genach *toxR* i *tlh*. Oba te markery zidentyfikowano u 92,0% (104 ze 113) badanych izolatów. Uzyskane wyniki wskazują na duże zróżnicowanie w występowaniu *V. parahaemolyticus* w zależności od rodzaju próbek i miejsca ich pochodzenia. Wykazano również ścisłą korelację między odsetkiem zanieczyszczonych *V. parahaemolyticus* próbek a porą roku, w której były one badane, potwierdzając sezonową zależność występowania tych bakterii w środowisku morskim.

W kolejnym etapie badań przeprowadzono charakterystykę wyizolowanych 104 szczepów *V. parahaemolyticus* pod kątem obecności markerów wirulencji oraz oporności na wybrane czynniki przeciwbakteryjne. W tym celu opracowano i zoptymalizowano testy PCR do identyfikacji genów kodujących wytwarzanie hemolizyn TDH i TRH, odgrywających znaczącą rolę w patogenezie zatruc pokarmowych. Obecność genów *tdh* i *trh* zidentyfikowano odpowiednio u 2,9% i 10,6% badanych *V. parahaemolyticus*. Ponadto, wszystkie izolaty *trh*-

dodatknie posiadały gen *ure*, kodujący wytwarzanie enzymu ureazy. Inny potencjalny czynnik chorobotwórczości – proteaza A, została zidentyfikowana u wszystkich badanych izolatów.

Oznaczając wrażliwość *V. parahaemolyticus* na wybrane czynniki przeciwbakteryjne stwierdzono, że najwięcej izolatów (75,0%) było opornych na ampicylinę oraz streptomycynę (68,3%). Z drugiej strony, wszystkie szczepy były wrażliwe na chloramfenikol i tetracykliny, które są stosowane w leczeniu zakażeń *V. parahaemolyticus* u ludzi. Najwięcej izolatów (55,8%) posiadało profil oporności na dwie klasy antybiotyków, najczęściej na ampicylinę i streptomycynę (46,2%). Tylko jeden izolat *V. parahaemolyticus* był oporny na trzy klasy antybiotyków (ampicylinę, streptomycynę i ciprofloksacynę), a u 12,5% szczepów stwierdzono wrażliwość na wszystkie użyte w badaniu czynniki przeciwbakteryjne.

Przeprowadzona analiza genotypowa 104 szczepów *V. parahaemolyticus* wykazała duże ich zróżnicowanie molekularne. Metodą PFGE wyróżniono 73 grupy klonalne, z których najliczniejsza (PFGE 60) obejmowała 7 izolatów z małży filipińskich i przegrzebków zwyczajnych. Sekwencjonowanie metodą MLST wykazało 76 typów sekwencyjnych, z czego dwa najliczniejsze (ST 481 i ST 1361) obejmowały odpowiednio 5 i 4 izolaty. Ponadto, dla 61,5% badanych *V. parahaemolyticus* zidentyfikowano 48 (63,2%) nowych typów sekwencyjnych, które zostały umieszczone w międzynarodowej bazie PubMLST/*V. parahaemolyticus*.

Wyniki obecnej pracy wskazują, że *V. parahaemolyticus* może występować w żywności pochodzenia morskiego dostępnej w Polsce, szczególnie w miesiącach ciepłych. Niektóre z tych szczepów mogą być chorobotwórcze dla człowieka ze względu na obecność markerów patogenności.

Abstract

Vibrio parahaemolyticus are natural inhabitants of the marine environment which is their main reservoir. These bacteria occur in warm seawaters at coasts of many continents and their highest level is found in the summer months. Human infection occurs usually after eating contaminated food, especially raw or undercooked fish, crustaceans and molluscs. Pathogenic *V. parahaemolyticus* cause mainly gastrointestinal infections which are most often characterized by severe watery diarrhoea, nausea and abdominal cramps. In severe clinical infections septicaemia and generalized disease process can develop and sometimes lead to death. In Asian countries and the USA for many years the bacteria are considered as one of the most common causes of food poisoning in humans. Taking into account increased consumption of food of marine origin in recent years in Europe, including Poland, and associated a significant increase of food poisoning caused by pathogenic *V. parahaemolyticus* in the EU countries, it seems justified to undertake the studies described in the present work.

In the first stage the presence of *V. parahaemolyticus* in food of marine origin available on the Polish market was carried out. A total of 595 samples including 495 of bivalve molluscs and 100 of marine fish were tested. *V. parahaemolyticus* was identified in 113 (19.0%) samples by biochemical tests and then suspected bacterial colonies were confirmed by the developed in this study PCR assays for the species-specific *toxR* and *tlh* genes. Both of these markers were identified in 92.0% (104 of 113) isolates tested. The obtained results show a high diversity in the prevalence of *V. parahaemolyticus* which was correlated with the type of samples and the place of origin. A close relationship between the percentage of *V. parahaemolyticus*-positive samples and the season in which they were tested confirming the seasonal prevalence of these bacteria in the marine environment.

In the next stage of the study characterization of 104 *V. parahaemolyticus* strains was carried out for the presence of virulence factors and their resistance to selected antimicrobials. For this purpose PCR tests for the identification of genes encoding TDH and TRH hemolysins, which play a significant role in the pathogenesis of food poisoning in humans, have been developed and optimized. The *tdh* and *trh* markers were identified in 2.9% and 10.6% of *V. parahaemolyticus* isolates, respectively. In addition, all *trh*-positive isolates possessed the *ure* gene responsible for production of urease enzyme. Moreover, all *V. parahaemolyticus* strains showed protease activity which is another potential pathogenic factor.

Antimicrobial resistance profiling revealed that most isolates were resistant to ampicillin (75.0%) and streptomycin (68.3%). On the other hand, all strains were sensitive to chloramphenicol and tetracyclines used in the treatment of human *V. parahaemolyticus* infection. Most of the isolates (55.8%) showed the resistance against two classes of antimicrobials, mainly to ampicillin and streptomycin (46.2%). Only one *V. parahaemolyticus* isolate was resistant to three antimicrobial classes (ampicillin, streptomycin and ciprofloxacin), and 12.5% isolates were sensitive to all the antimicrobials used in the study.

Genotypic analysis of 104 *V. parahaemolyticus* revealed a high degree of diversity among the isolates tested. The PFGE method distinguished 73 clonal groups and the most numerous group (PFGE 60) consisted of 7 strains isolated from clams and scallops. The sequencing by MLST method showed 76 sequence types (STs) and two (ST 481 and ST 1361) most frequently identified included 5 and 4 isolates, respectively. In addition, for 61.5% *V. parahaemolyticus* isolates 48 (63.2%) of new sequence types were identified and added to the international database PubMLST/*V. parahaemolyticus*.

The results of the present study indicate that *V. parahaemolyticus* may occur in food of marine origin available in Poland, especially during warmer months. Some of these strains may be pathogenic for humans due to the presence of virulence markers.