

Aus dem Institut für Lebensmittelsicherheit und -hygiene
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

**Prävalenz und Charakterisierung
der Antibiotikaresistenz von *Vibrio spp.*
in Shrimps aus dem Einzelhandel
und Aquakulturen Ecuadors**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Lisa Sperling
Tierärztin aus Mainz

Berlin 2017
Journal-Nr.: 3981

**Aus dem Institut für Lebensmittelsicherheit und -hygiene
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin**

**Prävalenz und Charakterisierung der Antibiotikaresistenz
von *Vibrio* spp. in Shrimps aus dem Einzelhandel und
Aquakulturen Ecuadors**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin**

**vorgelegt von
Lisa Sperling
Tierärztin
aus Mainz**

Berlin 2017

Journal-Nr.: 3981

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Thomas Alter
Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Stephan Hühn-Lindenbein
Dritter Gutachter: PD Dr. Bernd-Alois Tenhagen

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

vibrio spp; aquaculture; drug resistance; polymerase chain reaction;
tetracyclines; aminoglycosides (MeSH); beta-lactam antibiotics;
ecuador

Tag der Promotion: 19.12.2017

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <<http://dnb.ddb.de>> abrufbar.

ISBN: 978-3-86387-879-5

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2017

Dissertation, Freie Universität Berlin

D 188

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2018

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

verlag@menschundbuch.de - www.menschundbuch.de

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Tabellenverzeichnis	IV
Abbildungsverzeichnis	VI
Abkürzungsverzeichnis	VII
1 Einleitung	1
2 Schrifttum.....	2
2.1 Produktion, globaler Handel und Konsum von Shrimps.....	2
2.1.1 Shrimps-Produktion	2
2.1.2 Shrimps-Handel	4
2.1.3 Shrimps als Konsumgut.....	5
2.2 Shrimps-Zucht in Ecuador	5
2.2.1 Produktionssysteme	5
2.2.2 Historischer Überblick.....	8
2.2.1.1. Shrimps-Erkrankungen	10
2.2.3 Probiotika	11
2.3 <i>Vibrio</i> spp.....	15
2.3.1 Historie	15
2.3.2 Taxonomie und Charakteristika	16
2.3.3 Ökologie.....	19
2.4 <i>Vibrio</i> spp. in der Shrimps-Zucht.....	20
2.4.1 Humanpathogene <i>Vibrio</i> spp. in der Shrimps-Zucht.....	20
2.4.2 <i>Vibrio</i> spp. als Pathogene in Aquakulturen	25
2.5 Humane <i>Vibrio</i>-Infektionen	26
2.5.1 <i>Vibrio cholerae</i>	29
2.5.2 <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	31
2.5.3 <i>Vibrio vulnificus</i>	33
2.5.4 <i>Vibrio alginolyticus</i>	35
2.5.5 <i>Vibrio mimicus</i>	36
2.6 Virulenzfaktoren humanpathogener <i>Vibrio</i> spp.	36
2.6.1 <i>Vibrio cholerae</i>	36
2.6.2 <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	38
2.6.3 <i>Vibrio vulnificus</i>	39
2.6.4 <i>Vibrio alginolyticus</i>	39
2.6.5 <i>Vibrio mimicus</i>	40
2.7 Zielsetzung der Arbeit.....	41
3 Material.....	42
3.1 Geräte und Instrumente	42
3.2 Verbrauchsmaterial.....	43
3.3 Reagenzien.....	43
3.4 Antibiotika-Testblättchen	44
3.5 Puffer	44
3.6 Nährmedien	45
3.7 Herstellung von Nährmedien	46
3.8 Primer.....	47
3.9 Software	49
4 Methoden.....	50
4.1 Aufbau der Studie	50
4.2 Beprobung.....	50
4.2.1 Probennahme aus dem Einzelhandel	50
4.2.2 Probennahme von Shrimps-Aquakulturen	50
4.3 Speziesidentifizierung	51

4.3.1	Isolierung und biochemische Identifizierung.....	51
4.3.2	Polymerase-Kettenreaktion-Systeme	53
4.3.2.1	DNA-Isolation.....	53
4.3.2.2	Multiplex-Polymerase-Kettenreaktion zur Speziesidentifizierung.....	54
4.4	Molekularbiologische Charakterisierung von <i>V. cholerae</i> und <i>V. parahaemolyticus</i>	56
4.4.1	Codierung von Virulenzgenen	56
4.4.1.1	<i>Vibrio cholerae</i>	56
4.4.1.2	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	57
4.4.2	Serotypisierung.....	58
4.4.2.1	<i>Vibrio cholerae</i>	58
4.4.2.2	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	59
4.4.3	Akutes Hepatopankreatisches Nekrose-Syndrom	60
4.5	Gelelektrophorese.....	61
4.6	Datenerhebung zu Produktions- und Managementfaktoren in Aquakulturen	62
4.7	Antibiotikaresistenz.....	62
4.7.1	Probenauswahl.....	62
4.7.2	Methode und Durchführung.....	62
4.7.3	Begriffserklärungen	64
4.8	Statistische Auswertung.....	64
5	Ergebnisse	66
5.1	Prävalenz von <i>Vibrio</i> spp. in Shrimps aus Ecuador	66
5.1.1	Einzelhandel und Aquakulturen	66
5.1.2	Multiple <i>Vibrio</i> spp.....	66
5.1.3	Einzelhandel	68
5.1.4	Aquakulturen	68
5.1.4.1	Lokale Prävalenz.....	69
5.2	Molekularbiologische Charakterisierung	70
5.2.1	Codierung von Virulenzgenen	70
5.2.1.1	<i>Vibrio cholerae</i>	70
5.2.1.2	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	70
5.2.2	Serotypisierung.....	70
5.2.2.1	<i>Vibrio cholerae</i>	70
5.2.2.2	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	70
5.3	Datenerhebung zu Produktions- und Managementfaktoren in Aquakulturen	71
5.3.1	Einfluss der Produktions- und Managementfaktoren auf das Vorkommen von <i>Vibrio</i> spp.....	72
5.3.2	Einfluss der Larvenzuchtanlage auf das Vorkommen von <i>Vibrio</i> spp.....	74
5.4	Akutes Hepatopankreatisches Nekrose-Syndrom	75
5.5	Antibiotikaresistenz.....	76
5.5.1	Resistenzprofile der untersuchten Isolate	76
5.5.1.1	<i>Vibrio alginolyticus</i>	78
5.5.1.2	<i>Vibrio cholerae</i>	78
5.5.1.3	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	79
5.5.1.4	<i>Vibrio vulnificus</i>	80
5.5.2	Multiresistenzen	81
5.5.2.1	<i>V. alginolyticus</i>	82
5.5.2.2	<i>V. cholerae</i>	82
5.5.2.3	<i>V. parahaemolyticus</i>	82
5.5.2.4	<i>V. vulnificus</i>	83
5.5.3	Verteilung der Resistenzen auf die getesteten Antibiotika.....	83
5.5.3.1	Vorkommen von Antibiotikaresistenzen in Aquakulturen	86
5.5.3.2	Vorkommen von Antibiotikaresistenzen in Probennahmebezirken	87
6	Diskussion	89
6.1	Prävalenz von <i>Vibrio</i> spp. in Shrimps aus Ecuador	89
6.2	Molekularbiologische Charakterisierung	91
6.3	Datenerhebung zu Produktions- und Managementfaktoren in Aquakulturen	92
6.4	Akutes Hepatopankreatisches Nekrose-Syndrom	95
6.5	Antibiotikaresistenz.....	97

7 Schlussfolgerung und Ausblick	107
8 Zusammenfassung.....	108
9 Summary.....	109
10 Literaturverzeichnis	110
11 Anhang	141

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. Produktionssysteme für <i>L. vannamei</i>	7
Tabelle 2. Probiotika in Shrimps-Aquakulturen.....	12
Tabelle 3. Biochemische Charakteristika und Wachstumseigenschaften humanpathogener <i>Vibrio</i> spp.	18
Tabelle 4. Untersuchungen zum Vorkommen von <i>Vibrio</i> spp. in Meeresfrüchten.....	23
Tabelle 5. Infektionsarten pathogener <i>Vibrio</i> spp. beim Menschen.....	28
Tabelle 6. Geräte und Instrumente.....	42
Tabelle 7. Verbrauchsmaterial.....	43
Tabelle 8. Reagenzien.....	43
Tabelle 9. Antibiotika-Testblättchen.....	44
Tabelle 10. 1x Tris-EDTA (TE)-Puffer.....	45
Tabelle 11. 10x Tris Borat EDTA (TBE)-Puffer.....	45
Tabelle 12. Alkalisches Peptonwasser (APW).....	45
Tabelle 13. Chrom-Agar.....	45
Tabelle 14. LB-Medium (Miller).....	45
Tabelle 15. Mueller-Hinton-Agar.....	46
Tabelle 16. Thiosulfat-Zitrat-Gallensalz-Saccharose-Agar (TCBS).....	46
Tabelle 17. Verwendete Primer.....	47
Tabelle 18. Primer-Sequenzen der PCR nach Di Pinto <i>et al.</i> (2005) und Tarr <i>et al.</i> (2007).....	54
Tabelle 19. Primer-Konzentrationen und Fragmentgrößen der PCR nach Di Pinto <i>et al.</i> (2005) und Tarr <i>et al.</i> (2007).....	54
Tabelle 20. Primer-Sequenzen der PCR nach Di Pinto <i>et al.</i> (2005) und Bauer und Rørvik (2007).....	55
Tabelle 21. Primer-Konzentrationen und Fragmentgrößen der PCR nach Di Pinto <i>et al.</i> (2005) und Bauer und Rørvik (2007).....	55
Tabelle 22. Primer-Sequenzen der PCR nach Nandi <i>et al.</i> (2000).....	57
Tabelle 23. Primer-Konzentrationen und Fragmentgrößen der PCR nach Nandi <i>et al.</i> (2000).....	57
Tabelle 24. Primer-Sequenzen der PCR nach Hossain <i>et al.</i> (2012) und Hossain <i>et al.</i> (2013).....	57
Tabelle 25. Primer-Konzentrationen und Fragmentgrößen der PCR nach Hossain <i>et al.</i> (2012) und Hossain <i>et al.</i> (2013).....	58
Tabelle 26. Primer-Sequenzen der PCR nach Rivera <i>et al.</i> (2003).....	58
Tabelle 27. Primer-Konzentrationen und Fragmentgrößen der PCR nach Rivera <i>et al.</i> (2003).....	59
Tabelle 28. Primer-Sequenzen der PCR nach Chen <i>et al.</i> (2012).....	59
Tabelle 29. Primer-Konzentrationen und Fragmentgrößen der PCR nach Chen <i>et al.</i> (2012).....	60
Tabelle 30. Primer-Sequenzen der PCR nach Flegel und Lo (2014).....	61
Tabelle 31. Primer-Konzentrationen und Fragmentgrößen der PCR nach Flegel und Lo (2014).....	61
Tabelle 32. Für den Agardiffusionstest verwendete Antibiotika-Testblättchen und Hemmhofgrenzwerte (mm).....	63
Tabelle 33. Prävalenz von <i>Vibrio</i> spp. in Shrimps aus dem Einzelhandel und Aquakulturen.....	66
Tabelle 34. Prävalenz multipler <i>Vibrio</i> spp. in Proben aus dem Einzelhandel und Aquakulturen.....	66
Tabelle 35. Multiple <i>Vibrio</i> spp. in Proben aus dem Einzelhandel und Aquakulturen.....	67
Tabelle 36. Multiple <i>Vibrio</i> spp. in Proben aus dem Einzelhandel.....	67
Tabelle 37. Multiple <i>Vibrio</i> spp. in Proben aus Aquakulturen.....	67
Tabelle 38. Prävalenz von <i>Vibrio</i> spp. in Shrimps aus dem Einzelhandel nach Herkunft.....	68
Tabelle 39. Prävalenz von <i>Vibrio</i> spp. in Shrimps aus Aquakulturen.....	69
Tabelle 40. Serogruppen der <i>V. parahaemolyticus</i> -Isolate.....	71
Tabelle 41. Produktions- und Managementfaktoren der untersuchten Aquakulturen.....	72
Tabelle 42. Einfluss verschiedener Produktions- und Managementfaktoren auf das Vorkommen von <i>Vibrio</i> spp.....	73
Tabelle 43. Resistenzprofil der <i>V. alginolyticus</i> -Isolate (n = 67).....	78
Tabelle 44. Resistenzprofil der <i>V. cholerae</i> -Isolate (n = 16).....	79
Tabelle 45. Resistenzprofil der <i>V. parahaemolyticus</i> -Isolate (n = 154).....	80
Tabelle 46. Resistenzprofil der <i>V. vulnificus</i> -Isolate (n = 8).....	81
Tabelle 47. Vorkommen von Multiresistenzen.....	81
Tabelle 48. Vorkommen multiresistenter Isolate von <i>V. alginolyticus</i> , <i>V. cholerae</i> , <i>V. parahaemolyticus</i> und <i>V. vulnificus</i>	82

Tabelle 49. Antibiotika-Kombinationen multiresistenter Isolate84

Tabelle 50. Detektierte Antibiotikaresistenzen in *Vibrio* spp. innerhalb der Aquakulturen86

Tabelle 51. Detektierte Antibiotikaresistenzen in *Vibrio* spp. innerhalb der Probennahmebezirke87

Tabelle 52. Einfluss verschiedener Produktions- und Managementfaktoren auf das Vorkommen von *Vibrio alginolyticus* 143

Tabelle 53. Einfluss verschiedener Produktions- und Managementfaktoren auf das Vorkommen von *Vibrio cholerae*..... 143

Tabelle 54. Einfluss verschiedener Produktions- und Managementfaktoren auf das Vorkommen von *Vibrio parahaemolyticus*..... 143

Tabelle 55. Einfluss verschiedener Produktions- und Managementfaktoren auf das Vorkommen von *Vibrio vulnificus*..... 144

Tabelle 56. Antibiotika-Kombinationen der Isolate mit zwei Resistenzen 145

Tabelle 57. Antibiotika-Kombinationen der Isolate mit drei Resistenzen 145

Tabelle 58. Antibiotika-Kombinationen der Isolate mit vier Resistenzen 146

Tabelle 59. Antibiotika-Kombinationen der Isolate mit fünf Resistenzen 146

Tabelle 60. Antibiotika-Kombinationen der Isolate mit sechs Resistenzen 147

Tabelle 61. Antibiotika-Kombinationen der Isolate mit sieben Resistenzen 147

Tabelle 62. Antibiotika-Kombinationen der Isolate mit acht Resistenzen 148

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Weltweite Shrimps-Produktion	3
Abbildung 2. Produktionszyklus von <i>L. vannamei</i>	6
Abbildung 3. Küstenprovinzen Ecuadors	8
Abbildung 4. Produktion von <i>L. vannamei</i> in Ecuador.....	10
Abbildung 5. Orte der Probennahme in den Provinzen Guayas und El Oro	51
Abbildung 6. Fließschema zur konventionellen Isolierung von <i>Vibrio</i> spp.....	52
Abbildung 7. Prävalenz von <i>Vibrio</i> spp. nach Probennahmebezirken	69
Abbildung 8. Prävalenz von <i>Vibrio</i> spp. in Shrimps aus verschiedenen Larvenzuchtanlagen	75
Abbildung 9. Anteil resistenter und intermediärer Isolate	77
Abbildung 10. Verteilung der Antibiotikaresistenzen aller Spezies auf die getesteten Antibiotika	85
Abbildung 11. Detektierte Antibiotikaresistenzen in Bezirken.....	88

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AHPNS	Akutes Hepatopankreatisches Nekrose-Syndrom (engl. Acute Hepatopancreatic Necrosis Syndrome)
APAT	Ampicillin, Piperacillin, Amikacin, Tetracyclin
APW	Alkalisches Peptonwasser
Aqua dest.	Aqua destillata
ASC	Aquaculture Stewardship Council
<i>B.</i>	<i>Bacillus</i>
bp	Basenpaare
bzw.	Beziehungsweise
ca.	Circa
CDC	Zentren für Krankheitskontrolle und Prävention (engl. Centers for Disease Control and Prevention)
CTX	Choleratoxin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EMS	Frühsterblichkeits-Syndrom (engl. Early Mortality Syndrome)
<i>E.</i>	<i>Enterococcus</i>
<i>et al.</i>	Und andere (latein. et alii)
EU	Europäische Union
EUMOFA	Europäische Marktbeobachtungsstelle für Fischerei- und Aquakulturerzeugnisse (engl. European Market Observatory for Fisheries and Aquaculture Products)
FAO	Ernährungs- und Landwirtschaftsorganisation der Vereinten Nationen (engl. Food and Agriculture Organization)
ha	Hektar
IHNV	Infektiöses Hämatopoetisches Nekrose Virus (engl. Infectious Hematopoietic Necrosis Virus)
incl.	Inklusive
INP	Nationales Institut für Fischerei (span. Instituto Nacional de Pesca)
ISO	Internationale Organisation für Normung (engl. International Organization for Standardization)
KBE	Kolonie bildende Einheiten
<i>L. vannamei</i>	<i>Litopenaeus vannamei</i>
LB-Medium	Lysogeny broth
LPS	Lipopolysaccharid
<i>M. rosenbergii</i>	<i>Macrobrachium rosenbergii</i>
MALDI	Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation (engl. Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization)
MEF	Ministerium für Ökonomie und Finanzen Perus (span. Ministerio de Economía y Finanzas del Perú)
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MHLW	Ministerium für Gesundheit, Arbeit und Soziales, Japan (engl. Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan)
mPCR	Multiplex Polymerase-Kettenreaktion (engl. Multiplex Polymerase Chain Reaction)

Abkürzungsverzeichnis

NACA	Netzwerk der Aquakulturzentren im Asien-Pazifik-Raum (engl. Network of Aquaculture Centres in Asia-Pacific)
NaCl	Natriumchlorid
NOAA	Wetter und Ozeanografiebehörde (engl. National Oceanic and Atmospheric Administration)
OIE	Weltorganisation für Tiergesundheit (franz. Office International des Épizooties)
OMV	Oncorhynchus Masou Virus
<i>P. chinesiensis</i>	<i>Penaeus chinesiensis</i>
<i>P. monodon</i>	<i>Penaeus monodon</i>
<i>P. stylirostris</i>	<i>Penaeus stylirostris</i>
PAHO	Panamerikanischen Organisation für Gesundheit (engl. Pan-American Health Organization)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl. Polymerase Chain Reaction)
pH	Pondus Hydrogenii
PL	Postlarven
ppt	Promille
RKI	Robert Koch Institut
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl. Rounds Per Minute)
sp.	Spezies (Singular)
SPF	spezifisch pathogenfrei
spp.	Spezies (Plural)
SPR	spezifisch pathogenresistent
T3SS	Typ III-Sekretionssystem
T6SS	Typ VI-Sekretionssystem
Tab.	Tabelle
TBE-Puffer	Tris Borat EDTA-Puffer
TCBS	Thiosulfat-Zitrat-Gallensalz-Saccharose-Agar
TCP	Toxin koregulierter Pilus
TDH	Thermostabiles direktes Hämolyisin
TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer
TFS	The Fish Site
TLH	Thermolabiles Hämolyisin
TRH	TDH-verwandtes Hämolyisin (engl. TDH related haemolysin)
Tris	Tri (hydroxymethyl)-aminomethan
TSV	Taura Syndrom Virus
u. a.	Unter anderem
USA	Vereinigte Staaten von Amerika (engl. United States of America)
<i>V.</i>	<i>Vibrio</i>
v. a.	Vor allem
<i>V. a.</i>	<i>Vibrio alginolyticus</i>
<i>V. c.</i>	<i>Vibrio cholerae</i>
<i>V. m.</i>	<i>Vibrio mimicus</i>
<i>V. o.</i>	<i>Vibrio orientalis</i>
<i>V. p.</i>	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
<i>V. v.</i>	<i>Vibrio vulnificus</i>
VBNC	Lebend aber nicht kultivierbar (engl. Viable but Non-Culturable)

WHO	Weltgesundheitsorganisation (engl. World Health Organization)
WSSV	Weißpünktchenkrankheit (engl. White Spot Syndrome Virus)
z. B.	Zum Beispiel
z. T.	Zum Teil

1 Einleitung

Bei *Vibrio* (*V.*) Spezies (*spp.*) handelt es sich um gram-negative Bakterien, die ubiquitär in der marinen Umwelt verbreitet sind. Es sind zwölf humanpathogene *Vibrio* spp. beschrieben, die durch den Verzehr kontaminierter Lebensmittel oder durch Wundkontakt mit der erregerrhaltigen marinen Umwelt zu Infektionen führen können (Alter 2012). *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* und *V. vulnificus* gelten als die bedeutendsten Erreger.

V. parahaemolyticus und *V. vulnificus* sind eine Hauptursache von bakteriellen Infektionen, die mit Meeresfrüchten assoziiert sind, und treten regelmäßig in Asien, den Vereinigten Staaten von Amerika (USA) und Lateinamerika auf (Baker-Austin *et al.* 2010; Raszl *et al.* 2016). In vielen asiatischen Ländern, darunter China (31 %) und Japan (20-30 %), ist *V. parahaemolyticus* für einen großen Teil aller Lebensmittel-assoziierten Infektionen verantwortlich (Liu *et al.* 2004; MHLW 2009; Karunasagar *et al.* 2013). In den USA stellt *V. parahaemolyticus* die häufigste Ursache (23,9 %) von mit Meeresfrüchten assoziierten Infektionen dar (Iwamoto *et al.* 2010; Letchumanan *et al.* 2014). In Lateinamerika auftretende *V. parahaemolyticus*-Infektionen konzentrieren sich v. a. an der Pazifikküste (Raszl *et al.* 2016). Ausbrüche wurden u. a. in Chile (1997-1998 > 300 Fälle, 2004 > 1.500 Fälle, 2005 > 10.000 Fälle), Mexiko (2004 > 1.200 Fälle), Peru (1998 > 20 Fälle) und Brasilien (2001-2002 > 10 Fälle) dokumentiert (Heitmann *et al.* 2005; Cabanillas-Beltran *et al.* 2006; Gil *et al.* 2007; Leal *et al.* 2008). In Europa wurden sporadisch auftretende Ausbrüche beschrieben. Dazu zählten Ausbrüche in Großbritannien (1973, 12 Fälle), Frankreich (1997, 44 Fälle), Spanien (1999, 64 Fälle) und Italien (2010, 4 Fälle) (Hooper *et al.* 1974; Lemoine *et al.* 1999; Lozano-Leon *et al.* 2003; Ottaviani *et al.* 2012). Für *V. vulnificus* werden geringere Fallzahlen registriert (in den USA ca. 40 Fälle pro Jahr), jedoch zeigen *V. vulnificus*-Infektionen zu einem deutlich höheren Anteil einen letalen Verlauf (> 50 % bei primären Septikämien) (Jones und Oliver 2009; Baker-Austin *et al.* 2010). In Japan wurden von 1998-2003 94 Fälle von *V. vulnificus*-Infektionen mit 68 Toten registriert (Miyasaka *et al.* 2006). In Lateinamerika treten *V. vulnificus*-Infektionen verstärkt an der Atlantikküste auf (Raszl *et al.* 2016). Es sind Fallbeschreibungen aus Peru, Uruguay, Chile, Brasilien und Ecuador bekannt (Ibarra Trujillo *et al.* 1999; Chicheff Pérez *et al.* 2001; Poblete *et al.* 2002; Franca *et al.* 2013; Villacrés *et al.* 2013). Cholera, die durch Toxin-produzierende *V. cholerae*-Stämme ausgelöst wird, führt jährlich zu mehreren hunderttausend Infektionen mit tausenden Toten (317.534 Fälle und 7.543 Tote 2010), die überwiegend in Afrika und Asien auftreten (WHO 2011a). Aufgrund einer hohen Dunkelziffer wird die tatsächliche Fallzahl auf 3-5 Millionen Erkrankungen und 100.000-130.000 Tote pro Jahr geschätzt (WHO 2010).

Ecuador zählt zu den sechs größten Shrimps-Produzenten weltweit und ist der größte Produzent von Shrimps aus Aquakulturen auf dem amerikanischen Kontinent (Anderson und Valderrama 2013; FAO 2015b). Der überwiegende Teil (ca. 99 %) der jährlichen Produktion (> 300.000 Tonnen) stammt aus Aquakulturen (FAO 2011-2014; Anderson *et al.* 2014). Nahezu die gesamte Produktion ist für den Export bestimmt (FAO 2011-2014) und zeigt bei zunehmendem Wachstum, neben dem amerikanischen Markt (15 %), immer höhere Anteile auf den europäischen (11 %) und asiatischen Märkten (China 10 %) (Anderson *et al.* 2014; FAO 2014c). Von 2008 bis 2013 war Ecuador der Hauptlieferant von Shrimps in die Europäische Union (EU) (FAO 2014c). Zur Prävalenz von humanpathogenen *Vibrio* spp. in Shrimps aus Ecuador existieren nur wenige Studien und ebenso ist kaum etwas zu den Antibiotikaresistenzen von entsprechenden

Vibrio spp.-Stämmen bekannt. Untersuchungen zum Vorkommen humanpathogener *Vibrio* spp. in Meeresfrüchten sind jedoch essenziell zur Einschätzung des humanen Infektionsrisikos.

Das Ziel dieser Arbeit war es, grundlegende Daten zum Vorkommen von potentiell humanpathogenen *Vibrio* spp. in Shrimps aus Ecuador zu ermitteln. Über Probenahmen auf lokalen Märkten und von Shrimps-Aquakulturen wurde die Verbreitung von fünf *Vibrio* spp. (*V. alginolyticus*, *V. cholerae*, *V. mimicus*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*) in Shrimps untersucht. Durch Serotypisierungen und Untersuchungen zum Vorkommen von Virulenz-codierenden Genen wurden Isolate von *V. cholerae* und *V. parahaemolyticus* näher charakterisiert. Isolate aller Spezies wurden auf ihre Sensibilität gegenüber 22 Antibiotika aus sechs Stoffgruppen hin untersucht. Das seit 2009 in Asien auftretende Akute Hepatopankreatische Nekrose-Syndrom (AHPNS) oder auch Early Mortality Syndrome (EMS) wurde mit seinem Ausbruch in Mexiko (2013) erstmals auf dem amerikanischen Kontinent nachgewiesen (Nunan *et al.* 2014). Eine Untersuchung zum Vorhandensein des Plasmids, welches die Toxin-codierenden Gene enthält, die für das Auslösen der neuartigen Erkrankung von Shrimps verantwortlich gemacht werden, erfolgte für *V. parahaemolyticus*-Isolate (Flegel und Lo 2014).

2 Schrifttum

2.1 Produktion, globaler Handel und Konsum von Shrimps

2.1.1 Shrimps-Produktion

Die globale Produktion von Shrimps setzt sich aus Wildfängen und kultivierten Shrimps zusammen (Lem 2006). Wildfänge unterteilen sich in Kaltwasser- und Warmwasser-Shrimps. Bei Aquakultur-Shrimps handelt es sich hingegen ausschließlich um Warmwasser-Shrimps (Anderson *et al.* 2003). Bis Mitte der 1980er Jahre dominierten die Wildfänge die globale Shrimps-Produktion deutlich, der Anteil der Aquakulturen betrug unter 10 % (FAO 2015b; FAO 2015c). Die Produktionsmenge an kultivierten Shrimps belief sich 1985 weltweit auf etwa 200.000 Tonnen mit einem Warenwert von ca. 1 Milliarde US-Dollar (FAO 2015b). Im Verlauf der letzten drei Jahrzehnte ist der Anteil kultivierter Shrimps jedoch stark gestiegen (Abb. 1). Im Jahr 2002 lag die Produktion bei nahezu 1,5 Millionen Tonnen und einem Wert von fast 8 Milliarden US-Dollar. Der Anteil an der weltweiten Shrimps-Produktion betrug 34 % (FAO 2008b). Bis 2006 erfolgte eine Verdopplung der Produktionsmenge auf 3,1 Millionen Tonnen und seit 2008 dominierten Aquakultur-Shrimps die globale Shrimps-Produktion mit einem Anteil von über 50 % (FAO 2008b; FAO 2014d).

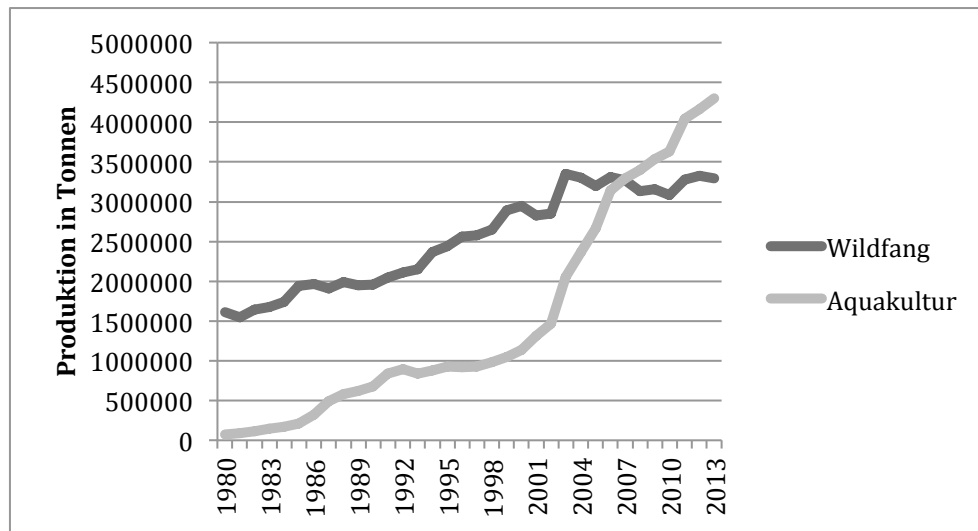


Abbildung 1. Weltweite Shrimps-Produktion

Weltweite Produktion von Shrimps aus Wildfängen und Aquakulturen von 1980 bis 2013
 Quelle: FAO (2015b); FAO (2015c)

Der Wildfang von Shrimps wies in den letzten drei Jahrzehnten keine vergleichbare Veränderung auf (Anderson *et al.* 2003). Es zeigte sich auch hier ein kontinuierliches Wachstum, jedoch verlief die Produktionssteigerung weniger steil als bei Aquakultur-Shrimps (Abb. 1). Eine Verdoppelung der Produktionsmenge von 1980 (1,6 Millionen Tonnen) wurde 2003 (3,3 Millionen) erreicht. Die Fangquote zeigte seit dem Erreichen des Höchstwertes von 3,3 Millionen Tonnen, eine stabile Produktionsmenge zwischen 3,1 und 3,3 Millionen Tonnen (FAO 2015c). Zu den größten Produzenten wildgefangener Shrimps zählten für den Zeitraum von 2000 bis 2015 China, Indien, Indonesien, Grönland und die USA (FAO 2015c).

Die größten Produktionsregionen für Aquakultur-Shrimps sind Asien und Lateinamerika (Anderson *et al.* 2014). Zu den fünf größten Shrimps-Produzenten in Asien zählen China, Thailand, Vietnam, Indonesien und Indien. In Lateinamerika führend sind Ecuador, Mexiko, Brasilien, Honduras und Nicaragua. Für die globale Produktion kultivierter Shrimps wird auch weiterhin ein kontinuierliches Wachstum mit jährlichen Zuwachsraten von ca. 8 % vorausgesagt (Anderson *et al.* 2014). Es zeigte sich jedoch für Aquakultur-Shrimps bereits mehrfach, dass Produktionsrückgänge, bedingt durch Krankheiten, die sich regional oder auch global schnell verbreiteten, zu starken Schwankungen auf dem Shrimps-Markt führten (Lem 2006; Karunasagar und Ababouch 2012). Beispielsweise 2013, als das Auftreten des Akuten Hepatopankreatischen Nekrose-Syndroms in Mexiko und verschiedenen asiatischen Ländern zu einem Rückgang der weltweiten Produktion von Aquakultur-Shrimps um 19,3 % gegenüber dem Vorjahr, führte (Anderson *et al.* 2014). In der Vergangenheit waren es häufig Viruserkrankungen wie White Spot Syndrom, Taura Syndrom oder Yellow Head Disease, die zu hohen Produktionsrückgängen führten (Karunasagar und Ababouch 2012).

Die weltweit am häufigsten gezüchteten Shrimps-Spezies sind *Litopenaeus (L.) vannamei* (Whiteleg Shrimp) und *Penaeus (P.) monodon* (Giant Tiger Prawn) (Lem 2006). Wildbestände von *L. vannamei* kommen natürlicherweise vor der Westküste Süd- und Mittelamerikas, von Peru bis Mexiko, vor und sind die bevorzugt gezüchtete Shrimps-Spezies in dieser Region. Ihre kommerzielle Nutzung im asiatischen Raum begann 1996 in China und Taiwan sowie anschließend (2000-2001) auch auf den Philippinen, in

Indonesien, Vietnam, Thailand, Malaysia und Indien (FAO 2004). Die starke Zunahme der *L. vannamei*-Produktion in China, Thailand und Indonesien war zu einem großen Teil für das starke Wachstum der weltweiten Produktion an Krustentieren verantwortlich, die in den Jahren von 2000 bis 2008 eine jährliche Wachstumsrate von 15 % aufwies (FAO 2010; Bondad-Reantaso *et al.* 2012). Im Jahr 2012 betrug der Anteil von *L. vannamei* an der weltweiten Shrimps-Produktion 42 %, auf *P. monodon* entfielen 14 % (FAO 2014c). Verantwortlich für den Wechsel von den ursprünglich in Asien überwiegend gezüchteten Spezies *P. chinensis* (China) und *P. monodon* (ganz Asien), hin zu *L. vannamei*, waren schlechte Leistung, langsames Größenwachstum und eine Anfälligkeit für Krankheiten (FAO 2004). *L. vannamei* zeichnet sich gegenüber *P. monodon* u. a. durch ein schnelleres Größenwachstum, eine höhere Toleranz gegenüber niedrigen Salzgehalten und niedrigen Temperaturen, eine bessere Futtermittelverwertung sowie eine geringere Krankheitsanfälligkeit aus (Bondad-Reantaso *et al.* 2012).

2.1.2 Shrimps-Handel

Meeresfrüchte zählen weltweit zu den meist gehandelten Lebensmittelerzeugnissen (FAO 2012). In Bezug auf den Handelswert sind Shrimps das wichtigste international gehandelte Fischereierzeugnis und die wertvollste in Aquakultur produzierte Spezies (FAO 2008a; Asche und Bjørndal 2011). Für die produzierenden Staaten, überwiegend Entwicklungsländer, ist das Generieren von Exportgütern mit einem hohen Handelswert entscheidend für ihre wirtschaftliche Entwicklung und Unabhängigkeit. Zugleich leistet die Shrimps-Produktion einen zunehmenden Beitrag zur Versorgung der Industriestaaten mit Meeresfrüchten (Bondad-Reantaso *et al.* 2012; Stentiford *et al.* 2012).

Die Nachfrage nach Shrimps ist steigend (Norhana *et al.* 2010) und der internationale Handel wächst (FAO 2014a). Diese Entwicklung spiegelte sich in den weltweiten Exportzahlen von Shrimps wider, die von etwa 400.000 Tonnen im Jahr 1980 auf 2,7 Millionen Tonnen im Jahr 2011 anstiegen (FAO 2015a). Der starke Anstieg der Exportvolumina stand in Zusammenhang mit der großen Zunahme der globalen Shrimps-Produktion (Abb. 1), die zum überwiegenden Teil auf die Zunahme der Produktion von Aquakultur-Shrimps zurückzuführen war (Norhana *et al.* 2010).

Im Jahr 2008 betrug die weltweite Shrimps-Produktion 6,5 Millionen Tonnen, davon stammten 3,4 Millionen Tonnen aus Aquakulturen und 3,1 Millionen Tonnen aus Wildfängen (FAO 2015b; FAO 2015c). Etwa 60 % der Gesamtproduktion wurden international und 40 % wurden national gehandelt (FAO 2008a). Da die weltweite Produktion an Aquakultur-Shrimps stark exportorientiert ist (Lem 2006), wird angenommen, dass mehr als 80 % aller gezüchteten Shrimps exportiert werden. Ihr Anteil am Handelswert international gehandelter Shrimps beträgt damit etwa 60 % (Anderson *et al.* 2003). Trotz genauer Daten zur weltweiten Produktionsmenge von Shrimps aus Aquakulturen und Wildfängen beruhen die Daten zur Herkunft der international gehandelten Shrimps auf Schätzungen, da die Handelsstatistiken die Produktionsform nicht berücksichtigen (Lem 2006).

Die wichtigsten Märkte für den internationalen Handel sind die USA, Japan und Staaten der Europäischen Union. Das gemeinsame Importvolumen dieser Länder machte von 1976 bis 2011 76-88 % der weltweit gehandelten Shrimps aus (FAO 2015a). Auf dem japanischen Markt dominierten im Zeitraum von 2008 bis 2013 Importe aus Vietnam, Indonesien, Thailand, Indien und China. Im selben Zeitraum stammte in den USA ein Großteil der Importe aus Thailand, Indonesien, Ecuador, Vietnam und China. Für den europäischen Markt war von 2008 bis 2013 Ecuador der größte Exporteur. Zu den fünf

größten Exporteuren zählten daneben Grönland, Indien, Argentinien und Dänemark (FAO 2014c).

Weltweit größter Produzent sowohl gezüchteter als auch wildgefangener Shrimps ist China (FAO 2008a; FAO 2015b). Im Gegensatz zu anderen Produzenten ist der Großteil der dortigen Aquakulturproduktion (> 80 %) für den inländischen Markt bestimmt (Anderson *et al.* 2003; Lem 2006; TFS 2007). Trotzdem verfügt China sowohl über ein großes Import- als auch Exportvolumen von Shrimps. Von 2008 bis 2013 waren die fünf Hauptimporteure nach China Kanada, Thailand, Grönland, Ecuador und Argentinien. Die wichtigsten Exportländer für chinesische Shrimps waren Japan, die USA, Malaysia, Hongkong und Südkorea (FAO 2014c).

2.1.3 Shrimps als Konsumgut

Der globale Pro-Kopf-Verbrauch von Meeresfrüchten zeigte seit den 1960er Jahren eine stetige Zunahme und steigerte sich von 9 kg (1961) auf 19,7 kg (2013) (FAO *et al.* 2006; FAO 2013b). Weltweit zählen Shrimps zu den populärsten Meeresfrüchten (Lem 2006). Der internationale Markt für Shrimps konzentrierte sich traditionell auf die USA, Japan und die EU (Bondad-Reantaso *et al.* 2012). Zu Beginn des Millenniums verteilten sich 90 % der weltweiten Exporte an gefrorenen, kultivierten Shrimps auf die USA (48 %), Japan (25 %) und die EU (17 %) (FAO 2011).

Die USA gelten weltweit als der größte Shrimps-Konsument (Bondad-Reantaso *et al.* 2012). Im Jahr 2011 stellten Shrimps, mit einem Pro-Kopf-Verbrauch von mehr als 1,8 kg, das in den USA am meisten konsumierte Fischereierzeugnis dar (NOAA 2014). Der überwiegende Anteil (90 %) der in den USA konsumierten Shrimps stammte dabei aus Aquakulturen und wurde zumeist aus Thailand, Indonesien, China, Ecuador oder Mexiko importiert (NOAA 2014). Das Importvolumen von Shrimps betrug im Jahr 2012 533.495 Tonnen mit einem Warenwert von 4,5 Milliarden US-Dollar (NOAA 2012). Für den europäischen Markt sind Shrimps EUMOFA (2014) zufolge eines der am meisten importierten Fischereierzeugnisse. Im Jahr 2011 betrug der Pro-Kopf-Verbrauch von Shrimps in der EU 0,75 kg und setzte sich aus gezüchteten Shrimps (54 %) und Wildfängen (46 %) zusammen. Innerhalb der EU waren Spanien und Frankreich 2012 die größten Importeure von Warmwasser-Shrimps, mit Ecuador und Indien als den hauptsächlichen Herkunftsländern. Das Importvolumen für Shrimps insgesamt betrug 2012 > 500.000 Tonnen mit einem Wert von 3,05 Milliarden Euro (EUMOFA 2014). Japan, drittgrößter Markt für Shrimps, verzeichnete im Jahr 2014 ein Importvolumen von 223.423 Tonnen (FAO 2015d).

Zusätzlich zu den traditionellen Märkten steigt die Nachfrage in den Produktionsländern selbst an, was in der besseren Einkommensentwicklung begründet liegt (FAO 2014b). Eine erhöhte Nachfrage zeigten 2014 vor allem China und Südkorea mit Importvolumina von entsprechend 78.000 Tonnen und 63.000 Tonnen (FAO 2015d).

2.2 Shrimps-Zucht in Ecuador

2.2.1 Produktionssysteme

Die Produktion von Shrimps lässt sich in die Larvenzucht und die Aufzucht bis zur Marktreife unterteilen (Abb. 2).

In Larvenzuchtanlagen erfolgt die Entwicklung von der Eiablage über den Schlupf des ersten Larvenstadiums (Nauplius), der 12 bis 18 Stunden nach der Eiablage stattfindet, und den weiteren Entwicklungsstadien Zoea, Mysis und Postlarve (FAO 2006-2014). Die

Entwicklung von Postlarven zu adulten Tieren vollzieht sich über eine Häutung (Anonym 2015b). Die zur Larvenzucht genutzten Elterntiere stammen aus Wildfängen oder aus Aufzuchtanlagen (Shrimps-Aquakulturen) mit einer zusätzlichen Zuchtdauer von zwei bis drei Monaten bis zur Geschlechtsreife (> 7 Monate, 30-35 g). Weiterhin existieren Zuchtlinien spezifisch pathogenfreier (SPF) oder spezifisch pathogenresistenter (SPR) Elterntiere in den USA (FAO 2006-2014). Postlarven (PL) werden nach ihrem Alter in Tagen als PL-1, PL-2 etc. bezeichnet (Rosenberry 2015). Zur Eiablage werden spezielle Laichtanks in abgedunkelten Räumen genutzt. Die Larven im ersten Stadium (Nauplien) werden in Meerwasser gewaschen, desinfiziert (Jod und/oder Formalin) und in separate Zuchtbecken überführt. Die Aufzucht vom Stadium der Nauplien bis zur PL-12 erfolgt in Tanks mit einer Größe von 4-100 m³, mit täglichen Wasserwechseln von 10-100 % und einer Dauer von ca. 21 Tagen (FAO 2006-2014). Die Fütterung variiert in Abhängigkeit des Larvenstadiums und umfasst Lebendfutter wie Mikroalgen (u. a. *Chaetoceros muelleri*) und Nauplii von Salzwasserkrebsen (*Artemia*) sowie kommerzielle oder selbst hergestellte Mischfuttermittel (FAO 2006-2014; Rosenberry 2015). Ein Transfer der Postlarven in Aquakulturen, wo diese bis zur Marktreife gezüchtet werden, erfolgt für PL-10-12 in Plastiktüten oder Transporttanks. In gemäßigten Klimazonen werden evtl. beheizbare, kleinere Vorzuchtbecken (0,5-5 Hektar) genutzt, bis die Postlarven nach ca. 25 Tagen ein Gewicht von 0,2 bis 0,5 g erreichen. Anschließend werden sie in die bis zum Zuchtende genutzten Zuchtbecken umgesetzt. In tropischen Regionen erfolgt meist ein direkter Transfer der PL-10 oder PL-12 in die Zuchtbecken (FAO 2006-2014; Rosenberry 2015).

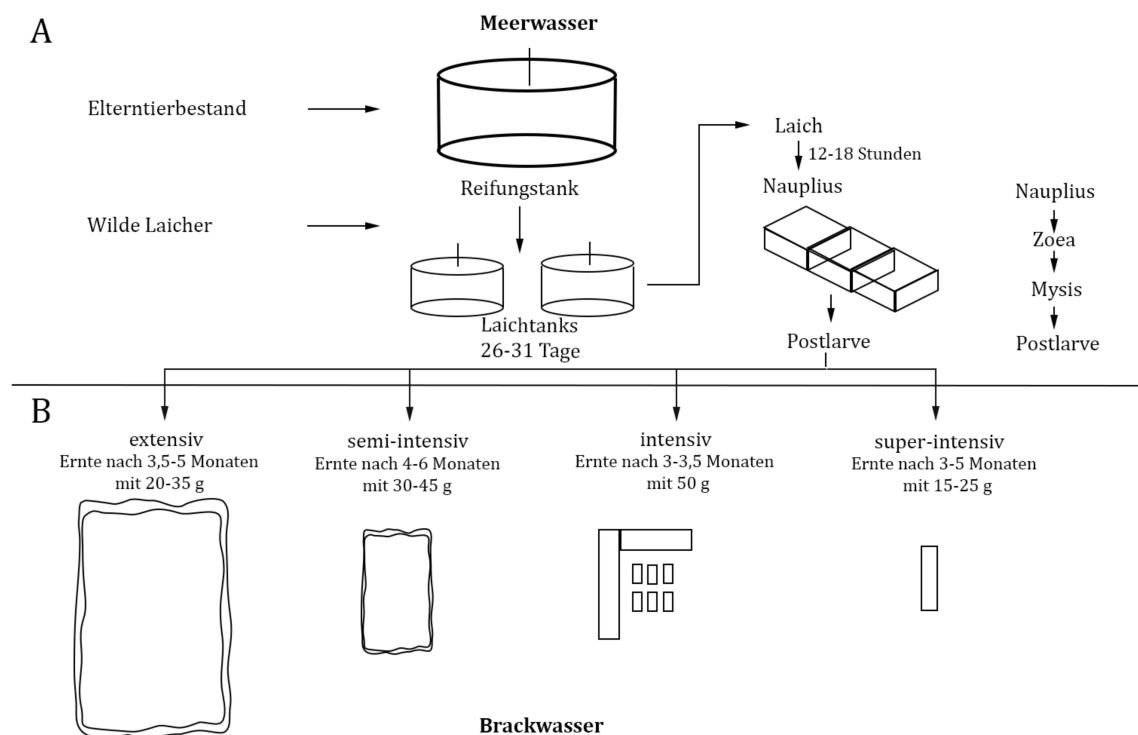


Abbildung 2. Produktionszyklus von *L. vannamei*

Larvenzucht (A) der Shrimps-Spezies *L. vannamei* in Zuchtssystemen von der Eiablage bis zur Postlarve und die Aufzucht bis zur Marktreife (B) in extensiven, semi-intensiven, intensiven und super-intensiven Produktionssystemen.

Modifiziert nach Anonym (2015b) und FAO (2006-2014)

Für die Zucht der in Ecuador überwiegend gezüchteten Shrimps-Spezies *L. vannamei* (Thompson 2014) existieren verschiedene Produktionssysteme, die in vier Hauptkategorien eingeteilt werden können. Man unterscheidet zwischen extensiven, semi-intensiven, intensiven und super-intensiven Haltungsformen, die sich entsprechend durch niedrige, mittlere, hohe oder sehr hohe Besatzdichten in den Zuchtbecken auszeichnen (FAO 2006-2014). In Lateinamerika existieren hauptsächlich extensive und semi-intensive Produktionssysteme. Intensive Haltungen werden überwiegend in Asien angewendet. Die Produktion in super-intensiven Systemen beschränkt sich bisher auf die USA (Samocha *et al.* 2004; FAO 2006-2014). In Tabelle 1 sind die Hauptcharakteristika der vier Produktionsformen dargestellt.

Extensive Systeme sind generell durch große, unregelmäßig geformte Becken (bis zu 100 ha) und einen geringen Kosten- und Materialaufwand charakterisiert (Padlan undatiert). Sie sind in küstennahen Gebieten lokalisiert, wo eine Verbindung zum Meer besteht. Ein Wasseraustausch kann über das Öffnen von Schleusen zum Meer hin erfolgen (Anonym 2015b). Pumpen sowie zusätzliche Belüftungssysteme werden nur in geringem Maße eingesetzt (FAO 2006-2014). Ursprünglich nutzte man die mit den Gezeiten in die Becken gespülten Larven oder solche, die wild gefangen wurden (Anonym 2015b). Seit den 1980er Jahren werden Larven aus Larvenzuchtanlagen verwendet. Die Besatzdichte pro Quadratmeter beträgt vier bis zehn Postlarven. Die Fütterung erfolgt über natürlich vorkommendes Phytoplankton, dessen Produktion durch den Einsatz von Dünger verstärkt werden kann sowie durch zusätzliche Futtermittel mit einem niedrigen Proteingehalt (FAO 2006-2014).

Semi-intensive Systeme unterscheiden sich von extensiven Systemen durch die Verwendung höherer Besatzdichten (10-30 Larven/m²) und kleinerer Becken (1-5 ha), häufigere Wasserwechsel, eine stärkere Belüftung und häufigere Fütterung (FAO 2006-2014).

Intensive Systeme nutzen kleine runde oder quadratische Becken (0,1-1 ha) mit täglichem oder konstantem Wasseraustausch, zusätzlicher Belüftung und einer überwiegend auf externen Futtermitteln basierenden Fütterung (FAO 2006-2014; Padlan undatiert). Die Becken sind häufig aus Beton, was eine bessere Reinigung und Desinfizierung ermöglicht (Anonym 2015b). Intensive Systeme sind zunehmend in kostengünstigeren, küstenfernen Gebieten mit niedriger Salinität lokalisiert (FAO 2006-2014). Mit einer steigenden Intensivierung der Zuchtmethoden werden höhere Erträge erwirtschaftet, jedoch steigt auch die Anfälligkeit für Krankheiten (Kautsky *et al.* 2000). Die Fütterung, die Qualität und der Austausch des Wassers, die Belüftung sowie die Phytoplanktonproduktion intensiver Systeme, müssen konstant überwacht werden (FAO 2006-2014). Ein höherer technischer und organisatorischer Aufwand ist die Folge. In super-intensiven Systemen werden überdachte, betonierte Becken mit einer Größe von 280 m² (0,028 ha) verwendet. Diese Systeme nutzen Grundwasser mit einer niedrigen Salinität (1,8-2,6 ppt) und es erfolgt kein Wasserwechsel, was die biologische Sicherheit stark erhöht (Samocha *et al.* 2004; FAO 2006-2014).

Tabelle 1. Produktionssysteme für *L. vannamei*

Produktions-system	Anwendungs-land	Stand-ort	Becken (ha)	Besatzdichte (Larven/m ²)	Fütterung pro Tag	Wasser-wechsel	Ertrag pro Zyklus (kg/ha)	Zyklen pro Jahr
Extensiv	Lateinamerika	Küste	5-100	4-10	1	Gezeiten, Pumpen	150-500	1-2
Semi-Intensiv	Lateinamerika	Küste	1-5	10-30	2-3	Pumpen	500-2.000	2

Tabelle 1 wird auf der folgenden Seite weitergeführt.

Produktions-system	Anwendungs-land	Stand-ort	Becken (ha)	Besatzdichte (Larven/m ²)	Fütterung pro Tag	Wasser-wechsel	Ertrag pro Zyklus (kg/ha)	Zyklen pro Jahr
Intensiv	Asien, Lateinamerika	Inland	0,1-1	60-300	4-5	Pumpen, Belüftung	7.000-35.000	2-3
Super-Intensiv	USA	Inland	0,028	300-450	3	Kein Wasser-wechsel	28.000-68.000	2

ha: Hektar; m: Meter; m²: Quadratmeter; kg: Kilogramm
 Quelle: Samocha *et al.* (2004); FAO (2006-2014)

2.2.2 Historischer Überblick

Eine Expansion der kommerziellen Shrimps-Zucht (*Penaeus* spp.) begann Ende der 1960er und Anfang der 1970er Jahre (Lester 1992; FAO 2004). In der westlichen Hemisphäre bestand bis zu diesem Zeitpunkt, im Gegensatz zu Asien, noch keine Aquakulturtradition für Shrimps (Lester 1992). Untersuchungen zur Optimierung der Haltungsbedingungen von Shrimps begannen in Asien bereits in den 1930er Jahren (Stentiford *et al.* 2012). Ab 1973 entwickelten französische Wissenschaftler auf Tahiti und Neu-Kaledonien Techniken zur intensiven Zucht verschiedener *Penaeus* (*P.*) spp. (Aquacop 1984). Ebenfalls zu dieser Zeit begannen auch in den USA Untersuchungen zur Zucht von Shrimps. China produzierte damals bereits *P. chinensis* in semi-intensiver Haltungsform ersten und auch Taiwan produzierte schon *P. monodon* (FAO 2004).

Die ersten Shrimps-Aquakulturen in der westlichen Hemisphäre entstanden 1968 in Ecuador (FAO 2005-2014; Stickney und Granvil 2012). In der Provinz El Oro, in der Umgebung von Santa Rosa, wurden 1968 von lokalen Bauern erste Testläufe durchgeführt. Ecuadors 2859 km lange Küste (Abb. 3) bot ideale Bedingungen für die Zucht mariner Shrimps und weitete sich in den 1970er Jahren innerhalb der Provinzen El Oro, Guayas und Santa Elena weiter aus (FAO 2005-2014).

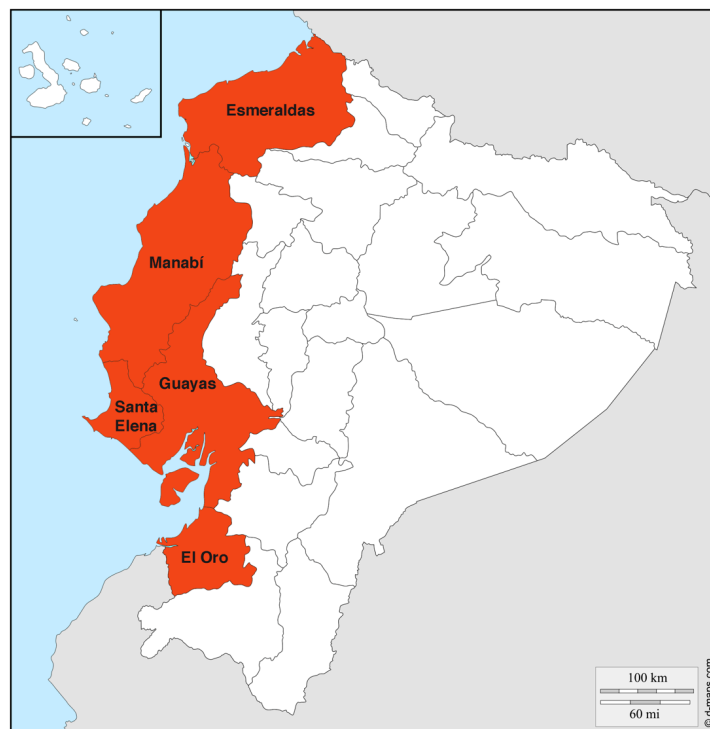


Abbildung 3. Küstenprovinzen Ecuadors

Quelle: http://d-maps.com/carte.php?num_car=3400&lang=de

Die jährliche Produktionsmenge lag Mitte der 1970er Jahre bei etwa 1.500 Tonnen, die von extensiv arbeitenden Aquakulturanlagen produziert wurde (Stern und Sonnenholzner 2010; FAO 2015b). Die ersten zehn Jahre wurde ausschließlich mit einem extensiven Produktionssystem gearbeitet. Der Aufbau der Aquakulturen war insgesamt sehr simpel und es bestand keine Kontrolle über die Besatzdichten der Becken (Hirono und Leslie 1992). Wie für extensive Systeme zu dieser Zeit üblich, bestand der Großteil der Aquakulturen aus unregelmäßig geformten Becken verschiedener Größen, deren Wasserzulauf abhängig von den Gezeiten war. Mit der Flut wurden Shrimps-Larven in die Becken gespült und später, durch Ablassen des Wassers, geerntet (FAO 2006-2014; Stern und Sonnenholzner 2010).

Eine Industrialisierung der Shrimps-Produktion erfolgte etwa ab 1976 (FAO 2005-2014). Vor allem internationale Investitionen zur Einführung moderner Methoden führten zu einer gesteigerten Produktion. Die ersten semi-intensiven Produktionssysteme wurden versuchsweise 1977 und 1978 betrieben und nutzten importierte Futtermittel. Viele Aquakulturbetreiber wechselten zu einem semi-intensiven System oder konstruierten neue Produktionsanlagen mit größeren Pumpkapazitäten und verbesserten Kanalsystemen zur Wasserversorgung (Hirono und Leslie 1992; Stern und Sonnenholzner 2010). Die für Shrimps-Aquakulturen genutzte Fläche betrug 1977 etwa 3.000 ha und wuchs bis 1988 auf etwa 100.000 ha an (Hirono und Leslie 1992).

Bereits 1980 lag die Produktion von Shrimps in Aquakulturen bei > 9.000 Tonnen, 1988 bei > 70.000 Tonnen und ab 1991 > 100.000 Tonnen (FAO 2015b). Daten der Kammer der Shrimps-Produzenten (Cámara de productores de camaron) entsprechend, existierten im Jahr 1987 1.366 Shrimps-Aquakulturen, die sich zum Großteil in den Provinzen Guayas (71 %) und El Oro (18 %) sowie in Manabí (8 %) und Esmeraldas (3 %) befanden (Hirono und Leslie 1992). Zu den in Aquakulturen gezüchteten Shrimps-Spezies zählten in Lateinamerika *L. vannamei*, *P. stylirostris* und zu einem geringen Anteil *P. setiferus* und *P. occidentalis*. In Ecuador waren *L. vannamei* und *P. stylirostris* die hauptsächlich und z. T. in Polykultur gezüchteten Spezies. Bedingt war dies durch die Verwendung wildgefangener Larven. Mit Entstehung und Verbreitung von Larvenzuchtanlagen (Abb. 2) in den 1980er Jahren veränderte sich dies (Stern und Sonnenholzner 2010). Wildgefangene Larven wurden als Grundstock für die Zucht von Shrimps durch gezüchtete Larven abgelöst. Daraus resultierte ein stabileres Angebot an Larven, was sich in einer gesteigerten Produktion bis 1993 widerspiegelte (Calderón 2002).

Ecuador zählte von 1980-1999 weltweit zu den fünf größten Produzenten von Aquakultur-Shrimps (FAO 2015b). Jedoch führte das Auftreten von verschiedenen Shrimps-Erkrankungen zu starken Produktionsverlusten (FAO 2011-2014). Insbesondere das White Spot Syndrom Virus (WSSV) verursachte starke Produktionsverluste, die sich auf die Wirtschaft des ganzen Landes auswirkten (FAO 2005-2014). Abbildung 4 stellt die Produktion von *L. vannamei* in Aquakulturen von 1970 bis 2013 dar.

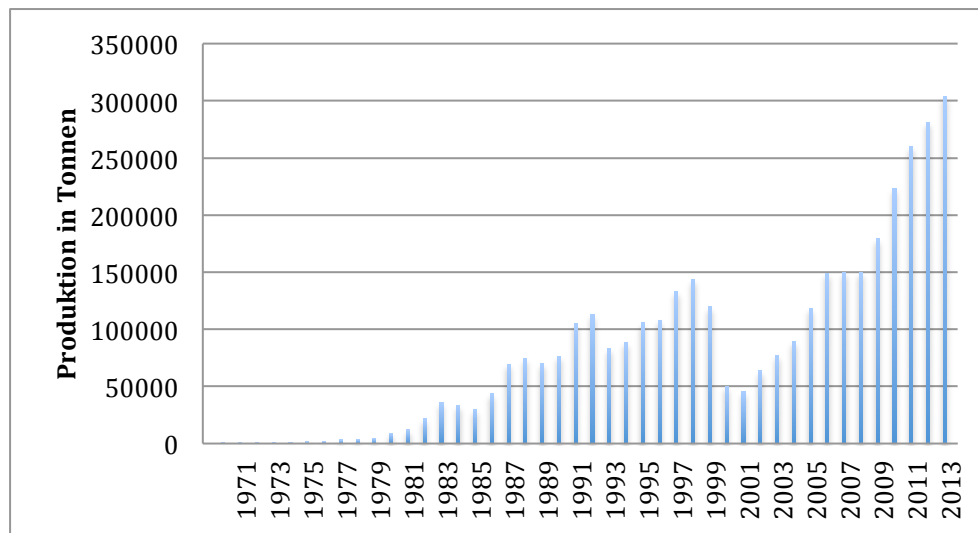


Abbildung 4. Produktion von *L. vannamei* in Ecuador

Quelle: FAO (2015b).

Die durch Krankheiten reduzierten Mengen in den Produktionsjahren 1989-1990, 1993-1996 und 1999-2006 sind erkennbar.

2.2.1.1. Shrimps-Erkrankungen

Die erste beschriebene Erkrankung, die zu einer signifikant reduzierten Produktion führte, war das 1989 aufgetretene Sea Gull Syndrome (SGS). Die Ausbrüche des Taura Syndrom Virus (TSV) ab 1992 und des White Spot Syndrom Virus ab 1999 reduzierten die Produktion erneut (Stern und Sonnenholzner 2010).

Der Ausbruch des Sea Gull Syndrome wurde primär durch *Vibrio* spp. verursacht und reduzierte die Shrimps-Produktion von 1989 um mehr als 4.000 Tonnen (5,9 %) (McClennen 2004; FAO 2015b). Ätiologisch relevant waren vermutlich, neben *Vibrio* spp., simultane Infektionen mit anderen Krankheitserregern wie Protozoen (Gregarinen) oder Viren (*Baclovirus penaei*, Infectious Hypodermal und Hematopoietic Necrosis Virus) (Mohney *et al.* 1994).

Das Taura Syndrom Virus wurde erstmals 1992 in der Region Taura in der Provinz Guayas festgestellt und verursachte bis 1996 große Verluste in der ecuadorianischen Shrimps-Zucht. Rund 15.000 ha Produktionsfläche lagen brach und die geschätzten Verluste betragen etwa 300 Millionen US-Dollar (Stern und Sonnenholzner 2010). Die Erkrankung stellte eine bisher nicht beschriebene und sich weltweit verbreitende Shrimps-Krankheit dar (Lightner 2011). Die virale Ätiologie wurde 1994 beschrieben und der Erreger daraufhin Taura Syndrom Virus genannt (Hasson *et al.* 1995). Die durch das Virus verursachten Verluste traten hauptsächlich in der Provinz Guayas auf. Die anderen Shrimps-Zuchtgebiete waren in geringerem Ausmaß betroffen (Stern und Sonnenholzner 2010). Die Shrimps-Produktion Ecuadors lag 1993 bei 83.404 Tonnen und damit 26 % niedriger als 1992. Bereits ab 1994 zeigte sich jedoch wieder ein Produktionsanstieg (6 %) und 1997 lag das Produktionsniveau über dem von 1992 (FAO 2015b).

Im Jahr 1999 erreichte das aus Asien stammende White Spot Syndrome Virus Ecuador und führte erneut zu gravierenden Verlusten (Lightner 2011). Der durch WSSV ausgelöste Schaden war deutlich größer als die zuvor durch das TSV verursachten Verluste und hatte gesamtwirtschaftliche Auswirkungen für Ecuador (Stern und

Sonnenholzner 2010). Im Jahr 1999 verringerte sich die Produktion um 17 % und bis 2001 lag die Reduktion bei 70 % gegenüber dem Produktionsvolumen von 1998 (FAO 2015b). Zusätzlich belastend für die Shrimps-Industrie Ecuadors war der internationale Preisverfall für Shrimps, der durch eine steigende Produktion in China, Brasilien und Taiwan hervorgerufen wurde. Trotz eines Anstiegs der Produktionszahlen ab 2002 (40 %) gegenüber dem Vorjahr, stiegen die Exportzahlen (3,2 %) im gleichen Zeitraum nur wenig an. Das Produktionsniveau von 1998 wurde erstmals ab 2006 wieder erreicht (FAO 2005-2014; FAO 2015b).

WSSV blieb endemisch, jedoch verringerte sich die Intensität der durch WSSV verursachten Produktionsverluste (Stern und Sonnenholzner 2010). Ein persistierendes, niedriges Infektionsniveau in gesunden Shrimps-Populationen in Aquakulturen ist für WSSV, TSV und andere shrimppathogene Viren beschrieben. Zu Krankheitsausbrüchen kommt es, wenn die Produktionsverhältnisse in Aquakulturen zu Stress bei den Tieren führen (Walker und Winton 2010).

Stern und Sonnenholzner (2010) führten den Anstieg der Produktionszahlen trotz der Persistenz des WSSV auf ein verbessertes Aquakulturmanagement zurück. Zu den Veränderungen zählten eine verringerte Besatzdichte der Becken (80.000-100.000 Larven/Hektar), der Einsatz von Immunstimulatoren und Probiotika sowie verbesserte Kontrollen der Wasser- und Bodenqualität der Zuchtbecken. Zum anderen wurde eine Resistenzentwicklung der Shrimps gegenüber WSSV sowie eine Abnahme der Virulenz des Erregers vermutet (Stern und Sonnenholzner 2010).

Von 2006 bis 2013 zeigte die ecuadorianische Shrimps-Produktion wieder ein stabiles Wachstum (Abb. 4) von durchschnittlich 11 % pro Jahr (FAO 2015b). Eingesetzt wurden weiterhin extensive (80 %) und semi-intensive (20 %) Produktionssysteme mit einem geringen technologischen Einsatz (Thompson 2014). Die auch ohne eine Intensivierung der Haltungssysteme beobachtete steigende Produktionsmenge (Anderson *et al.* 2014) scheint überwiegend das Resultat der Domestizierung der Brutbestände zu sein, die bessere Überlebens- und Wachstumsraten der Shrimps zur Folge hatte (Mutter 2015). Die erwartete durchschnittliche Wachstumsrate von 2013 bis 2016 sollte bei 8,5 % pro Jahr liegen, vorausgesetzt, dass eine weitere Ausbreitung von AHPNS auf dem amerikanischen Kontinent ausbliebe (Anderson *et al.* 2014).

2.2.3 Probiotika

Infolge der zunehmenden Intensivierung der Aquakulturproduktion haben Krankheitsausbrüche und daraus resultierende Produktionsverluste immer mehr an Bedeutung gewonnen und gelten als limitierender Faktor für die Produktion von Shrimps (Kautsky *et al.* 2000; Verschuere *et al.* 2000). Schätzungen zufolge beträgt der jährliche Produktionsverlust in Shrimps-Aquakulturen bis zu 40 %. Der Großteil (60 %) der Verluste, die auf über 3 Milliarden US-Dollar beziffert werden, wird durch Viren verursacht. Der Anteil bakterieller Infektionen beläuft sich auf etwa 20 % (Lundin 1996; Stentiford *et al.* 2012). Speziell *Vibrio* spp. (u. a. *V. alginolyticus*, *V. harveyi*, *V. splendidus*, *V. parahaemolyticus*) gelten hier als Hauptursache, die vor allem in frühen Entwicklungsstadien Verluste verursachen (Lee *et al.* 1996; Lavilla-Pitogo *et al.* 2000; Sudheesh und Xu 2001; Thompson *et al.* 2010). Über eine lange Zeit erfolgte der Einsatz von Antibiotika als Präventiv- und Behandlungsmaßnahme gegen bakterielle und virale Erkrankungen. Auch wenn ein Effekt gegenüber Viren ausgeschlossen war, erachtete man die Antibiotikagabe als Prophylaxe gegenüber bakteriellen Sekundärinfektionen (Stern und Sonnenholzner 2010; Martinez Cruz *et al.* 2012). Aufgrund des Risikos einer Selektion und Weitergabe von Resistenzgenen sowie der Persistenz von antibiotikaresistenten Mikroorganismen (Martinez Cruz *et al.* 2012) wurde nach

anderen Strategien gesucht, um krankheitsbedingte Verluste in Aquakulturen zu vermeiden. Die Verwendung von Probiotika wurde zunehmend als Alternative zur Antibiotikabehandlung gesehen (Balcazar *et al.* 2006).

Für den Einsatz in Aquakulturen sind Probiotika nach Verschuere *et al.* (2000) definiert als ein lebender mikrobieller Zusatz, der einen vorteilhaften Effekt auf den Wirt hat, indem die mit dem Wirt oder mit der Umwelt assoziierte mikrobielle Gemeinschaft modifiziert wird, eine verbesserte Verwertung des Futters gesichert oder der Nährwert gesteigert wird, die Reaktion des Wirts gegenüber Krankheiten steigt oder die Qualität der Umwelt verbessert wird (Verschuere *et al.* 2000).

Bisher erfolgreich verwendet wurden u. a. *Vibrio* spp., *Bacillus* (*B.*) spp. und Milchsäurebakterien (*Lactobacillus* spp.) (Tab. 2). Ihre Anwendung beinhaltete eine erhöhte Überlebensrate, Wachstumsförderung, Inhibition von Pathogenen (in vitro und in vivo), Verbesserung der Wasserqualität und Reduktion von pathogenen *Vibrio* spp.

Tabelle 2. Probiotika in Shrimps-Aquakulturen

Bakterielle Spezies	Effekt	Wirkmechanismus	Referenz
<i>Bacillus</i> S11	Erhöhte Überlebensrate, Wachstumsförderung, Inhibition von Pathogenen (<i>V. harveyi</i>), Reduktion von <i>Vibrio</i> spp.	Antagonismus	Rengpipat <i>et al.</i> (1998)
<i>Bacillus</i> spp., photosynthetische Bakterien, <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Nitrosomonas</i> spp., <i>Nitrobacter</i> spp.	Erhöhte Überlebensrate, Verbesserung der Wasserqualität, Reduktion von <i>Vibrio</i> spp.	Antagonismus	Wang <i>et al.</i> (2005)
<i>Bacillus</i> spp.	Erhöhte Überlebensrate, Verbesserung der Wasserqualität, Reduktion von <i>Vibrio</i> spp.	Antagonismus	Decamp <i>et al.</i> (2008)
Milchsäurebakterien (C2 und B6)	Erhöhte Überlebensrate, Inhibition von Pathogenen (<i>V. harveyi</i>), Reduktion von <i>Vibrio</i> spp.	Antagonismus	Vieira <i>et al.</i> (2007)
<i>V. alginolyticus</i>	Erhöhte Überlebensrate, Wachstumsförderung, Reduktion von <i>Vibrio</i> spp.	Antagonismus	Garriques und Arevalo (1995)
<i>V. alginolyticus</i> , β -1,3/1,6-Glucane	Inhibition von Pathogenen (WSSV)	Antagonismus, Immunstimulation	Rodríguez <i>et al.</i> (2007)
<i>Pseudomonas</i> spp., <i>Aeromonas</i> spp., <i>Vibrio</i> spp., <i>Corynebacterium</i> spp.	Antivirale Aktivität gegenüber IHNV und OMV	Antagonismus	Direkbusarakom <i>et al.</i> (1998), Kamei <i>et al.</i> (1988)

Rengpipat *et al.* (1998) berichteten von einem aus einer *P. monodon*-Aquakultur isolierten *Bacillus*-Stamm (*Bacillus* S11), der einen signifikanten Effekt auf die Gewichtszunahme und die Überlebensrate von *P. monodon*-Larven hatte. In unbehandelten Becken war das durchschnittliche Gewicht mit $4 \pm 0,4$ g, gegenüber $7,1 \pm 0,5$ g in mit *Bacillus* S11 behandelten Becken, signifikant niedriger. Die

Überlebensrate in behandelten Becken betrug $33,3 \pm 4,4$ %, in der Kontrollgruppe lag sie bei $15,8 \pm 5,2$ %. *Bacillus* S11 bildete mit 10^6 - 10^7 KBE/g den Hauptbestandteil des Mikrobioms (10^7 - 10^8 KBE/g) im Hepatopankreas und Darm von Shrimps aus behandelten Becken. In unbehandelten Shrimps bildeten *Vibrio* spp. (10^6 KBE/g) den Hauptbestandteil. Ein anschließender Kontaminationstest (10 Tage) mit *V. harveyi* (10^5 - 10^7 KBE/ml) wies eine protektive Wirkung von *Bacillus* S11 nach, die sich in einer signifikant höheren Überlebensrate behandelter Shrimps (100 %) gegenüber der Kontrollgruppe (26 %) zeigte (Rengpipat *et al.* 1998).

Der Einsatz kommerzieller Probiotika in *L. vannamei*-Aquakulturen in China führte zu einer signifikant höheren Futterumsatzrate ($1,13 \pm 0,05$ %), Überlebensrate ($81 \pm 6,25$ %) und durchschnittlichen Shrimps-Produktion (8215 ± 265 kg Shrimps/ha). In der Kontrollgruppe betrugen die Futterumsatzrate, die Überlebensrate und die Shrimps-Produktion, entsprechend $1,35 \pm 0,12$ %, $48,67 \pm 3,51$ % und 4985 ± 503 kg Shrimps/ha. Eingesetzt wurden kommerziell erhältliche Probiotika mit einem Bakteriengehalt von 10^9 KBE/ml. Die Hauptbestandteile der verwendeten Probiotika waren *Bacillus* spp. und photosynthetische Bakterien, mit einem Zusatz von *Saccharomyces cerevisiae* ($4,5 \times 10^5$ Zellen/ml), *Nitrosomonas* spp. ($6,4 \times 10^4$ Zellen/ml) und *Nitrobacter* spp. ($2,8 \times 10^6$ Zellen/ml). Weiterhin zeigte sich eine signifikant verbesserte Wasserqualität (Wang *et al.* 2005).

Decamp *et al.* (2008) beschrieben den Einsatz von *Bacillus* spp. bei Larvenzuchten in Thailand (*P. monodon*) und Brasilien (*L. vannamei*). Es zeigte sich, dass die Überlebensraten der Larven aus den Testgruppen der Antibiotika und Probiotika gegenüber der Kontrollgruppe durchschnittlich um mind. 30 % höher waren. Die Behandlung mit Probiotika und Antibiotika verbesserte in beiden Fällen die Wasserqualität und führte zu einer signifikant niedrigeren *Vibrio*-Konzentration in den Zuchtbecken (Decamp *et al.* 2008).

Vieira *et al.* (2007) demonstrierten einen positiven Effekt von Milchsäurebakterien (C2 und B6), die aus *L. vannamei* isoliert wurden, auf die Überlebensrate von Shrimps-Larven. Mit C2 ($44 \pm 4,3$ %) und B6 ($50 \pm 2,8$ %) behandelte Larven zeigten signifikant höhere Überlebensraten als die Kontrolle ($21 \pm 11,3$ %). Weiterhin zeigte sich für mit B6 behandelte Larven eine niedrigere Besiedlung mit *Vibrio* spp. und nach einem Kontaminationstest mit *V. harveyi*, eine signifikant höhere Überlebensrate ($79,8 \pm 18$ %) gegenüber der Kontrolle (49 ± 4 %) und den mit C2 behandelten Larven (48 ± 9 %) (Vieira *et al.* 2007).

Der Einsatz von *V. alginolyticus*-Stämmen als Probiotikum in der Larvenzucht von *L. vannamei* in Ecuador führte zu einer durchschnittlich höheren Überlebensrate und einem höheren Lebendgewicht, verglichen mit der prophylaktischen Gabe von Oxytetracyclin und der Kontrollgruppe. In Zuchtbecken, die mit *V. alginolyticus* behandelt wurden, wurde *V. parahaemolyticus* nicht nachgewiesen. In den anderen Testgruppen wurde *V. parahaemolyticus* in durchschnittlich 10 % der Proben detektiert (Garriques und Arevalo 1995).

Rodríguez *et al.* (2007) beschrieben einen Schutz gegenüber WSSV durch die Anwendung von *V. alginolyticus* als Probiotikum und β -1,3/1,6-Glucane als Präbiotika (Martinez Cruz *et al.* 2012) in frühen Stadien der *L. vannamei*-Larvenzucht. Es wurde vermutet, dass der Einsatz eines Probiotikums und β -1,3/1,6-Glucanen während der Larvenaufzucht zu einer veränderten Immunantwort in juvenilen Shrimps führt und so die Prävalenz von WSSV und die Überlebensrate in den Zuchtbecken beeinflusst (Rodríguez *et al.* 2007).

In vitro Studien, durchgeführt von Kamei *et al.* (1988) und Direkbusarakom *et al.* (1998), wiesen eine antivirale Aktivität gegenüber dem Infectious Hematopoetic

Necrosis Virus (IHNV) und dem Oncorhynchus Masou Virus (OMV) nach, die durch verschiedene bakterielle Spezies (*Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Vibrio* und *Corynebacterium*) verursacht wurden. Ermittelt wurde der antivirale Effekt durch Zellkultur Plaque Assays. Als Wirkmechanismus wurde die Sekretion antiviraler Substanzen vermutet, die bisher nicht näher bestimmt wurden (Kamei *et al.* 1988; Direkbusarakom *et al.* 1998).

Als primären Wirkmechanismus machten Rengpipat *et al.* (1998), Wang *et al.* (2005) Decamp *et al.* (2008), Vieira *et al.* (2007) und Garriques und Arevalo (1995) die Substitution pathogener Bakterien durch die probiotische Bakterienpopulation (u. a. *Bacillus* spp., Milchsäurebakterien, *V. alginolyticus*) verantwortlich (kompetitive Exklusion). Viele *Vibrio* spp. sind als Shrimppathogene bekannt und häufig für Produktionsverluste verantwortlich (Wang *et al.* 2005). Die erhöhte Überlebensrate und das bessere Wachstum könnten somit auf die Reduktion von *Vibrio* spp. zurückzuführen sein. Durch eine bakterielle Substitution ist es möglich, die Anhaftung von Pathogenen in der Wirtspezies zu reduzieren und damit das Infektionsrisiko zu senken (Gullian *et al.* 2004). Verschuere *et al.* (2000) zufolge kann die Produktion von antibakteriellen Substanzen (Antibiotika, Bakteriozine, Lysozyme, Siderophore, Proteasen, Hydrogenperoxide, organischer Säuren) ebenfalls entscheidend sein, um die Proliferation von opportunistischen Pathogenen zu mindern (Williams und Vickers 1986; Sugita *et al.* 1997; Verschuere *et al.* 2000). Die Fähigkeit von Milchsäurebildnern, eine Inhibition bakterieller Pathogene durch die Produktion von Bakteriozinen, organischen Säuren und Wasserstoffperoxid zu verursachen, ist beschrieben (Munoz-Atienza *et al.* 2013). Die Verbesserung der Wasserqualität, die bei der Verwendung von *Bacillus* spp. detektiert wurde, könnte durch die Tatsache bedingt sein, dass gram-positive *Bacillus* spp. organisches Material effektiver abbauen, als gram-negative Bakterien (Ghosh *et al.* 2010). Eine Immunstimulation durch Prä- und Probiotika wurde von Rodríguez *et al.* (2007) als primärer Wirkmechanismus für den beobachteten Schutz gegenüber WSSV beschrieben. Ähnliche Beobachtungen gegenüber bakteriellen Pathogenen (*V. harveyi*) machten auch Rengpipat *et al.* (2000) und Balcazar *et al.* (2003) (Rengpipat *et al.* 2000; Balcazar 2003). Ein anderer möglicher Wirkmechanismus umfasste eine Verbesserung der Verdauungsaktivität durch die Synthese von Vitaminen und Co-Faktoren oder eine verbesserte Enzymaktivität mit dem Effekt einer erhöhten Nährstoffabsorption und somit einer Wachstumsförderung (Gullian *et al.* 2004).

Trotz vielfach beschriebenen Nutzens von Probiotika in Shrimps-Aquakulturen, birgt der Einsatz unter Umständen auch Gefahren. Die Verwendung von *Vibrio* spp. als Probiotika ist strittig, da das Genus auch shrimppathogene Stämme beinhaltet (Gullian *et al.* 2004). Vandenberghe *et al.* (1999) isolierten *V. alginolyticus* in Larvenzuchten von gesunden und kranken Tieren (Vandenberghe *et al.* 1999). Die Verwendung anderer als der spezifischen, in Publikationen genannten *V. alginolyticus*-Stämmen ist mit einem Risiko verbunden (Gullian *et al.* 2004). *Bacillus* spp. sind nicht als Pathogene aquatischer Lebewesen beschrieben und eignen sich dadurch für den Einsatz in Aquakulturen (Moriarty 1998; Gullian *et al.* 2004). Das Genus beinhaltet jedoch die humanpathogenen Spezies *B. anthracis* und *B. cereus*. Darüber hinaus ist eine Toxinproduktion für Spezies außerhalb der *B. cereus*-Gruppe beschrieben (From *et al.* 2005; Decamp *et al.* 2008). Weitere Probleme bestehen in Hinblick auf fehlerhafte oder unzureichende Deklarationen von kommerziellen Probiotika in Bezug auf die enthaltenen Bakterienstämme (Noor Uddin *et al.* 2015). Verschiedene Studien demonstrierten, dass bei mehr als 28 % kommerzieller Kulturen, die für die Nutzung als Probiotika bestimmt waren, eine fehlerhafte Identifizierung auf der Genus- oder Speziesebene vorlag (Ninawe und Selvin 2009). Ferner ist ein Vorhandensein von Antibiotikaresistenzgenen

in probiotischen Stämmen und deren mögliche Übertragung in Aquakulturen von Bedeutung (Noor Uddin *et al.* 2015) Munoz-Atienza *et al.* (2013) detektierten in Milchsäurebakterien, die antibiotische Aktivität gegen Fischpathogene zeigten und somit potentielle Probiotika für Aquakulturen darstellten, das Vorhandensein von Virulenzgenen und einen hohen Grad an Antibiotikaresistenzen. Der gleichzeitige Nachweis von Virulenzgenen und Antibiotikaresistenzen erfolgte bei *Enterococcus (E.)* spp. (*E. faecalis*, 100 %; *E. faecium*, 79 %) (Munoz-Atienza *et al.* 2013). Probiotika könnten damit, ebenso wie in Aquakulturen eingesetzte Antibiotika, eine Rolle bei der Verbreitung von Antibiotikaresistenzen im aquatischen Milieu spielen (Baquero *et al.* 2008). Bei der Verwendung antibiotikaresistenter probiotischer Stämme besteht die Möglichkeit des horizontalen Transfers von Resistenzgenen auf humanpathogene Erreger (Defoirdt *et al.* 2007).

Um eine Gefährdung der Wirtspezies (Shrimps), der Umwelt und des Menschen durch den Einsatz von bakteriellen Stämmen in probiotischen Produkten auszuschließen, ist die zweifelsfreie Identifizierung und Charakterisierung der bakteriellen Stämme essentiell.

2.3 *Vibrio* spp.

2.3.1 Historie

Beschreibungen von Cholera-ähnlichen Erkrankungen können bis ins fünfte Jahrhundert vor unserer Zeitrechnung zurückverfolgt werden (Harris *et al.* 2012). Die moderne Geschichte der Cholera begann jedoch mit dem Auftreten der ersten Pandemie im Jahr 1817, die ihren Ursprung in Indien hatte (Reidl und Kloese 2002). Erstmals beschrieben wurde *Vibrio cholerae* von dem italienischen Arzt Filippo Pacini, der das Bakterium im Jahr 1854 mikroskopisch nachwies (Thompson *et al.* 2004). Eine Isolierung in Reinkultur gelang Robert Koch 1884 bei Untersuchungen in Indien. Koch demonstrierte, dass Cholera durch ein Bakterium verursacht wurde, das er als komma- oder spiralförmig und hoch motil beschrieb (Brock 1999).

V. cholerae hat seit 1817 zu sieben Pandemien geführt, die alle von Asien ausgingen (Sack *et al.* 2004). Die bis heute andauernde siebte Pandemie begann 1961 in Indonesien und verbreitete sich von dort ausgehend innerhalb Asiens und darüber hinaus nach Afrika, Europa und Lateinamerika (Harris *et al.* 2012). Schätzungen zufolge führt Cholera jährlich zu 3-5 Millionen Erkrankungen (WHO 2010), mit periodisch auftretenden Epidemien, wie dem Ausbruch in Haiti 2010 (WHO 2009; Chin *et al.* 2011). *V. parahaemolyticus* wurde erstmals 1951 in Japan von dem Mediziner Fujino als Auslöser Lebensmittel-assoziiierter Infektionen beschrieben (Alter 2012). Seit den 1960er Jahren wurden in Japan jährlich Hunderte Ausbrüche dokumentiert (Barker 1974). Der erste bestätigte Ausbruch von *V. parahaemolyticus* in der westlichen Hemisphäre (USA) ereignete sich 1971 (Dadisman *et al.* 1972). Bis Ende 1972 wurden in den USA 13 Ausbrüche beschrieben (Barker 1974). Fortschritte in der taxonomischen Forschung führten ab Ende der 1970er Jahre zur Identifizierung weiterer humanpathogener *Vibrio*-Spezies (Janda *et al.* 1988). Heute sind zwölf humanpathogene *Vibrio*-Spezies bekannt. Neben *V. cholerae* gelten *V. parahaemolyticus* und *V. vulnificus* als die bedeutendsten Erreger (Alter 2012). *V. parahaemolyticus*- und *V. vulnificus*-Infektionen treten regelmäßig in den USA sowie in verschiedenen asiatischen und lateinamerikanischen Ländern auf und gelten als Hauptverursacher von bakteriellen Erkrankungen, die mit Meeresfrüchten assoziiert sind (Baker-Austin *et al.* 2010; Raszl *et al.* 2016).

2.3.2 Taxonomie und Charakteristika

Vibrionen werden in das Phylum *Proteobacteria* eingeordnet und gehören zur Klasse der *Gammaproteobacteria*. Innerhalb dieser Klasse sind sie Teil der Ordnung *Vibrionales* und werden der Familie *Vibrionaceae* zugeordnet. Die Gattung *Vibrio* besteht zurzeit aus 114 Spezies, einschließlich zweier Subspezies (Anonym 2015a).

Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (2004) entsprechend sind Vibrionen gram-negative Stäbchenbakterien mit einer Länge von 1,4 bis 2,6 µm und einer Breite von 0,5 bis 0,8 µm. Ihre Form ist gerade oder gebogen und sie sind durch eine polare Begeißelung beweglich. Sie haben einen fakultativ fermentativen Stoffwechsel, sind mesophil und chemoorganotroph. Die meisten *Vibrio* spp. sind Oxidase positiv, reduzieren Nitrat zu Nitrit und fermentieren D-Glukose ohne Gasbildung (Farmer III und Janda 2004). Alle Vibrionen kommen ubiquitär in der marinen Umwelt vor und benötigen zur Anzucht, mit Ausnahme von *V. cholerae* und *V. mimicus*, einen Zusatz von Kochsalz (Drake *et al.* 2007). Die optimale Kochsalzkonzentration liegt bei etwa 2-4 %. Der pH-Wert sollte zwischen 7,5 und 8,6 liegen. Abhängig von der Spezies ist ein Wachstum aber von pH 5 bis pH 11 möglich. Alle *Vibrio* spp. nutzen D-Glukose, D-Fruktose, Maltose und Glycerol (Sieffert 2003). Ein häufig verwendetes Nährmedium ist Thiosulfat-Zitrat-Gallensalz-Saccharose-Agar (TCBS), das als selektives Medium für *Vibrio* spp. gilt. Es nutzt die Fermentierung von Saccharose zur *Vibrio* Differenzierung (Kobayashi *et al.* 1963). Saccharose fermentierende Vibrionen wie *V. cholerae* (2-3 mm), *V. alginolyticus* (3-5 mm), *V. metschnikovii* (3-4 mm) und *V. fluvialis* (2-3 mm) wachsen in gelben Kolonien. Nicht-Saccharose fermentierende Vibrionen, wie *V. parahaemolyticus* (3-5 mm), *V. vulnificus* (2-3 mm) und *V. mimicus* (2-3 mm), erscheinen blaugrün (Oxoid Limited 2001-2014).

Biochemische Charakteristika und spezielle Wachstumseigenschaften, die sich innerhalb der Spezies unterscheiden, werden traditionell zur Identifizierung genutzt (Ramamurthy und Nair 2007). Einige Eigenschaften, die häufig zur Speziesidentifizierung humanpathogener Vibrionen eingesetzt werden sind in Tabelle 3 dargestellt.

Von den mehr als 100 beschriebenen *Vibrio* spp. gelten zwölf als humanpathogen (*V. alginolyticus*, *V. cholerae*, *V. cincinnatiensis*, *V. (Photobacterium) damsela*, *V. furnissii*, *V. fluvialis*, *V. harveyi*, *V. hollisae*, *V. metschnikovii*, *V. mimicus*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*) (Alter 2012; Anonym 2015a).

Für die drei humanmedizinisch bedeutendsten Spezies (*V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*) existieren über die Speziesebene hinaus weitere Testverfahren, um potentiell humanpathogene Erreger zu identifizieren und die Spezies näher zu klassifizieren.

V. cholerae kann über die Struktur des O-Antigens der Lipopolysaccharid-Hülle in Serogruppen eingeteilt werden. Es sind mehr als 200 Serogruppen bekannt, wobei nur Toxin-produzierende Isolate der Serogruppen O1 und O139 als Auslöser von Cholera, die in epidemischer und pandemischer Form auftritt, bekannt sind (Cho *et al.* 2010). *V. cholerae*-Isolate anderer Serogruppen werden kollektiv als non-O1/non-O139 bezeichnet. Weiter differenziert werden Isolate der Serogruppe O1 in die zwei Biotypen klassisch und El Tor sowie in die drei Serotypen Inaba, Ogawa und Hikojima (Mandal *et al.* 2011). Für die Biotypen klassisch und El Tor sind Unterschiede in Bezug auf die Überlebensfähigkeit in der Umwelt und die Virulenz beschrieben (Koelle *et al.* 2005). Zur Differenzierung der beiden Biotypen können phänotypische Unterschiede genutzt werden, die sich durch Tests oder Eigenschaften wie die Voges-Proskauer-Reaktion, die Inhibition durch Polymyxin B, die Phagen-Sensibilität oder die Agglutination mit Hühner

Erythrozyten ermitteln lassen (Kaper *et al.* 1995; Son *et al.* 2011). Eine Differenzierung kann jedoch auch über genetische Marker (*ctxB*, *tcpA*, *rstR*) erfolgen (Son *et al.* 2011). Die Zusammensetzung der O1-Serogruppe aus den somatischen Antigenen A, B, und C erlaubt eine Unterteilung in die Serotypen Inaba, Ogawa und Hikojima. Ogawa, der Serotyp mit der höchsten Prävalenz, exprimiert überwiegend die Antigene A und B, Inaba exprimiert A und C und Hikojima-Isolate beinhalten alle drei Antigene. Eine Zuordnung des Serotyps erfolgte durch die Verwendung von Antiseren (Kaper *et al.* 1995; Mandal *et al.* 2011).

Die primäre Klassifizierung von *V. parahaemolyticus* beruht auf der Bestimmung der somatischen (O)-Antigene und Kapsel (K)-Antigene (Nair *et al.* 2007). Identifiziert wurden bisher 13 O-Serogruppen und 71 K-Serogruppen, die mit Gastroenteritiden beim Menschen in Zusammenhang standen (Alam *et al.* 2009). Seit 1996 gibt es eine Serogruppe (O3:K6), die weltweit auftritt und als Auslöser der ersten *V. parahaemolyticus*-Pandemie gilt (Okuda *et al.* 1997; Ceccarelli *et al.* 2013). Als pathogen werden Stämme betrachtet, die u. a. die Gene *tdh* (thermostabiles direktes Hämolyisin) und/oder *trh* (TDH-verwandtes Hämolyisin) codieren. Eine Untersuchung auf die Anwesenheit dieser Gene wird zur Ermittlung der Pathogenität durchgeführt (Drake *et al.* 2007; Nordstrom *et al.* 2007).

Für *V. vulnificus* wurden drei Biotypen identifiziert. Alle drei Biotypen sind mit Erkrankungen des Menschen assoziiert (Horseman und Surani 2011). Biotyp 1 ist für die meisten der weltweit auftretenden Fälle verantwortlich. *V. vulnificus*-Stämme des Biotyps 2 verursachen primär Infektionen bei Aalen, es wurden jedoch auch humane Fälle beschrieben. Der Biotyp 3 wurde erstmals 1996 in Israel detektiert und scheint nicht außerhalb Israels vorzukommen (Baker-Austin *et al.* 2010). Es wird angenommen, dass Biotyp 3 eine Hybridform zweier Bakterienpopulationen darstellt (Bisharat *et al.* 2005).

Tabelle 3. Biochemische Charakteristika und Wachstumseigenschaften humanpathogener *Vibrio* spp.

	<i>V. cholerae</i>	<i>V. mimicus</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>V. alginolyticus</i>	<i>V. vulnificus</i>	<i>V. damsela</i>	<i>V. fluvialis</i>	<i>V. hollisae</i>	<i>V. metschnikovii</i>	<i>V. cincinnatiensis</i>
Koloniefarbe (TCBS-Agar)	Gelb	Grün	Grün	Gelb	Grün/Gelb	Grün	Gelb	Grün/KW	Gelb	Gelb
Oxidase	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Indol^a	+	+	+	±	+	-	-/+	+	-/+	-
Voges-Proskauer^a	±	-	-	+	-	+	-	-	+	-
Nitrat zu Nitrit^a	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Simmons-Citrat	+	+	-	-	±	-	+	-	±	-/+
ONPG	+	+	-	-	±	-	-/+	-	±	±
Urease	-	-	±	-	-	-	-	-	-	-
Gelantinase	+	±	+	+	±	-	±	-	±	-
Motilität	+	+	+	+	+	-/+	±	-	±	±
Polymyxin B Inhibition	-/+	+	±	±	-	±	+	+	+	+
Arginindihydrolase^a	-	-	-	-	-	+	+	-	±	-
Lysindecaboxylase^a	+	+	+	+	+	±	-	-	-/+	±
Ornithindecaboxylase^a	+	+	+	±	±	-	-	-	-	-
L-Arabinose-Fermentation	-	-	±	-	-	-	+	+	-	+
D-Arabitol-Fermentation	-	-	-	-	-	-	±	-	-	-
Cellobiose-Fermentation	-	-	-	-	+	-	-/+	-	-	+
Laktose-Fermentation	-	-/+	-	-	±	-	-	-	±	-
Maltose-Fermentation	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
D-Mannitol-Fermentation	+	+	+	+	-/+	-	+	-	+	+
Salicin-Fermentation	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
Wachstum bei 0 % NaCl	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Wachstum bei 3 % NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Wachstum bei 6 % NaCl	±	±	+	+	±	+	±	+	+	+
Wachstum bei 8 % NaCl	-	-	+	+	-	-	-	-	±	-
Wachstum bei 10 % NaCl	-	-	±	+	-	-	-	-	-	-

TCBS: Thiosulfat-Zitrat-Gallensalz-Saccharose-Agar, ONPG: *o*-Nitrophenyl- β -D-galactopyranosid, (+) > 90 % Positive, (±) variabel > 50 % Positive, (-/+) variabel < 50 % Positive, (-) < 10 % Positive, KW: kein Wachstum

a: Testreaktion mit 1 % NaCl

Quelle: Ramamurthy und Nair (2007)

2.3.3 Ökologie

Vibrionen sind weltweit in aquatischen Habitaten verbreitet (Pruzzo *et al.* 2005). Bedingt durch variierende Ansprüche an den Salzgehalt des Wassers reicht ihr Vorkommen von Meerwasser, besonders in küstennahen Bereichen, über Flussmündungsgebiete, bis hin zu Süßwasser (Farmer III und Janda 2004). Innerhalb dieser aquatischen Habitate kommen sie frei und in Assoziation mit biotischen und abiotischen Substraten vor (Thompson *et al.* 2004; Islam *et al.* 2007). Die Konzentration und die Verteilung von Vibrionen werden sowohl in Süß- als auch in Salzwasser, durch verschiedene Umweltfaktoren reguliert. Dazu zählen organische und anorganische chemische Stoffe, die Temperatur, die Salinität, der Sauerstoffgehalt und der Einstrahlung von UV-Licht (Chakraborty *et al.* 1997). Die Salinität, speziell die Konzentration von Natrium, ist der wichtigste Faktor für die Verbreitung von Vibrionen in der Umwelt. Die Natriumkonzentration, die für ein optimales Wachstum benötigt wird, ist je nach Spezies unterschiedlich. Für *V. cholerae* und *V. metschnikovii* liegt sie mit 5-15 mM (0,29-0,87 ‰) am niedrigsten (Baumann *et al.* 1984). Daneben ist die Temperatur ein wichtiger Wachstumsfaktor. Unabhängig von der Salinität fördern höhere Wassertemperaturen, bei Vorhandensein der erforderlichen Nährstoffe, das Wachstum von Vibrionen, folglich kommen sie typischerweise in tropischen Regionen vor (Farmer III und Janda 2004). Bei Temperaturen zwischen 15 und 30 °C zeigt sich im Allgemeinen ein gutes Wachstum (Thompson *et al.* 2004).

Neben dem Vorkommen in tropischen Regionen sind *Vibrio* spp. in den Sommermonaten auch in Gewässern gemäßigter Klimazonen nachweisbar (Huehn 2012). In den Wintermonaten nehmen sie durch Veränderungen in der Zellstruktur und des Zellmetabolismus eine reversible Überdauerungsform, den VBNC-Zustand (viable but non-culturable-lebend aber nicht kultivierbar), an. Zellen im VBNC-Zustand sind mit den herkömmlich genutzten Nährmedien nicht anzüchtbar (Oliver *et al.* 1995; Oliver 1999). Zu den natürlichen Stressoren, die einen Übergang in den VBNC-Zustand hervorrufen können, zählen u. a. Wassertemperaturen oder osmotische Konzentrationen oberhalb und unterhalb der Wachstumsgrenze, ein Mangel an Nährstoffen, bestimmte Stärken, weißes Licht (40 klux) oder eine niedrige Sauerstoffkonzentration (Oliver 1993; Gourmelon *et al.* 1994; Mascher *et al.* 2000; Oliver 2010). In Sediment, das Vibrionen ebenfalls als Habitat dient, können lebende Zellen auch in den Wintermonaten nachgewiesen werden (Huehn 2012).

Eine weitere Strategie, um negativen äußeren Einflüssen Stand zu halten, ist die Bildung von Biofilmen (Huq *et al.* 2008; Johnson 2008). Unter Biofilmen versteht man Bakterienpopulationen, die von einer selbst gebildeten extrazellulären Polymer-Matrix umschlossen sind, eine veränderte Wachstumsrate und Gen-Transkription aufweisen sowie eine irreversible Verbindung zu einer Oberfläche oder den eigenen Zellen besitzen (Donlan und Costerton 2002). Biofilme können sich an einer Vielzahl abiotischer Oberflächen oder dem Äußeren von Zoo- und Phytoplankton bilden (Islam *et al.* 2007).

Das Vorkommen von *Vibrio* spp. in Verbindung mit biotischen und abiotischen Substraten ist entscheidend für das Überleben in der aquatischen Umwelt – ob als Individuen, kleine Kolonien oder als Bakterienpopulation in Biofilmen (Islam *et al.* 2007).

2.4 *Vibrio* spp. in der Shrimps-Zucht

2.4.1 Humanpathogene *Vibrio* spp. in der Shrimps-Zucht

In Meeresfrüchten enthaltene Pathogene (Bakterien, Viren, Parasiten) sind weltweit für einen großen Anteil Lebensmittel-assoziiertes Erkrankungen verantwortlich (Huss *et al.* 2000; Iwamoto *et al.* 2010; Santos und Vieira 2013). In den USA waren bakterielle Erreger für 76,1 % der mit Meeresfrüchten assoziierten Humaninfektionen verantwortlich. Mit Krustentieren assoziierte Infektionen wurden zu 93,3 % durch Bakterien verursacht. Insgesamt waren *Vibrio* spp. die häufigste Ursache der mit Meeresfrüchten assoziierten Erkrankungen (Iwamoto *et al.* 2010). Zu den bedeutendsten bakteriellen Pathogenen in Meeresfrüchten zählen neben *Vibrio* spp. auch *Salmonella enterica* subsp. *enterica*, *Shigella*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter*, *Clostridium botulinum* und andere Toxin-produzierende Bakterien (Wang *et al.* 2011).

Die Produktion von Meeresfrüchten, insbesondere von Shrimps, findet überwiegend in Entwicklungsländern statt. Der Konsum hingegen erfolgt zum Großteil in Industriestaaten (Kirkwood 1993). Durch den wachsenden internationalen Handel mit Meeresfrüchten wird die Übertragung von Pathogenen in neue geografische Gebiete und Bevölkerungsgruppen erleichtert. Die Lebensmittelsicherheit von Meeresfrüchten erhält daher zunehmend Bedeutung (Norhana *et al.* 2010). Für den Export bestimmte Meeresfrüchte müssen die mikrobiologischen Standards der Importländer erfüllen. Das Vorhandensein von *Vibrio* spp. und *Salmonella* in rohen, tiefgefrorenen Shrimps wird von vielen Importeuren nicht akzeptiert (Banerjee *et al.* 2012). Insbesondere von der EU, den USA und Japan, den drei größten Importeuren von Meeresfrüchten, werden zunehmende Anforderungen an die mikrobiologische Sicherheit von Meeresfrüchten gestellt, die von exportierenden Ländern einzuhalten sind (FAO 2005a; Stentiford *et al.* 2012).

Der Nachweis bakterieller Erreger in international gehandelten Fisch- und Fischereierzeugnissen ist eine häufige Ursache (23-72 %) von Beanstandungen und Zurückweisungen bei der Einfuhr in die EU, die USA und nach Japan (FAO 2005a). Dem RASFF (Rapid Alert System for Food and Feed) entsprechend, waren von 1999-2002 *Vibrio* (39,8 %) und *Salmonella* (27,7 %) für 67,5 % der mikrobiologischen Beanstandungen von Meeresfrüchten an europäischen Grenzen verantwortlich. Beanstandungen erfolgten für den genannten Zeitraum aufgrund des Nachweises von Mikroorganismen (31-72 %), Chemikalien (25-65 %) und aus anderen Gründen (1-4 %) (FAO 2005a). In den USA waren, Daten der FDA (Food and Drug Administration) zufolge, 2001 und 2002 Nachweise von *Salmonella* (21,3 %) und *Listeria* (2,1 %) die Ursache mikrobiologischer Beanstandungen (23,4 %) von Meeresfrüchten. Zu den weiteren Beanstandungskategorien zählten Chemikalien (5 %) und andere Gründe (71,6 %) (FAO 2005a). Neben den Einfuhrkontrollen von Meeresfrüchten existieren nur wenige Untersuchungen zum Vorkommen von *Vibrio* spp. in Meeresfrüchten (Sieffert 2003; Wang *et al.* 2011; Robert-Pillot *et al.* 2014).

2.4.1.1 Prävalenz humanpathogener *Vibrio* spp. in der Shrimps-Zucht

Vibrio spp. sind in Küsten- und Flussmündungsgebieten weitverbreitet. Zu einer Kontamination von Meeresfrüchten kommt es vor allem in tropischen Regionen und in gemäßigten Klimazonen zur Sommerzeit (Reilly und Käferstein 1997; Butt *et al.* 2004). Ein Infektionsrisiko kann bei der Handhabung oder dem Verzehr roher, kontaminierter

Meeresfrüchte bestehen. Aufgrund der Hitzesensibilität von Vibrionen reicht allerdings eine Erhitzung auf 70 °C Kerntemperatur für 2 Minuten aus, um das Infektionsrisiko mit *Vibrio* spp. zu eliminieren (Feldhusen 2000; Johnston und Brown 2002). Jedoch kann es insbesondere bei der Zubereitung von Krusten- und Schalentieren dazu kommen, dass eine zu niedrige Kerntemperatur zu einer ungenügenden Bakterienabtötung führt (Sieffert 2003). Darüber hinaus besteht bei gekochten Meeresfrüchten im Fall einer Rekontamination die Gefahr einer starken Vermehrung, infolge der durch die Erhitzung abgetöteten Konkurrenzflora (Sieffert 2003).

Durch Meeresfrüchte ausgelöste *Vibrio*-Infektionen sind überwiegend, bis zu 80 %, mit Gastroenteritiden assoziiert und zu einem geringeren Anteil mit primären Septikämien und Wundinfektionen (Butt *et al.* 2004). Zu den *Vibrio* spp., die als Auslöser von Lebensmittel-assoziierten Gastroenteritiden bekannt sind, zählen *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. fluivialis*, *V. hollisae*, *V. mimicus*, *V. vulnificus*, *V. furnissii* und *V. metschnikovii* (SCVPH 2001). Muscheln und Krustentiere sind häufig mit *Vibrio* spp. assoziierten Lebensmittelinfektionen verbunden (Butt *et al.* 2004). Insbesondere das Vorkommen pathogener *Vibrio* spp. in Muscheln wurde in zahlreichen Studien untersucht. Daten zum Vorkommen von *Vibrio* spp. in Krustentieren sind hingegen rar (Robert-Pillot *et al.* 2010).

Tabelle 4 stellt Studien zum Vorkommen von *Vibrio* spp. in Shrimps und anderen Meeresfrüchten aus Produktionsregionen (Aquakulturen, Einzelhandel) und Importländern (Groß- und Einzelhandel, Gastronomie) dar. Nachweise von *Vibrio* spp. erfolgten dabei aus lebenden, frischen, gefrorenen, gekochten und verzehrfertigen Meeresfrüchten.

Aus Ecuador, Indien, Malaysia, Mexiko und Thailand stammende Studien, die Shrimps, Wasser, Sediment und Futtermittel aus Shrimps-Aquakulturen und Larvenzuchtanlagen untersuchten, wiesen *Vibrio* spp. mit einer Prävalenz von 12 % bis 76 % nach (Tab. 4). Ein Nachweis erfolgte aus allen getesteten Probenotypen. Zu den detektierten *Vibrio* spp. zählten *V. alginolyticus* (1,7-69,2 %), *V. cholerae* (2,6-60 %), *V. parahaemolyticus* (1,6-40 %), *V. vulnificus* (6,6-26,6 %), *V. mimicus* (0-5,2 %) und *V. fluivialis* (Mohney *et al.* 1994; Dalsgaard *et al.* 1995b; Bhaskar *et al.* 1998; Noriega-Orozco *et al.* 2007; Banerjee *et al.* 2012). Die aus Indien und Mexiko stammenden Untersuchungen erfassten das Auftreten unterschiedlicher *Vibrio* spp. im Verlauf der Zuchtperiode. Bhakar *et al.* (1998) stellten bei *P. monodon*-Aquakulturen in Indien während der Zuchtphase die höchste *Vibrio*-Prävalenz in Sediment fest. Zum Erntezeitpunkt zeigten Shrimps die höchste Prävalenz an *Vibrio* spp. *V. alginolyticus* war zu beiden Zeitpunkten in Sediment und Shrimps die dominante *Vibrio* sp. In Shrimps wurde während der Zuchtperiode *V. parahaemolyticus* am zweithäufigsten festgestellt. Zum Zeitpunkt der Ernte war es *V. vulnificus*. In Sediment blieb *V. parahaemolyticus* zu beiden Zeitpunkten die zweithäufigste *Vibrio* sp. Noriega-Orozco *et al.* (2007) stellten für *L. vannamei*-Zuchten in Mexiko fest, dass gegen Ende der Zuchtperiode überwiegend *Vibrio* spp. mit einer höheren Salztoleranz nachgewiesen wurden (*V. harveyi*, *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*).

Studien zum Vorhandensein von *Vibrio* spp. in Proben aus dem Einzelhandel in Indien und Thailand untersuchten Shrimps, Krebse, Muscheln, Austern, Fisch, Tintenfisch, diverse verarbeitete Meeresfrüchte sowie verzehrfertige Produkte mit Meeresfrüchten (Tab. 4). Sie wiesen *Vibrio* spp. in 17,5 % bis 92 % der Proben nach. Die verarbeiteten und verzehrfertigen Produkte wiesen trotz eines zum Teil hohen Verarbeitungsgrades (Pasteurisierung), in vielen Fällen (17,5-25 %) mindestens eine der potentiell pathogenen *Vibrio* spp. auf. Die detektierten *Vibrio* spp. aller drei Studien umfassten

V. alginolyticus (0-61,5 %), *V. parahaemolyticus* (0-68,1 %), *V. cholerae* (1-51 %), *V. mimicus* (1-23,1 %), *V. vulnificus* (0-14 %), *V. fluvialis* (7 %) und *V. harveyi* (1 %) (Chitov *et al.* 2009b; Woodring *et al.* 2012; Sudha *et al.* 2014).

Studien aus Deutschland, Frankreich und den USA wiesen *Vibrio* spp. mit einer Prävalenz von 1,6 % bis 63,3 % aus Krustentieren (Shrimps, Gambas, Krebse), Muscheln und Fisch nach (Tab. 4). Die Proben stammten aus dem Groß- und Einzelhandel sowie aus Gastronomiebetrieben und waren bei der Probennahme lebend, roh und gefroren bzw. zuvor gefroren, gekocht und gefroren oder frisch. Bei den nachgewiesenen *Vibrio* spp. handelte es sich um *V. parahaemolyticus* (1 %-36,7 %), *V. alginolyticus* (8 %-29 %), *V. vulnificus* (1,8 %-16,7 %), *V. cholerae* (0,6 %-10 %), *V. fluvialis* (0,7 %-6,7 %), *V. mimicus* (1 %), *V. metschnikovii* (1 %) und *V. anguillarum* (1 %). Ein Nachweis von *tdh*- und/oder *trh*-tragenden *V. parahaemolyticus*-Stämmen erfolgte durch Messelhäusser *et al.* (2010) (n = 1) und Robert-Pillot *et al.* (2014) (n = 13) (Berry *et al.* 1994; Sieffert und Stolle 2002; Messelhausser *et al.* 2010; Robert-Pillot *et al.* 2014).

Tabelle 4. Untersuchungen zum Vorkommen von *Vibrio* spp. in Meeresfrüchten

Probenherkunft	Probennahme	Probentyp	Positiver Nachweis	<i>Vibrio</i> sp.	Referenz
Ecuador	Aquakultur, Larvenzucht	Shrimps, Wasser, Sediment (n = 44)	76 %	<i>V. p.</i> (40 %), <i>V. a.</i> (16 %), <i>V. v.</i> (8 %)	Mohney <i>et al.</i> (1994)
Indien	Aquakultur	Shrimps (n = 36), Wasser (n = 36), Sediment (n = 36), Futtermittel (n = 60)	Shrimps (41-43,5 %), Wasser (28-39 %), Sediment (34-48 %), Futtermittel (12-42 %)	<i>V. p.</i> (1,6-39,5 %), <i>V. c.</i> (2,6-60 %), <i>V. v.</i> (6,6-26,6 %), <i>V. a.</i> (26,3-69,2 %), <i>V. m.</i> (0-5,2 %)	Bhaskar <i>et al.</i> (1998)
Malaysia	Aquakultur	Shrimps (n = 180), Wasser	Shrimps (48,3 %)	<i>V. c.</i> (18,3 %), <i>V. m.</i> (16,7 %), <i>V. p.</i> (10 %), <i>V. v.</i> (6,7 %), <i>V. a.</i> (1,7 %)	Banerjee <i>et al.</i> (2012)
Mexiko	Aquakultur	Wasser (n = 30), Sediment (n = 15)		<i>V. a.</i> , <i>V. c.</i> , <i>V. m.</i> , <i>V. p.</i> , <i>V. f.</i>	Noriega-Orozco <i>et al.</i> (2007)
Thailand	Aquakultur	Küstenwasser (n = 28), Beckenwasser (n = 28), Sediment (n = 26), Shrimps (n = 25)	Küstenwasser (54 %), Beckenwasser (32 %), Sediment (27 %), Shrimps (16 %)	<i>V. c.</i> O1 (2 %), <i>V. c.</i> non-O1 (33 %)	Dalsgaard <i>et al.</i> (1995)
Indien	Einzelhandel	Shrimps (n = 83), Krebse (n = 8), Muscheln (n = 19)	Shrimps (63,8 %), Krebse (37,5 %), Muscheln (84,2 %)	<i>V. p.</i> (68,1 %), <i>V. a.</i> (18,1 %), <i>V. v.</i> (2 %), <i>V. c.</i> (1 %), <i>V. h.</i> (1 %), <i>V. m.</i> (1 %)	Sudha <i>et al.</i> (2014)
Thailand	Einzelhandel	Shrimps (n = 30), Fisch (n = 30), Austern (n = 30), Muscheln (n = 30)	92 %	<i>V. p.</i> (68 %), <i>V. c.</i> (51 %), <i>V. a.</i> (15 %), <i>V. v.</i> (14 %), <i>V. m.</i> (8 %), <i>V. f.</i> (7 %)	Woodring <i>et al.</i> (2012)

Tabelle 4 wird auf der folgenden Seite weitergeführt.

Probenherkunft	Probennahme	Probentyp	Positiver Nachweis	<i>Vibrio</i> sp.	Referenz
Thailand	Einzelhandel	Rohe Meeresfrüchte (Muscheln, Fisch, Krustentiere, Tintenfisch) (n = 39), verarbeitete Meeresfrüchte (n = 16), verzehrfertige Produkte mit Meeresfrüchten (n = 63)	Verarbeitete Meeresfrüchte (25 %), verzehrfertige Produkte mit Meeresfrüchten (17,5 %)	<i>V. a.</i> (0-61,5 %), <i>V. p.</i> (0-43,6 %), <i>V. c.</i> (10,8-35,9 %), <i>V. m.</i> (9,2-23,1 %), <i>V. v.</i> (0-2,6 %)	Chitov <i>et al.</i> (2009)
Südostasien, Indischer, Pazifischer, Atlantischer Ozean, Nordsee	Einzelhandel, Großhandel, Restaurant	Shrimps (n = 121), Fisch (n = 31), Muscheln (n = 64)	Muscheln (6,5 %), Shrimps (32,2 %), Fisch (1,6 %)	<i>V. p.</i> (9,5 %), <i>V. c.</i> (3,6 %), <i>V. v.</i> (1,8 %)	Messelhäusser <i>et al.</i> (2010)
Grönland, Bangladesch, Indonesien, Indopazifik (Thailand), Italien, Holland, Nordsee, Dänemark	Einzelhandel, Gaststätten	Shrimps (n = 64), Muscheln (n = 18)	19,5 %	<i>V. a.</i> (8 %), <i>V. c.</i> (3 %), <i>V. p.</i> (1 %), <i>V. m.</i> (1 %), <i>V. f.</i> (1 %), <i>V. t.</i> (1 %), <i>V. g.</i> (1 %)	Sieffert und Stolle (2002)
Indischer Ozean, Lateinamerika, Ecuador, Asien, Atlantischer Ozean	Einzelhandel, Großhandel	Krustentiere (n = 91), Fisch (n = 64), Muscheln (n = 12)	34,7 %	<i>V. p.</i> (31,1 %), <i>V. v.</i> (12,6 %), <i>V. c.</i> (0,6 %)	Robert-Pillot <i>et al.</i> (2014)
China, Mexiko, Ecuador	Einzelhandel, Großhandel	Shrimps (n = 30)	63,3 %	<i>V. p.</i> (36,7 %), <i>V. a.</i> (26,7 %), <i>V. v.</i> (16,7 %), <i>V. c.</i> (10 %), <i>V. f.</i> (6,7 %)	Berry <i>et al.</i> (1994)

V. a.: *Vibrio alginolyticus*, *V. g.*: *Vibrio anguillarum*, *V. c.*: *Vibrio cholerae*, *V. f.*: *Vibrio fluvialis*, *V. h.*: *Vibrio harveyi*, *V. m.*: *Vibrio mimicus*, *V. t.*: *Vibrio metschnikovii*, *V. p.*: *Vibrio parahaemolyticus*, *V. v.*: *Vibrio vulnificus*

2.4.2 *Vibrio* spp. als Pathogene in Aquakulturen

Vibrio spp. zählen weltweit zu den bedeutendsten bakteriellen Erregern in Aquakulturen und sind für große wirtschaftliche Schäden verantwortlich (Chatterjee und Haldar 2012). Nahezu alle Spezies, die kultiviert werden (Krustentiere, Fische, Mollusken), sind anfällig für *Vibrio*-Infektionen (Defoirdt *et al.* 2007).

Für verschiedene Fischarten zählen *V. anguillarum*, *V. salmonicida* und *V. vulnificus* zu den bedeutendsten Infektionserregern (Austin und Austin 2012). Für Shrimps (*Penaeus* spp.) wurden mindestens zehn *Vibrio* spp. mit Erkrankungen in Verbindung gebracht, wobei *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus* und *V. vulnificus* die größte Bedeutung zukommt (Lavilla-Pitogo 1995).

In vielen Fällen sind *Vibrio* spp. opportunistische Bakterien, die Erkrankungen nur dann verursachen, wenn die Wirtsspezies immunsupprimiert ist. Dies kann durch intensive Haltungssysteme bedingt sein (Bell und Lightner 1992; Kautsky *et al.* 2000; Aguirre-Guzman *et al.* 2004). Mortalitäten von bis zu 100 % betreffen häufig frühe Larvenstadien und treten zum Teil sehr plötzlich auf (Aguirre-Guzman *et al.* 2004; Thompson *et al.* 2004). Die schwerwiegendsten Verluste wurden für Shrimps-Zuchten (*Penaeus* spp.) beobachtet (Austin und Zhang 2006; Chatterjee und Haldar 2012). Die steigende Intensivierung der Shrimps-Zucht weltweit scheint das Auftreten neuer Erreger zu fördern (Nunan *et al.* 2014).

Ausbrüche in *P. monodon*-Aquakulturen mit Mortalitätsraten von bis zu 90 % wurden u. a. auf den Philippinen (Lavilla-Pitogo *et al.* 1990) und in Indien (Karunasagar *et al.* 1994) beobachtet. Krankheitsauslösend waren in beiden Fällen lumineszierende Bakterien (*V. harveyi*), die aus kranken oder toten Tieren isoliert wurden. *V. harveyi*-Isolate aus erkrankten Shrimps waren virulenter als Umweltstämme (Liu *et al.* 1996). Als mögliche Virulenzfaktoren identifizierten Liu *et al.* (1996) Proteasen, Phospholipasen, Hämolyse und Exotoxine. Die klinischen Symptome erkrankter Shrimps umfassten Lethargie, Gewebnekrose, Wachstumsverzögerung, Malformation, Bolitas negricans, Biolumineszenz, leerer Mitteldarm und Anorexie (Aguirre-Guzman *et al.* 2004).

Eine seit 2009 auftretende, bisher nicht beschriebene Shrimps-Erkrankung verursachte große Produktionsverluste (bis zu 80 %) in südostasiatischen und mexikanischen Shrimps-Aquakulturen (Flegel und Lo 2014; Nunan *et al.* 2014; Zorriehzahra und Banaederakhshan 2015). Für die zunächst Early Mortality Syndrome (EMS) genannte Krankheit wurde 2011 die Bezeichnung Akutes Hepatopankreatisches Nekrose-Syndrom (AHPNS) eingeführt, da die Ausbrüche durch eine akute progressive Degeneration des Hepatopankreas erkrankter Shrimps (*L. vannamei*, *P. monodon*) gekennzeichnet waren, die sich während der ersten 30 Tage der Kultivierung manifestierte (Lightner *et al.* 2012a; Tran *et al.* 2013). Nach dem erstmaligen Auftreten in China (2009) folgte eine schnelle geografische Ausbreitung mit Ausbrüchen in Vietnam (2010), Malaysia (2011), Thailand (2012) sowie in Mexiko (2013) und weiteren mittelamerikanischen Staaten (Flegel und Lo 2014; Nunan *et al.* 2014; CNA 2015). Die weltweite Produktion kultivierter Shrimps zeigte 2013 AHPNS-bedingt einen Rückgang um 19,3 % gegenüber dem Vorjahr. In Mexiko lag der AHPNS-bedingte Produktionsrückgang für 2013 bei 48 %, in Asien bei 21 %, mit dem größten Abfall in China und Thailand (Anderson *et al.* 2014).

Als Infektionsursache wiesen Tran *et al.* (2013) einen *V. parahaemolyticus*-Stamm nach. Yang *et al.* (2014) ermittelten in AHPNS-auslösenden *V. parahaemolyticus*-Isolaten ein extrachromosomales Plasmid, das die Sequenz eines Toxins trug, welches für das Auslösen des AHPNS verantwortlich sein könnte (Yang *et al.* 2014). Das Toxin weist

Homologien zu dem binären insektiziden Pir-Toxin auf, das für die Genera *Photorhabdus* und *Xenorhabdus* beschrieben wurde (Thitamadee *et al.* 2016).

AHPNS-auslösende Stämme sind extrem virulent und die Mortalitätsrate in betroffenen Becken kann bis zu 100 % betragen (Lightner *et al.* 2012a; Nunan *et al.* 2014). Betroffene Shrimps zeigen neben Lethargie und Inappetenz eine Atrophie des Hepatopankreas, das bedingt durch einen Pigmentverlust in den R-Zellen blass erscheint. In der terminalen Krankheitsphase zeigt sich eine schwarze Streifung des Hepatopankreas (Lightner *et al.* 2012a; Tran *et al.* 2013). Die humanmedizinisch relevanten Virulenzmarker *tdh* und *trh* wurden in AHPNS-auslösenden Stämmen nicht nachgewiesen (Flegel 2013).

Es wurde vermutet, dass der Ausbruch von AHPNS in Mexiko durch den illegalen Import von Shrimps aus Asien verursacht wurde (Flegel 2013). Die meisten lateinamerikanischen Länder verfügen über strikte Quarantänebestimmungen oder Einfuhrverbote, um die Übertragung exotischer Pathogene zu verhindern (FAO 2006-2014). Um eine weitere Ausbreitung auf dem amerikanischen Kontinent zu unterbinden, haben die Länder Ecuador, Peru, Mexiko, Guatemala, Honduras und Panama weitere Maßnahmen, wie verschärfte Importverbote von lebenden Shrimps aus Ländern, in denen die Erkrankung detektiert wurde, getroffen (Acuerdo Ministerial No.043, 25. Juli 2013, Acuerdo Ministerial No.001 24. Juli 2014) (Navarro *et al.* 2013; MEF 2014).

2.5 Humane *Vibrio*-Infektionen

Aufgrund der ubiquitären Verbreitung von Vibrionen in der aquatischen Umwelt und ihrer Assoziation mit biotischen und abiotischen Substraten existieren verschiedene Infektionswege für humane *Vibrio*-Infektionen. Dazu zählen der direkte Kontakt mit Wasser, aquatischen Pflanzen oder Tieren und die Aufnahme kontaminierter Lebensmittel incl. Trinkwasser (Gomez *et al.* 2003; Baker-Austin 2010; Reilly *et al.* 2011). Verantwortlich für Lebensmittel-assoziierte *Vibrio*-Infektionen sind häufig rohe (v. a. Austern) oder unzureichend erhitzte Meeresfrüchte (Shrimps und Miesmuscheln) (Huehn 2012). Als allgemeine Infektionsdosis wird von Ramamurthy und Nair (2007) eine Bakterienzahl von 10^6 angegeben. Die Infektionsdosis kann jedoch bei Vorliegen einer Achlorhydrie (Reduktion des Säuregehalts im Magen) oder prädisponierten Patienten niedriger liegen. Die Inkubationszeit variiert von 4 bis 96 Stunden, im Normalfall beläuft sie sich jedoch auf 12 bis 24 Stunden (Ramamurthy und Nair 2007). Abhängig von der Infektionsform und der beteiligten *Vibrio* sp. sind unterschiedliche Krankheitsbilder beschrieben. Tabelle 5 stellt die verschiedenen Infektionsarten beim Menschen dar, die durch humanpathogene *Vibrio* spp. verursacht werden können. Zu den wichtigsten Erkrankungen zählen Gastroenteritiden, Wund- und Weichteilinfektionen sowie Septikämien. Septikämien werden typischerweise bei Patienten mit einer Grunderkrankung wie Diabetes mellitus, Leber- oder Krebserkrankungen und anderen Immunschwächen beobachtet (Ramamurthy und Nair 2007). Für den überwiegenden Anteil humaner *Vibrio*-Infektionen waren in den USA von 1996-2010, Daten von FoodNet entsprechend, *V. parahaemolyticus* (54 %), *V. vulnificus* (12,7 %), *V. alginolyticus* (8,7 %) und *V. cholerae* non-O1/non-O139 (5,1 %) verantwortlich (Newton *et al.* 2012).

Weltweit wurde in den letzten Jahrzehnten eine Zunahme humaner *Vibrio*-Infektionen registriert (Vezzulli *et al.* 2013; Robert-Pillot *et al.* 2014). Die globale Cholera-Inzidenz zeigte, Daten der WHO entsprechend, von 2000 bis 2010 einen kontinuierlichen Anstieg. Von 2009 auf 2010 stieg die jährliche Cholera-Fallzahl, bedingt durch einen Ausbruch in

Haiti, um 43 %. Gegenüber 2000 stellten die 2010 weltweit gemeldeten Cholera-Fälle (317.534) einen Anstieg um 130 % dar (WHO 2011a).

In den USA zeigte sich von 1996 bis 2009 eine Zunahme der jährlichen humanen *Vibrio*-Infektionen um 85 % (CDC 2010). Von 2010 bis 2013 zeigte sich eine weitere Zunahme der *Vibrio*-Infektionen um 32 % (CDC 2014). Verschiedene Studien legten nahe, dass die Zunahme humaner *Vibrio*-Infektionen mit den Folgen der globalen Klimaerwärmung (steigende Meeresspiegel und Oberflächentemperaturen der Meere) in Zusammenhang stehen könnte (WHO 2010; Vezzulli *et al.* 2011; Baker-Austin *et al.* 2012b; Vezzulli *et al.* 2013). Für nicht-Cholera *Vibrio*-Infektionen werden daneben der wachsende internationale Handel und der steigende Konsum an Meeresfrüchten, die oft roh oder leicht erhitzt verzehrt werden, verantwortlich gemacht (Baker-Austin *et al.* 2010; Robert-Pillot *et al.* 2010). Die Zunahme an Personen, die aufgrund von Alter, Mangelernährung, Immunsuppression (etwa bei HIV/AIDS, Transplantations- oder Krebspatienten) und anderen Erkrankungen wie Diabetes mellitus, ein erhöhtes Risiko für *Vibrio*-Infektionen tragen, gilt ebenfalls als Ursache (Wright 2007; Baker-Austin *et al.* 2010; Norhana *et al.* 2010).

Tabelle 5. Infektionsarten pathogener *Vibrio* spp. beim Menschen

<i>Vibrio</i> sp.	Infektionsart						
	Gastroenteritis	Wundinfektion	Ohrinfektion	Primäre Septikämie	Bakteriämie	Lungeninfektion	Meningitis
<i>V. cholerae</i> O1/O139	++	(+)	?	?	?	?	?
<i>V. cholerae</i> nonO1/nonO139	++	+	+	(+)	(+)	?	(+)
<i>V. parahaemolyticus</i>	++	+	(+)	?	(+)	(+)	(+)
<i>V. vulnificus</i>	+	++	?	++	+	(+)	(+)
<i>V. fluvialis</i>	++	?	?	?	?	?	?
<i>V. alginolyticus</i>	?	++	+	?	(+)	?	?
<i>V. damsela</i>	?	++	?	?	?	?	?
<i>V. furnissii</i>	(+)	?	?	?	?	?	?
<i>V. hollisae</i>	++	?	?	(+)	?	?	?
<i>V. mimicus</i>	++	+	+	?	?	?	?
<i>V. metschnikovii</i>	(+)	?	?	(+)	?	?	?
<i>V. cincinnatiensis</i>	?	?	?	?	(+)	?	(+)
<i>V. carchariae</i>	?	++	?	?	?	?	?

++ häufigste Infektion, + regelmäßig vorkommende Infektion, (+) seltene Infektion, ? Hinweise auf Infektion

Modifiziert nach SCVPH (2001)

2.5.1 *Vibrio cholerae*

V. cholerae O1/O139

Globales Auftreten

V. cholerae O1/O139 haben als Auslöser der schweren Durchfallerkrankung Cholera die humanmedizinisch größte Bedeutung aller Vibrionen. In früheren Jahrhunderten war Cholera eine ständige Bedrohung - auch für die heutigen Industrienationen in Europa, Nordamerika und Nordasien (Reidl und Klose 2002). Gegenwärtig ist Cholera vor allem in Entwicklungsländern konzentriert und dort noch immer für viele Todesfälle und ökonomische Schäden verantwortlich (Reidl und Klose 2002; WHO 2009).

Die erste beschriebene Cholera-Pandemie begann 1817 und hatte ihren Ausgangspunkt, wie alle weiteren, ausgenommen der siebten Pandemie, auf dem indischen Subkontinent (Pollitzer 1959; Cvjetanovic und Barua 1972; Faruque *et al.* 1998). Bis 1923 ereigneten sich sechs Cholera-Pandemien, die sich hauptsächlich auf die südliche Hemisphäre sowie Nordamerika und Europa beschränkten (Reidl und Klose 2002). Auslöser der fünften und sechsten Pandemie und vermutlich auch der vorherigen Pandemien war der klassische Biotyp von *V. cholerae* O1 (Chin *et al.* 2011; Mutreja *et al.* 2011; Harris *et al.* 2012).

Die 1961 in Indonesien begonnene siebte Pandemie wurde durch einen neuen Biotyp von *V. cholerae* O1 ausgelöst (Cvjetanovic und Barua 1972). Dieser als El Tor bezeichnete Biotyp wurde 1905 erstmalig in Ägypten von indonesischen Pilgern isoliert (Pollitzer 1959). Die durch diesen neuen Biotyp von *V. cholerae* O1 ausgelöste siebte Pandemie ist in Bezug auf ihre geografische und zeitliche Ausdehnung die umfangreichste aller bisher beschriebenen Pandemien (Faruque *et al.* 1998). Sie verbreitete sich von Indonesien ausgehend in weiten Teilen Asiens und erreichte ab 1970 Afrika und Europa (Cvjetanovic und Barua 1972). Lateinamerika war ab 1991 ebenfalls betroffen (Evins *et al.* 1995). Insbesondere in Afrika und Lateinamerika zeigte sich, aufgrund einer fehlenden Immunität der Bevölkerung und einer z. T. unzureichenden medizinischen Versorgung, eine sehr schnelle Verbreitung (PAHO 1991; Kaper *et al.* 1995). Auf beiden Kontinenten stellten die Ausbrüche der siebten Cholera-Pandemie die ersten beschriebenen Cholera-Fälle im 20. Jahrhundert dar (PAHO 1991; Mengel *et al.* 2014).

Der Ausbruch in Westafrika umfasste über 150.000 Erkrankungsfälle mit 20.000 Toten (Goodgame und Greenough 1975). In Lateinamerika traten die ersten Cholera-Infektionen 1991 an der peruanischen Küste auf und weiteten sich entlang dieser sowie über das Landesinnere auf gesamt Süd- und Mittelamerika aus (Tauxe *et al.* 1995). Von 1991 bis 1992 lag die geschätzte Zahl der Infektionen bei 750.000 mit 6.500 Todesfällen (PAHO 1991).

Neben *V. cholerae* O1 trat seit 1992 erstmals eine weitere Serogruppe auf, die als Auslöser von Cholera galt (Berche *et al.* 1994; Nair *et al.* 1994). Diese O139 Serogruppe, die keiner der zuvor bekannten Serogruppen glich, entstand vermutlich durch horizontalen Gentransfer zwischen einem *V. cholerae* non-O1 und einem *V. cholerae* O1 El Tor Stamm (Shimada *et al.* 1993; Bik *et al.* 1995). Erstmals beschrieben wurden durch O139 ausgelöste Fälle in Indien und Bangladesch (Albert *et al.* 1993; Nair *et al.* 1994). *V. cholerae* O139 verbreitete sich schnell in weiten Teilen Südostasiens und führte zu Hunderttausenden Erkrankungsfällen (Bik *et al.* 1995; Sarkar *et al.* 2011). Weiterhin wurden durch Reisende importierte Fälle in Nordamerika und Europa beschrieben (CDC 1993; Cheasty *et al.* 1993). Heute sind *V. cholerae*-O139-Infektionen auf Asien

beschränkt (Cho *et al.* 2010).

Die siebte Cholera-Pandemie besteht weiter fort mit saisonalen Ausbrüchen in endemischen Gebieten und unregelmäßig auftretenden Epidemien wie zuletzt in Simbabwe (2008) und Haiti (2010) (Nelson *et al.* 2009; WHO 2009; Chin *et al.* 2011). Ali *et al.* (2015) schätzten die Anzahl der Länder, in denen Cholera endemisch auftritt, auf 69. Diese Länder liegen vor allem in Afrika und Südostasien (Ali *et al.* 2015).

Vorkommen in der Umwelt

V. cholerae einschließlich der pandemischen Stämme der Serogruppen O1 und O139 sind ein natürlicher Bestandteil der aquatischen Umwelt und kommen in küstennahen und Flussmündungsgebieten vor (Reidl und Klose 2002; Constantin de Magny und Colwell 2009). Der Nachweis aus Wasser, Sediment, Zooplankton sowie verschiedenen Meeresfrüchten wurde vielfach beschrieben (Huq *et al.* 1983; Dalsgaard *et al.* 1995b; Bhaskar *et al.* 1998; Elhadi *et al.* 2004; Vezzulli *et al.* 2010). Es wird vermutet, dass die Assoziation von *V. cholerae* mit verschiedenen biotischen und abiotischen Substraten in Zusammenhang mit der Bildung von Biofilmen und der Fähigkeit, in den VBNC-Zustand einzutreten, eine wichtige Rolle in der Epidemiologie von Cholera spielt (Alam *et al.* 2006; Vezzulli *et al.* 2010). Zooplankton gilt dabei als wichtiges Reservoir in den Perioden zwischen Epidemien (Huq *et al.* 1983). Der Beginn von Ausbrüchen ist klimaabhängig und stark durch Umweltfaktoren beeinflusst (Gil *et al.* 2004; Huq *et al.* 2005; Constantin de Magny und Colwell 2009).

Krankheitsbild

Die meisten Infektionen werden durch orale Aufnahme von kontaminiertem Wasser oder kontaminierten Lebensmitteln (u. a. Meeresfrüchten) verursacht (Tauxe *et al.* 1995; Reidl und Klose 2002). Die Infektionsdosis von *V. cholerae* O1 liegt im Normalfall bei 10^5 bis 10^8 (Nelson *et al.* 2011). Beim Vorliegen einer Achlorhydrie (Reduktion des Säuregehalts im Magen) kann eine Infektionsdosis von 10^4 *V. cholerae* Zellen ausreichend sein (WHO 2011b). Die Inkubationszeit variiert zwischen 12 Stunden und 5 Tagen (Harris *et al.* 2012). Als charakteristisches Symptom zeigen sich bei Cholera reiswasserartige Durchfälle, die mit einem unterschiedlichen Dehydratationsgrad einhergehen (Mandal *et al.* 2011). Der Schweregrad der Erkrankung reicht von asymptomatischen Infektionen bis zu fatalen Verlaufsformen (WHO 2015). In der schwersten Form (Cholera gravis) zählt Cholera zu einer der am schnellsten zum Tod führenden Erkrankungen. Neben dem charakteristischen wässrigen Durchfall werden auch abdominale Krämpfe und Erbrechen beschrieben (Mandal *et al.* 2011). Flüssigkeitsverluste von bis zu 1 Liter pro Stunde können zu einer schweren Hypovolämie mit metabolischer Azidose und in der Folge zu einem Kreislaufkollaps mit Todesfolge führen. Ausgelöst wird dieser Prozess durch die Besiedelung des Dünndarms und der Produktion von Choleratoxin (CTX), dem primären Virulenzfaktor pathogener Stämme (Sack *et al.* 2004).

In schweren Fällen (Cholera gravis) liegt die Mortalitätsrate ohne Behandlung bei bis zu 50 % (Sack *et al.* 2004). Wird eine entsprechende Flüssigkeitszufuhr mit Elektrolytausgleich sowie eine wirksame antibiotische Therapie rechtzeitig verabreicht, können nahezu alle Todesfälle vermieden werden und die Sterblichkeitsrate liegt unter 1 % (WHO 2015). Trotz dieser effektiven und simplen Therapierbarkeit verursacht Cholera noch immer zahlreiche Todesopfer, da in vielen Ausbruchsgebieten keine ausreichende medizinische Versorgung gewährleistet ist (Sack *et al.* 2004).

***Vibrio cholerae* non-O1/non-O139**

Globales Auftreten

Vibrio cholerae non-O1/non-O139-Infektionen treten regelmäßig weltweit auf (Ceccarelli *et al.* 2015). Non-O1/non-O139-Stämme gelten als Auslöser sporadischer Fälle oder gelegentlicher Ausbrüche von Durchfallerkrankungen sowie von invasiven extraintestinalen Erkrankungen (Blake *et al.* 1980; Khan *et al.* 2013). Fallbeschreibungen zum Vorkommen sporadischer gastrointestinaler sowie extraintestinaler Infektionen stammen aus vielen Ländern, darunter Argentinien, Thailand, Slowenien, Indien, Niederlande, Frankreich und China (Rivas *et al.* 1996; Dalsgaard *et al.* 1999; Strumbelj *et al.* 2005; Chatterjee *et al.* 2009; Rozemeijer *et al.* 2009; Petsaris *et al.* 2010; Lu *et al.* 2014). Lokale Ausbrüche von Durchfallerkrankungen treten ebenfalls auf und sind u. a. für Peru, die USA und Haiti beschrieben worden (Dalsgaard *et al.* 1995a; Onifade *et al.* 2011; Hasan *et al.* 2012).

Vorkommen in der Umwelt

V. cholerae-non-O1/non-O139-Stämme sind Teil der aquatischen Umwelt und werden häufig aus Flüssen und küstennahen Gebieten sowie verschiedenen Meeresfrüchten isoliert (Reidl und Kloese 2002; Ottaviani *et al.* 2009; Woodring *et al.* 2012).

Krankheitsbild

Infektionen erfolgen durch den Konsum von kontaminierten Meeresfrüchten oder den Kontakt mit der erregerhaltigen aquatischen Umwelt (Lukinmaa *et al.* 2006; Ottaviani *et al.* 2009). Die am häufigsten auftretende Infektionsform ist eine selbstlimitierende Gastroenteritis mit Durchfall, abdominalen Krämpfen und z. T. Fieber. Blutige Durchfälle sind ebenfalls beschrieben (Daniels und Shafaie 2000). Nur ein geringer Teil der in der Umwelt vorkommenden *V. cholerae*-non-O1/non-O139-Stämme (1-3 %) besitzt die Fähigkeit, CTX zu produzieren (Alam *et al.* 2006; Ceccarelli *et al.* 2015). Daher sind die Symptome in der Regel milder als bei Infektionen mit toxigenen Stämmen der Serogruppen O1/O139 (Huehn 2012). Der Schweregrad gastrointestinaler Infektionen variiert jedoch stark und reicht von asymptomatischen Verläufen bis zu schweren Cholera-ähnlichen Erkrankungen oder auch blutigen Durchfällen (Dutta *et al.* 2013). Extraintestinale Manifestationen treten in Form von Wund- oder Ohrinfektionen auf. In seltenen Fällen werden auch primäre Septikämien bei immunsupprimierten Patienten beschrieben (Sieffert 2003). Die Mortalitätsrate liegt in diesen Fällen bei 23,8-61,5 % (Khan *et al.* 2013).

2.5.2 *Vibrio parahaemolyticus*

Globales Auftreten

V. parahaemolyticus ist als Ursache von Lebensmittel-assoziierten Gastroenteritiden weltweit verbreitet (Qadri *et al.* 2005). Insbesondere in asiatischen Ländern mit einem hohen Meeresfrüchte-Konsum treten regelmäßig Ausbrüche auf (Chiou *et al.* 2000; Nair *et al.* 2007; Jun *et al.* 2012; Hara-Kudo und Kumagai 2014). In den USA gilt *V. parahaemolyticus* ebenfalls als Hauptverursacher von Gastroenteritiden, die mit dem Konsum von Meeresfrüchten assoziiert sind (Letchumanan *et al.* 2014). Von 1973 bis 2006 war *V. parahaemolyticus* für 45 Ausbrüche mit 1393 Erkrankungsfällen verantwortlich und stellte damit die häufigste Ursache (23,9 %) von mit Meeresfrüchten assoziierten Infektionen dar (Iwamoto *et al.* 2010).

Der erste beschriebene *V. parahaemolyticus*-Ausbruch ereignete sich 1950 in Japan und

betraf 272 Menschen, 20 von ihnen starben (Alter 2012). Seither wurde weltweit regelmäßig von sporadischen Fällen und Ausbrüchen berichtet, die mit dem Konsum verschiedener Meeresfrüchte in Zusammenhang standen. Fallbeschreibungen stammen u. a. aus Japan, Indien, Vietnam, den USA, Togo, Bangladesch, der Karibik, Mexiko, Spanien, Brasilien, Nigeria und Taiwan (Sakazaki 1969; Chatterjee *et al.* 1970; Neumann *et al.* 1972; Barker 1974; Bockemuhl *et al.* 1975; Hughes *et al.* 1978; Lawrence *et al.* 1979; Abbott *et al.* 1989; Molero *et al.* 1989; Magalhaes *et al.* 1991; Utsalo *et al.* 1992; Wong *et al.* 2000) – Auslöser waren dabei Stämme verschiedener Serogruppen.

Ab 1996 änderte sich die Epidemiologie von *V. parahaemolyticus* (Bisha *et al.* 2012). Ein pandemischer Klon der Serogruppe O3:K6 führte erstmals in Indien und darauffolgend in den meisten südostasiatischen Ländern sowie später weltweit zu Lebensmittel-assoziierten Ausbrüchen (Okuda *et al.* 1997; Matsumoto *et al.* 2000; Martinez-Urtaza *et al.* 2008a). *V. parahaemolyticus* der Serogruppe O3:K6 und daraus entstandene Serovarianten (> 20), darunter O4:K68, O1:K25, O1:KUT, sind seit 1996 für eine erhöhte Inzidenz von Gastroenteritiden in vielen Ländern verantwortlich und wurden in Asien, Afrika, Europa und Amerika nachgewiesen (Nair *et al.* 2007; Su und Liu 2007). Auf dem amerikanischen Kontinent trat der pandemische Klon erstmalig 1996 in Peru auf (Gil *et al.* 2007). Nachfolgend ereigneten sich ab 1997 Ausbrüche in Chile mit insgesamt mehr als 12.000 Erkrankungsfällen (Heitmann *et al.* 2005). Weitere Ausbrüche ereigneten sich ab 1998 in den USA (> 400 Fälle) und ab 2001 in Brasilien (18 Fälle) (Daniels *et al.* 2000; Leal *et al.* 2008). In Mexiko wurde der pandemische Klon erstmals 2004 (>1.200 Fälle) nachgewiesen (Cabanillas-Beltran *et al.* 2006). *V. parahaemolyticus* O3:K6 wird als erster pandemischer *V. parahaemolyticus* Serotyp erachtet (Matsumoto *et al.* 2000; Bisha *et al.* 2012).

Baker-Austin *et al.* (2010) zufolge wurden zur gleichen Zeit in vielen Regionen neben den pandemischen Stämmen auch nicht-pandemische Stämme mit großen Ausbrüchen in Verbindung gebracht. Darunter Ausbrüche in den USA (1997), Spanien (1999) und Alaska (2004) (Baker-Austin *et al.* 2010).

Vorkommen in der Umwelt

V. parahaemolyticus kommt als halophile Spezies ubiquitär in marinen und küstennahen Gewässern sowie in Flussmündungsgebieten vor (Ceccarelli *et al.* 2013). Der Nachweis des Bakteriums aus Meerwasser, Sediment, Plankton und zahlreichen Meeresfrüchten wurde vielfach beschrieben und umfasste verschiedene Fischspezies sowie Krusten- und Schalentiere (Kaneko und Colwell 1973; DePaola *et al.* 2000; Hara-Kudo *et al.* 2003; Di Pinto *et al.* 2008; Parveen *et al.* 2008; Woodring *et al.* 2012; Robert-Pillot *et al.* 2014; Sudha *et al.* 2014). Die Assoziation mit Zooplankton scheint in der Epidemiologie des pandemischen Stammes von *V. parahaemolyticus* eine bedeutende Rolle zu spielen (Martinez-Urtaza *et al.* 2008a).

Krankheitsbild

Zu den Krankheitsbildern, die *V. parahaemolyticus* verursacht, zählen Gastroenteritiden, Wundinfektionen und Septikämien (Qadri *et al.* 2005). Die bedeutendste und häufigste Infektionsform ist eine Lebensmittel-assoziierte Gastroenteritis. Zur Übertragung des Erregers kommt es dabei durch den Konsum roher oder unzureichend erhitzter Meeresfrüchte (Velazquez-Roman *et al.* 2013). Die Inkubationszeit kann zwischen 4 und 96 Stunden betragen (Nair *et al.* 2007).

Zu den häufigsten Symptomen gehören wässriger Durchfall, abdominale Krämpfe, Übelkeit, Erbrechen, Kopfschmerzen und leichtes Fieber (Honda und Iida 1993). In seltenen Fällen zeigen sich blutige Durchfälle. In immunkompetenten Patienten nimmt

die Erkrankung in der Regel einen milden Verlauf, ist selbstlimitierend und dauert ca. 3 Tage an (Nair *et al.* 2007). In schweren Fällen kann eine antibiotische Therapie indiziert sein. Zu Todesfällen kommt es nur äußerst selten (< 1 %) (Baker-Austin *et al.* 2010; Newton *et al.* 2012).

Die Ursache des beschriebenen Krankheitsbilds sind Typ III-Sekretionssysteme, die durch die Injektion bakterieller Toxine zu einer Schädigung der Darmschleimhaut führen (Huehn 2012). Dieser Mechanismus ist für die inflammatorische Diarrhö verantwortlich, die bei *V. parahaemolyticus*-Infektionen typischerweise auftritt, sowie für die seltener beobachteten systemischen Manifestationen wie Septikämien (Makino *et al.* 2003).

Durch *V. parahaemolyticus* ausgelöste Wundinfektionen treten selten auf. Sie werden vermutlich, ähnlich wie *V. vulnificus*-Infektionen, durch eine Kontamination bereits bestehender Hautwunden oder von Wunden, die während des Kontakts mit der aquatischen Umwelt oder Meeresfrüchten entstehen, verursacht. Schwere Verlaufsformen mit Septikämie oder nekrotisierender Fasziiitis werden sehr selten beschrieben und treten nur bei Patienten mit Grunderkrankungen wie Diabetes mellitus, Leber- oder Krebserkrankungen oder Immunschwächen auf (Blake *et al.* 1980; Ahmad *et al.* 2013).

2.5.3 *Vibrio vulnificus*

Globales Auftreten

V. vulnificus verursacht weltweit sporadisch auftretende Infektionen beim Menschen, mit einer Häufung von Fällen in den USA, Europa und Ostasien (Baker-Austin *et al.* 2012a). Trotz geringer Fallzahlen kommt dem Erreger aufgrund seiner hohen Mortalitätsrate eine große Bedeutung zu (Rippey 1994). In den USA ist *V. vulnificus* für die Mehrzahl aller Todesfälle von Lebensmittel-assoziierten Infektionen verantwortlich (Strom und Paranjpye 2000; Jones und Oliver 2009). Die jährlich gemeldete Fallzahl lag in den USA von 1988-1996 durchschnittlich bei 50 (Shapiro *et al.* 1998). Wie auch für andere *Vibrio* spp. beobachtet, scheint sich die Inzidenz von *V. vulnificus*-Infektionen zu erhöhen (Bross *et al.* 2007; Vezzulli *et al.* 2013). In den USA wurde von 1996 bis 2006 ein Anstieg der jährlich gemeldeten Infektionen um etwa 78 % registriert. Die gemeldete Fallzahl lag 2005 bei 121 (Jones und Oliver 2009).

Das Auftreten von Ausbrüchen war vor 1996 für *V. vulnificus* nicht bekannt. Zwischen 1996 und 1997 ereignete sich jedoch in Israel ein Ausbruch von Wundinfektionen und Septikämien, ausgelöst durch einen neuen *V. vulnificus*-Stamm, der als Biotyp 3 klassifiziert wurde. Als Infektionsquelle wurde roher Fisch (*Tilapia zillii*) aus Aquakulturanlagen identifiziert (Bisharat *et al.* 1999; Bisharat *et al.* 2011). Dieser Biotyp führt in Israel auch weiterhin zu Infektionen - Fälle aus anderen Ländern sind bisher nicht bekannt (Bisharat *et al.* 2007). Meteorologische Daten legten nahe, dass die durch *V. vulnificus*-Stämme des Biotyps 3 verursachten Ausbrüche durch überdurchschnittlich hohe Temperaturen (> 40 C°) in den Sommermonaten ausgelöst wurden (Paz *et al.* 2007). Beschreibungen weiterer *V. vulnificus*-Infektionen, die mit überdurchschnittlich hohen Wassertemperaturen assoziiert waren, stammten u. a. aus Dänemark (Bock *et al.* 1994) und Deutschland (Hoyer *et al.* 1995). Es wird angenommen, dass die erhöhte Inzidenz in Endemiegebieten ebenso wie in Nicht-Endemiegebieten auf die globale Klimaerwärmung zurückzuführen ist (Baker-Austin *et al.* 2012b; Vezzulli *et al.* 2013).

Vorkommen in der Umwelt

Das Bakterium kommt in marinen Gewässern und Flussmündungsgebieten unter einer großen Breite an Salzgehalten und Temperaturen vor und kann aus Wasser, Plankton, Sediment und einer Reihe von Meeresfrüchten, darunter Shrimps, Fisch, Austern und Muscheln, isoliert werden (Aznar *et al.* 1994; Jones und Oliver 2009). Der Konsum kontaminierter Meeresfrüchte (v. a. rohe Austern) kann zu primären Septikämien und Gastroenteritiden führen. Wundinfektionen entstehen durch den Kontakt mit der erregerhaltigen aquatischen Umwelt oder mit kontaminierten Meeresfrüchten (Aznar *et al.* 1994).

Krankheitsbild

Verantwortlich für *V. vulnificus*-Infektionen beim Menschen sind drei Biotypen. Der überwiegende Teil aller Infektionen wird durch Stämme des Biotyps 1 verursacht, der weltweit verbreitet ist (Baker-Austin *et al.* 2010). Biotyp 1 gilt als Auslöser aller drei für *V. vulnificus* beschriebenen Krankheitsbilder - Gastroenteritiden, Wundinfektionen, primäre Septikämien (definiert als Septikämie mit unbekanntem Infektionsfokus) (Laffera *et al.* 2000; Horseman und Surani 2011). Stämme des Biotyps 2 sind primär pathogen für Aale und führen nur selten zu Wundinfektionen beim Menschen (Horseman und Surani 2011). Seine Verbreitung beschränkt sich auf Ostasien und Westeuropa (Biosca *et al.* 1991; Amaro und Biosca 1996). Biotyp 3 verursacht schwere Wundinfektionen und sekundäre Septikämien (Bisharat *et al.* 1999).

Wundinfektionen (45 %) und primäre Septikämien (43 %) treten mit einer ähnlichen Häufigkeit auf. Gastroenteritiden (5 %) treten hingegen selten auf (Shapiro *et al.* 1998).

Die genaue Infektionsdosis für *V. vulnificus*-Infektionen ist nicht bekannt, jedoch spielen prädisponierende Faktoren eine entscheidende Rolle (Strom und Paranjpye 2000). Diese umfassen Immunsuppression und Grunderkrankungen, die zu einem hohen Eisengehalt im Blutserum führen. Hierzu zählen Lebererkrankungen (Zirrhose, Hepatitis) sowie genetische Erkrankungen (Hämochromatose) (Thompson *et al.* 2004).

Die primäre Septikämie ist die Infektionsform mit der höchsten Mortalitätsrate (> 50 %) und ist überwiegend mit dem Konsum roher Austern verbunden (> 90 %). Patienten mit prädisponierenden Vorerkrankungen sind für mehr als 95 % der Krankheitsfälle verantwortlich (Shapiro *et al.* 1998; Jones und Oliver 2009). Die Inkubationszeit kann 7 Stunden bis 10 Tage betragen (Oliver 2005a). Die klinischen Symptome umfassen Fieber (84-94 %), Übelkeit (55-60 %), Erbrechen (53 %), Durchfall (60 %) und Hypotonie (systolischer Blutdruck < 85 mmHg) (43 %) (Hlady und Klontz 1996; Oliver 2005a). Charakteristische Hautveränderungen (Phlegmone, Ekchymose, Bullae) entstehen bei ca. 50 % der Erkrankten und treten insbesondere an den Gliedmaßen auf. Sie können sich bis zu einer nekrotisierenden Fasiitis mit Muskelnekrose entwickeln und eine Amputation der betroffenen Gliedmaße erfordern (Oliver 2005a; Bross *et al.* 2007).

Das zweite, mit *V. vulnificus* assoziierte Krankheitsbild, ist eine Wundinfektion. Die Symptome einer durch *V. vulnificus* ausgelösten Wundinfektion sind denen einer primären Septikämie ähnlich. Sie unterscheiden sich jedoch im Schweregrad und dem zeitlichen Ablauf (Klontz *et al.* 1988). Zu einer Infektion kommt es durch die Kontamination bereits bestehender Hautwunden oder von Wunden, die während des Kontakts mit der aquatischen Umwelt oder Meeresfrüchten entstehen. Die Inkubationszeit kann wenige Stunden bis 12 Tage betragen (Oliver 2005b). Zu den Symptomen zählen Schmerz, Rötung und Schwellung um den Wundbereich. Häufig zeigt sich eine schnelle Ausbreitung der Infektion zu einer Phlegmone, Ekchymose und Bullae. Es kann auch hier zu einer nekrotisierenden Fasiitis kommen, z. T. mit einer Ausbreitung in tiefere Muskelschichten (Oliver 2005a; Jones und Oliver 2009). Patienten

mit nekrotisierender Faszitis entwickeln häufig eine sekundäre Septikämie (Strom und Paranjpye 2000). Im Gegensatz zur primären Septikämie ist die Entstehung von Wundinfektionen grundsätzlich unabhängig von Grunderkrankungen (Linkous und Oliver 1999; Oliver 2005a). Jedoch treten schwere Verlaufsformen mit sekundärer Septikämie überwiegend bei Patienten mit einer Grunderkrankung, die zu einem erhöhten Eisenwert im Blut führt, auf (Hlady und Klontz 1996; Oliver 2005a). Die Mortalitätsrate von 20-30 % bei Wundinfektionen (Strom und Paranjpye 2000) resultiert aus Infektionen, die sich zu einer Septikämie entwickeln (Oliver 2005a). Eine schnelle antibiotische Behandlung ist bei primären Septikämien und Wundinfektionen entscheidend für das Überleben der Patienten (Klontz *et al.* 1988).

Die dritte Infektionsform, die für *V. vulnificus* beschrieben wurde, ist eine milde Gastroenteritis mit Durchfall, Übelkeit, abdominalen Krämpfen und Fieber (Klontz *et al.* 1988). Aufgrund der milden Verlaufsform und des häufig selbstlimitierenden Charakters existieren nur wenige Fallberichte (Strom und Paranjpye 2000; Oliver 2005a).

2.5.4 *Vibrio alginolyticus*

Globales Auftreten

V. alginolyticus weist eine enge Verwandtschaft zu *V. parahaemolyticus* auf, wird jedoch einer eigenständigen Spezies zugeordnet (Huehn 2012). Als humanpathogener Erreger ist *V. alginolyticus* vor allem als Auslöser von Wund- und Ohrinfektionen von Bedeutung (Lee *et al.* 2008). *V. alginolyticus* war für 22 % der von 1981-1996 in Florida registrierten *Vibrio*-assoziierten Wundinfektionen verantwortlich (Hlady und Klontz 1996). Sporadisch auftretende Infektionen sind aus vielen Ländern weltweit bekannt (Blake *et al.* 1980). Fallbeschreibungen zu extraintestinalen Infektionen stammen u. a. aus Australien, Kolumbien, Südkorea, Großbritannien und der Türkei (McSweeney und Forgan-Smith 1977; Gomez *et al.* 2003; Lee *et al.* 2008; Reilly *et al.* 2011; Cital *et al.* 2015). Wie auch für andere *Vibrio* spp. beobachtet, zeigte sich in den letzten Jahrzehnten eine Zunahme der Inzidenz von *V. alginolyticus*-Infektionen in den USA und Europa (Reilly *et al.* 2011; Newton *et al.* 2012).

Vorkommen in der Umwelt

Das Bakterium kommt als halophile Spezies ubiquitär in der marinen Umwelt vor und wurde weltweit aus Meerwasser und Meeresfrüchten isoliert (Blake *et al.* 1980; Reilly *et al.* 2011).

Krankheitsbild

Zu den häufigsten für *V. alginolyticus* beschriebenen Krankheitsbildern zählen Wund- und Ohrinfektionen (Otitis media und Otitis externa) (Blake *et al.* 1980). Seltener kommt es zu anderen extraintestinalen Infektionen oder Gastroenteritiden (Hlady und Klontz 1996). Wundinfektionen resultieren häufig aus Hautwunden und Abschürfungen, die in Kontakt mit *V. alginolyticus*-haltigem Meerwasser kommen (Reilly *et al.* 2011). Die Inkubationszeit betrug bei vielen Fallbeschreibungen 24 Stunden (Blake *et al.* 1980). Zu den Symptomen bei Wundinfektionen zählen Rötung, Schwellung und Schmerz (Blake *et al.* 1980; Gomez *et al.* 2003; Reilly *et al.* 2011). *V. alginolyticus*-Infektionen zeigen überwiegend einen unkomplizierten Verlauf und heilen bei entsprechender Antibiotikagabe nach wenigen Tagen ab (Cital *et al.* 2015). In seltenen Fällen kann es jedoch zu einer sekundären Septikämie oder nekrotisierenden Faszitis kommen. Dies betrifft überwiegend immunsupprimierte Patienten (Howard *et al.* 1985; Gomez *et al.* 2003; Reilly *et al.* 2011).

2.5.5 *Vibrio mimicus*

Globales Auftreten

V. mimicus ist vor allem als Auslöser von sporadisch auftretenden Gastroenteritiden von Bedeutung (Hlady und Klontz 1996). Das Auftreten sporadischer Gastroenteritiden ist neben den USA auch aus Costa Rica bekannt (Campos *et al.* 1996). Lebensmittel-assoziierte Ausbrüche sind sehr selten. Der größte bisher beschriebene Ausbruch mit über 300 Erkrankungen ereignete sich in Thailand (Chitov *et al.* 2009a).

Vorkommen in der Umwelt

V. mimicus weist einen hohen Verwandtschaftsgrad zu *V. cholerae* auf und wurde zunächst als atypische Variante von *V. cholerae* O1 beschrieben (Davis *et al.* 1981). Beide Spezies sind nicht-halophil und kommen weitverbreitet in der aquatischen Umwelt vor, Süßwasser eingeschlossen (Farmer III und Janda 2004). *V. mimicus* wurde aus Wasser, Sediment, Pflanzen und verschiedenen Meeresfrüchten (Shrimps, Krebsen, Austern, Muscheln) isoliert (Guardiola-Avila *et al.* 2014).

Krankheitsbild

In erster Linie gilt das Bakterium als Auslöser von Gastroenteritiden, die mit dem Konsum roher oder unzureichend erhitzter Meeresfrüchte assoziiert sind (Rippey 1994; Daniels und Shafaie 2000). Zu den häufigsten Symptomen zählen Durchfall, Übelkeit, Erbrechen, abdominale Krämpfe, Fieber und in seltenen Fällen auch blutige Durchfälle (Shandera *et al.* 1983). Neben Durchfallerkrankungen wurden auch Ohrinfektionen beschrieben (Shandera *et al.* 1983; Rippey 1994).

2.6 Virulenzfaktoren humanpathogener *Vibrio* spp.

2.6.1 *Vibrio cholerae*

***Vibrio cholerae* O1/O139**

Für *V. cholerae* O1 und O139 existieren zwei primäre Virulenzfaktoren, das Cholera-toxin und der Toxin koregulierte Pilus (TCP), ein Typ IV-Pilus, der für die Kolonisierung des menschlichen Darms essentiell ist (Reidl und Klose 2002; Faruque und Mekalanos 2003). Beide Pathogenitätsfaktoren werden durch Gene codiert, die Teile größerer genetischer Elemente sind (Faruque *et al.* 1998; Faruque und Mekalanos 2003). Für das Enterotoxin CTX besteht dieses Genelement aus dem chromosomal integrierten Genom eines filamentösen Bakteriophagen (CTX Φ) (Waldor und Mekalanos 1996). Die für den TCP-codierenden Gene sind Bestandteil der *Vibrio*-Pathogenitätsinsel (VPI) (Kovach *et al.* 1996; Karaolis *et al.* 1998). Die typische Symptomatik einer schweren Diarrhö bei Cholera-Infektionen ist die direkte Folge der Produktion von Cholera-toxin (Singh *et al.* 2002). Das aus A- und B-Untereinheiten bestehende CTX, ein ADP-ribolysierendes Exotoxin, führt zu einer konstitutiven Aktivierung der Adenylatcyclase in intestinalen Zellen (Faruque *et al.* 1998; Kirn *et al.* 2000). Infolge einer gesteigerten cAMP-Produktion kommt es zu einer Aktivierung der Proteinkinase A, welche zu einer Phosphorylierung des „Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator“ (CFTR), einem Chlorid-Kanal, führt. Ein starker Cl⁻-Ausstrom ist die Folge. Weiterhin führt die gesteigerte cAMP-Produktion zu einer Blockade von Na⁺-Transportern (NHE2 und NHE3) (Cheng *et al.* 1991; Halscheidt 2007; Subramanya *et al.* 2007; Hodges und Gill 2010). Die damit verbundene erhöhte Konzentration von Chloridionen (Cl⁻) und Natriumionen (Na⁺) im Darmlumen hat einen passiven Wasserausstrom aus den Zellen

und somit eine starke wässrige Diarrhö zur Folge. Zu einer Schädigung des Epithels mit Zellverlusten kommt es jedoch nicht (Hodges und Gill 2010).

Der TCP ist bei diesem Prozess als Kolonisationsfaktor ebenfalls essenziell für die Pathogenese. Die Besiedelung des menschlichen Darms ist ohne TCP nicht möglich (Reidl und Klose 2002). Eine Hauptfunktion von TCP besteht in der Vermittlung des Kontaktes zwischen den Bakterienzellen, der für die Bildung von Mikrokolonien auf dem Epithel notwendig ist (Kirn *et al.* 2000). Weiterhin dient TCP dem filamentösen Bakteriophagen CTX Φ als Rezeptor (Waldor und Mekalanos 1996).

Die Expression von CTX und TCP wird über eine komplexe Kaskade (ToxR-Regulon) verschiedener Faktoren (ToxR, TcpP, ToxT) reguliert, die von Umweltparametern (u. a. pH, Temperatur, Osmolarität) beeinflusst wird (Karaolis *et al.* 1998; Peterson 2002; Weber und Klose 2011). Die Bildung von CTX und TCP unterliegt dabei dem im letzten Schritt der Kaskade gebildeten Regulatorprotein ToxT (DiRita *et al.* 1991; Weber und Klose 2011). Das für ToxT-codierende Gen (*toxT*) ist Teil der *Vibrio*-Pathogenitätsinsel (VPI) und innerhalb dieser für die Expression vieler weiterer Virulenzfaktoren verantwortlich (Bi *et al.* 2001; Peterson 2002; Weber und Klose 2011). Der komplexe Pathogenitätsprozess von *V. cholerae* beinhaltet neben CTX und TCP noch viele weitere Faktoren (Singh *et al.* 2002). Dazu zählen weitere Toxine, welche die Sekretion von Ionen fördern, wie ACE (akzessorisches Cholera-Enterotoxin), NAG-ST (NAG-stabiles Toxin) und VCC (*V. cholerae* Cytolysin) oder die Barrierefunktion des Epithels stören, wie HAP (Hämagglutinin-Protease), RTX („repeats in toxin“) und ZOT (Zonula occludens Toxin) und somit starke Diarrhö verursachen (Hodges und Gill 2010). Als zusätzliche Kolonisationsfaktoren bekannt sind ACFs (akzessorische Kolonisationsfaktoren), MFRHA (Mannose-Fucose-resistentes-Hämagglutinin), regulatorische Proteine (z. B. ToxR/S, TcpP/TcpH, ToxT), O-Antigen des Lipopolysaccharid (LPS), Biotin- und Purin-Biosynthesegene, verschiedene Außenmembranporine sowie eisenregulierte Außenmembranproteine (z. B. IrgA) (Thompson *et al.* 2004).

***Vibrio cholerae* non-O1/non-O139**

Als Auslöser epidemisch oder pandemisch auftretender Cholera gelten bisher ausschließlich toxigene *V. cholerae*-Stämme der Serogruppen O1 und O139 (Faruque *et al.* 1998; Son *et al.* 2011). Die Mehrheit der *V. cholerae*-non-O1/non-O139-Stämme produziert kein Cholera-toxin (Morris 1990). Zwar zeigten verschiedene Untersuchungen, dass *ctxA* und *tcpA* tragende non-O1/non-O139-Stämme in der Umwelt vorkommen (Sharma und Chaturvedi 2006; Ceccarelli *et al.* 2015), doch die überwiegende Mehrheit der klinischen non-O1/non-O139-Infektionen beruhen auf einem anderen Pathogenitätsmechanismus (Singh *et al.* 2002). Der exakte Mechanismus ist noch nicht bekannt (Ottaviani *et al.* 2009). Ramamurthy *et al.* (1993) entsprechend lässt das große Spektrum an Infektionsformen mit extraintestinalen Manifestationen, wie Septikämien (Khan *et al.* 2013), Ohr- (Florescu *et al.* 1981) und Wundinfektionen (Andersson und Ekdahl 2006) neben den häufig beobachteten gastrointestinalen Erkrankungen (Chatterjee *et al.* 2009), auf einen komplexen Pathogenitätsmechanismus schließen. Beteiligt sind zahlreiche Virulenzfaktoren, die in unterschiedlichen Kombinationen auftreten (Ramamurthy *et al.* 1993). Zu den mutmaßlichen Virulenzfaktoren zählen RTX („repeats in toxin“), HlyA (Hämolyisin), HAP (Hämagglutinin-Protease), ZOT (Zonula occludens Toxin), NAG-ST (NAG-stabiles Toxin), T3SS (Typ III-Sekretionssysteme) sowie T6SS (Typ VI-Sekretionssysteme) (Fullner *et al.* 2002; Jiang *et al.* 2003; Unterweger *et al.* 2012; Luo *et al.* 2013).

Auf eine multifaktorielle Virulenz von *V. cholerae*-non-O1/non-O139-Infektionen deuten auch die Ergebnisse vieler Studien hin (Ramamurthy *et al.* 1993; Chatterjee *et al.* 2009;

Dutta *et al.* 2013). Eine Untersuchung von 281 klinischen *V. cholerae*-non-O1/non-O139-Isolaten auf das Vorkommen von sieben Virulenzgenen (*ctxA*, *tcpA*, *rtxA*, *rtxC*, *stn*, *hlyA*, TTSS-codierende Gene) detektierte bis zu elf unterschiedliche Kombinationen der Virulenzfaktoren und bis zu fünf pro Isolat. Neben der Diversität in Bezug auf das Vorkommen von Virulenzfaktoren zeigte sich auch, dass eine große Zahl unterschiedlicher Serovare (> 80) für die Infektionen verantwortlich waren (Dutta *et al.* 2013). Ähnliche Ergebnisse fanden sich auch bei Untersuchungen von Umweltisolaten, für die bis zu zwölf potentielle Virulenzfaktoren in einzelnen Isolaten detektiert wurden (Ceccarelli *et al.* 2015). Diese Ergebnisse heben die Bedeutung von *V. cholerae*-non-O1/non-O139-Stämmen als Reservoir für Virulenzgene im aquatischen Milieu hervor. Weiterhin demonstrieren sie, dass *V. cholerae*-non-O1/non-O139-Stämme aus der aquatischen Umwelt das Potential besitzen können, humane Infektionen auszulösen (Ceccarelli *et al.* 2015).

2.6.2 *Vibrio parahaemolyticus*

V. parahaemolyticus-Stämme produzieren eine Reihe von Virulenzfaktoren, die vermutlich Teil eines komplexen Pathogenitätssystems sind (Drake *et al.* 2007; Ceccarelli *et al.* 2013). Zu den bekannten Virulenzfaktoren zählen u. a. Adhäsine, TDH, TRH, Type III-Sekretionssysteme (T3SS1 und T3SS2), Kapselbildung und zwei verschiedene Flagellen-Typen (Makino *et al.* 2003).

Seit langem gelten das thermostabile direkte Hämolyisin, das zu einer Beta-Hämolyse von humanen Erythrozyten auf Wagatsuma-Agar führt (Kanagawa-Phänomen), und das TDH-verwandte Hämolyisin als primäre Virulenzfaktoren (West 1989; Xu *et al.* 1994a; Makino *et al.* 2003). Für TDH und TRH wurden neben hämolytischen Eigenschaften auch enterotoxische und zytotoxische Aktivitäten beschrieben (Park *et al.* 2004a). Verschiedene Untersuchungen zeigten jedoch, dass die pathogene Wirkung von virulenten *V. parahaemolyticus*-Stämmen, wie Zytotoxizität und Enterotoxizität sowie eine Störung der epithelialen Barrierefunktion in Caco-2 Zellen, nicht alleine auf die Wirkung von TDH zurückzuführen ist und dass vermutlich weitere wichtige Virulenzfaktoren existieren (Park *et al.* 2004a; Lynch *et al.* 2005). Ähnliche Ergebnisse zeigten sich auch für die durch TRH verursachte Enterotoxizität (Xu *et al.* 1994b).

Aufgrund des gemeinsamen oder getrennten Auftretens von TDH und TRH bei dem überwiegenden Teil (> 90 %) aller klinischen Isolate gelten die beiden Toxine jedoch weiterhin als allgemein anerkannte Virulenzmarker (Ceccarelli *et al.* 2013).

Als weitere potentielle Virulenzfaktoren gelten die von Makino *et al.* (2003) identifizierten Typ III-Sekretionssysteme (T3SS1 und T3SS2), die als zentrale Virulenzfaktoren anderer bakterieller Durchfallerreger (*Shigella*, *Salmonella*) bekannt sind (Makino *et al.* 2003). Mittels Typ III-Sekretionssystemen werden bakterielle Proteine über eine injektionsnadelartige Struktur in eukaryotische Zellen eingebracht (Cornelis 2006). T3SS1 ist unter klinischen Stämmen und Umweltstämmen ubiquitär weitverbreitet und mit Zytotoxizität verbunden (Paranjpye *et al.* 2012; Ceccarelli *et al.* 2013). Für T3SS2 wurde gezeigt, dass es entscheidend für die Enteropathogenität von *tdh*- und *trh*-positiven *V. parahaemolyticus*-Stämmen ist (Park *et al.* 2004b; Okada *et al.* 2009). Dabei ist das als T3SS2- α bezeichnete Sekretionssystem Teil einer großen Pathogenitätsinsel (VPaI-7), die von zwei *tdh* Genen flankiert auf dem Chromosom II liegt (Makino *et al.* 2003; Ceccarelli *et al.* 2013). Für *trh*-tragende *V. parahaemolyticus*-Stämme wurde die Existenz einer der VPaI-7 (ursprünglich Vp-PAI_{RIMD2210633}) ähnlichen Struktur (Vp-PAI_{TH3996}) nachgewiesen, die Gene für ein weiteres Typ III-Sekretionssystem beinhaltet (T3SS2- β). T3SS2- β zeigt einen nahen

Verwandtschaftsgrad zu T3SS2- α und ist essenziell für die Pathogenität von *trh* positiven *V. parahaemolyticus*-Stämmen (Okada *et al.* 2009).

Trotz der weitreichenden Untersuchungen zum Pathogenitätsmechanismus und den beteiligten Virulenzfaktoren von *V. parahaemolyticus*-Infektionen besteht die Möglichkeit, dass noch nicht alle entscheidenden Faktoren beschrieben wurden. Klinische Isolate, die keinen der bekannten Virulenzmarker (*tdh*, *trh*, T3SS2) trugen, wurden mehrfach beschrieben (Jones *et al.* 2012; Ottaviani *et al.* 2012).

2.6.3 *Vibrio vulnificus*

Die Virulenz von *V. vulnificus* ist mit einer großen Anzahl an Virulenzfaktoren assoziiert (Horseman und Surani 2011). Wichtige Faktoren sind dabei die Säureneutralisation, die Expression einer Polysaccharidkapsel, Eisenbindung (Siderophore), Zytotoxizität, Motilität sowie die Expression von Proteinen zur Haftung und Adhäsion. Vermutet wird, dass die gezielte Expression der Virulenzfaktoren durch übergeordnete Regulatoren entscheidend für die Pathogenese ist (Jones und Oliver 2009; Baker-Austin *et al.* 2010).

Die Bildung einer Polysaccharidkapsel gilt als primärer Virulenzfaktor und ist einer der wenigen Faktoren, die als essenziell bekannt sind. Die Funktion der Kapsel beruht auf dem Schutz vor Phagozytose durch Makrophagen des Wirtsorganismus sowie vor der bakteriziden Wirkung des Blutserums (Thompson *et al.* 2004; Jones und Oliver 2009). *V. vulnificus*-Stämme, welchen die Eigenschaften zur Kapselbildung, der Eisenbindung von gesättigtem Transferrin sowie der Serumresistenz fehlen, scheinen avirulent zu sein (Yoshida *et al.* 1985; Simpson *et al.* 1987). Weiterhin wurde gezeigt, dass die Lipopolysaccharid-Hülle von *V. vulnificus* verschiedene Endotoxine enthält, die an der Entstehung von Fieber, Gewebsödemen und Hämorrhagien beteiligt sind (SCVPH 2001). Die Rolle zahlreicher extrazellulärer Enzyme: Hämolysin, Elastase, Kollagenase, DNase, Lipase, Phospholipase, Muzinase, Chondroitinsulfatase, Hyaluronidase, Fibrinolysin, Protease mit Aktivität gegenüber Serumalbumin, die von *V. vulnificus* gebildet werden, ist unklar, da sie zum Großteil sowohl bei klinischen als auch bei Umweltstämmen vorkommen (Oliver *et al.* 1986; Linkous und Oliver 1999). Insbesondere für ein Hämolysin (VvhA) und eine Metalloprotease (VvpE) wurde eine bedeutende Rolle in der Pathogenese vermutet (Maruo *et al.* 1998; Linkous und Oliver 1999; Jones und Oliver 2009). Neuere Untersuchungen zeigten jedoch, dass vermutlich RTX-A1, ein zur RTX-Familie gehörendes Toxin, der entscheidende Faktor für den zytotoxischen Effekt bei *V. vulnificus*-Infektionen ist (Horseman und Surani 2011).

Horseman und Surani (2011) entsprechend betreffen weitere wichtige Virulenzfaktoren die Anhaftung und die Beweglichkeit des Bakteriums. Demnach sind ein Zell-Zell-Kontakt mit Adhärenz sowie die Produktion von Pili essenziell für den zytotoxischen Effekt von *V. vulnificus*. Die Begeißelung als bedeutender Virulenzfaktor hat neben der Motilität auch Auswirkungen auf die Zell-Adhäsion und damit auf den zytotoxischen Effekt (Horseman und Surani 2011).

2.6.4 *Vibrio alginolyticus*

Für *V. alginolyticus* und verwandte Spezies (*Harveyi*-Klade) wurden verschiedene Virulenzfaktoren beschrieben, welche Rolle sie bei einer Infektion spielen, ist jedoch noch nicht sicher nachgewiesen. Darüber hinaus ist nicht bekannt, ob essenzielle Virulenzfaktoren existieren oder ob die Kombination verschiedener Faktoren entscheidend ist. Ebenso könnte die Expression von Virulenzgenen durch übergeordnete Regulatoren ein entscheidender Faktor sein (Ruwandeeepika *et al.* 2011;

Ruwandeeepika *et al.* 2012).

Als mögliche Virulenzfaktoren identifizierten Castillo *et al.* (2015) Kollagenasen, Arylsulfatasen, Proteasen, Hämolytine, ABC-Transportsysteme (Spermidin, Putrescin, Eisen) und Toxine (RTX, YafQ) (Castillo *et al.* 2015). Xiong *et al.* (2014) identifizierten ebenfalls verschiedene Faktoren (Hämolytine, Amylase, Lecithinase, Lipase, Gelatinase, *toxR*, Kollagenase, *tlh*, *flaA*, *ompW*, *aspA*, *fur*), die mit Virulenz assoziiert sein könnten. Die genetischen Profile von stark virulenten Stämmen und schwach virulenten Stämmen unterschieden sich jedoch nicht, was darauf schließen ließ, dass das Virulenzsystem und der Pathogenitätsmechanismus von *V. alginolyticus* nicht mit denen von *V. parahaemolyticus* vergleichbar sind und nicht auf essenziellen Virulenzfaktoren beruhen (Xiong *et al.* 2014).

2.6.5 *Vibrio mimicus*

Für *V. mimicus* wurden verschiedene Virulenzfaktoren identifiziert, darunter Hämolytine, Enterotoxine, Proteasen, Phospholipasen, Aerobactin (als Siderophor) und Hämagglutinine. Der Pathogenitätsmechanismus ist jedoch weiterhin unbekannt (Hasan *et al.* 2010; Guardiola-Avila *et al.* 2013). Einer der am stärksten verbreiteten Virulenzfaktoren ist das *V. mimicus*-Hämolytine (VMH), das bei einem großen Teil aller klinischen und Umweltstämme auftritt. Das *vmh* Gen wird daher als speziesspezifischer Marker genutzt, seine Rolle in der Pathogenese von *V. mimicus*-Infektionen ist jedoch unklar (Shinoda *et al.* 2004; Guardiola-Avila *et al.* 2014). Neben den genannten Virulenzfaktoren haben vermutlich, wie auch bei anderen pathogenen *Vibrio* spp. (*V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*) beobachtet, die Kapselbildung, die Fähigkeit zur Ausbildung von Biofilmen, ein doppeltes Flagellen-System und Typ IV Pili, eine entscheidende Bedeutung für den Pathogenitätsmechanismus (Tercero-Alburo *et al.* 2014).

2.7 Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit war es, grundlegende Daten zum Vorkommen von potentiell humanpathogenen *Vibrio* spp. in Shrimps aus Ecuador zu ermitteln.

Über Probenahmen aus Aquakulturen und dem lokalen Einzelhandel wurde die Verbreitung von fünf *Vibrio* spp. (*V. alginolyticus*, *V. cholerae*, *V. mimicus*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*) in Shrimps untersucht.

Für *V. cholerae* und *V. parahaemolyticus*, die beiden *Vibrio* spp., die mit pandemischen Ausbrüchen assoziiert werden, erfolgten Serotypisierungen und Untersuchungen zum Vorkommen von Virulenzgenen. Die Antibiotikasensibilität gegenüber 22 Substanzen aus sechs Stoffgruppen wurde für ausgewählte Isolate aller detektierten *Vibrio* spp. untersucht.

Zusätzlich sollten die bei der Beprobung von Aquakulturen gewonnenen Daten zu Produktions- und Managementfaktoren Rückschlüsse auf eventuelle Risikofaktoren für das Vorkommen von *Vibrio* spp. ermöglichen.

Analysen zur Detektion von Genen, die Auslöser einer schwerwiegenden Shrimps-Erkrankung (Hepatopankreatisches Nekrose-Syndrom) sind, wurden für *V. parahaemolyticus*-Isolate aus ecuadorianischen Shrimps-Aquakulturen durchgeführt.

3 Material

3.1 Geräte und Instrumente

Tabelle 6 zeigt alle Geräte und Instrumente, die in den unter Kapitel 4 beschriebenen Methoden verwendet wurden.

Tabelle 6. Geräte und Instrumente

Geräte	Firma
Abflamngerät, Fireboy S1000	Trecomara, Wallisellen, CH
Autoclave, Rexall Handyclave LS-1	Rexmed Industries Co.,Ltd,Kaohsiung City,TW
Brutschrank Memmert UNB 500	Memmert GmbH und Co.KG, Schwabach, DE
Chirurgische Pinzette	Bayer Health Care, Leverkusen, DE
Dispenser für Antibiotika-Testblättchen	Mast Group Ltd., Bootle, GB
ECOLOG Temperaturmessung	ELPRO GmbH, Schorndorf, DE
Eppendorf Research Pipetten 10 µl, 100 µl, 1000 µl	Eppendorf, Hamburg, DE
Gel-Dokumentationsgerät Multimage™ Light Cabinet Alphamager®	Proteinsimple, Santa Clara, USA
Gelelektrophorese-System Biometra Analytik Jena	Biometra, Jena, DE
Gelelektrophorese-System Thermo EC Midicell Primo EC-330	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Impfösen-Sterilisator, VWR® Microincinerator	VWR International, Radnor, USA
Infrarot-Thermometer IR 260-8S	Voltcraft®, Hirschau, DE
Lichtmikroskop CX21FS1	Olympus Corporation, Tokyo, JP
Lichtmikroskop, BH-2	Olympus Corporation, Tokyo, JP
Magnetrührer Boeco Germany, Model MSH 420	Boeckel & Co. (GmbH & Co.), Hamburg, DE
Magnetrührer IKA-COMBIMAG RCO	Eppendorf, Hamburg, DE
pH-Meter Boeco Germany, Model BT-600	Boeckel & Co. (GmbH & Co.), Hamburg, DE
pH-Meter Schott CG 842	Schott Glas, Mainz, DE
Photometer Cecil CE 1011, 1000 Serie 5	Cecil Instruments, Cambridge, GB
Pipetboy	Eppendorf, Hamburg, DE
Pipetten Boeco Germany 10 µl, 100 µl, 1000 µl	Boeckel & Co. (GmbH & Co.), Hamburg, DE
Präzisionswaage Typ: EW 2200-2NM	Kern & Sohn, Balingen, DE
Präzisionswaage, Boeco Germany Model BBL 31	Boeckel & Co. (GmbH & Co.), Hamburg, DE
Schüttelinkubator Unimax 1010, Inkubator 1000	Heidolph, Schwabach, DE
Skalpellhalter	Bayer Health Care, Leverkusen, DE
Techne TechGene Thermal Cycler	Bibby Scientific Limited, Staffordshire, GB
Thermo-Cycler C1000™ oder S1000™	BioRad, München, DE
Thermomixer compact Eppendorf	Eppendorf, Hamburg, DE
Transilluminator FOTO/UV® 21	Fotodyne Incorporated, Hartland, USA
Vortex Mixer Model VM-300	Gemmy Industrial Corporation,Taipei, TW
Vortexer G560E	Scientific Industries Inc, New York, USA
Vortexer IKA-Werk	Janke & Kunkel, Staufen i. Br., DE

Tabelle 6 wird auf der folgenden Seite weitergeführt.

Geräte	Firma
Waage Boeco Germany, Model BBL 53	Boeckel & Co. (GmbH & Co.), Hamburg, DE
Wasserbad Köttermann 3043	Köttermann, Hänigsen, DE
Wasserbad Memmert WNB 7-45	Memmert GmbH und Co.KG, Schwabach, DE
Wasserdestillierer, Fanem, Model 724	Fanem, São Paulo, BR
Zentrifuge Eppendorf 5418	Eppendorf, Hamburg, DE
Zentrifuge Model CENTRA-CL2	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Zentrifuge neolab mit 6400 rpm = 2000 x g	Neolab, Heidelberg, DE

µl: Mikroliter; rpm: Umdrehungen pro Minute (Rounds per minute)

3.2 Verbrauchsmaterial

In Tabelle 7 sind alle verwendeten Verbrauchsmaterialien dargestellt.

Tabelle 7. Verbrauchsmaterial

Verbrauchsmaterial	Firma
BagFilter® P	Interscience, Saint Nom, FR
Cary-Blair Transportmedium, CultureSwab™	BD Biosciences, Heidelberg, DE
Diamond Zipper Bags	Reynolds Consumer Products Company, Richmond, USA
Eppendorf Tips Standard 10 µl, 100 µl, 1000 µl	Eppendorf, Hamburg, DE
Filterspitzen 10 µl; 100 µl; 1000 µl	Peqlab, Erlangen, DE
Impfösen	VWR, Dresden, DE
Parafilm	Bemis Company Inc., Chicago, USA
Reaktionsgefäß 0,5 ml; 1,5 ml; 2 ml	Eppendorf, Hamburg, DE
Reaktionsgefäß safelock 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg, DE
Single Cap8-Streifen	Biozym, Hessisch-Oldendorf, DE
Skalpellklingen c-Stahl NO: 20	Schreiber®, Fridingen, DE
Stammhaltungssystem für Mikroorganismen, CRYOBANK™	Mast Group Ltd., Bootle, GB
Zentrifugenröhrchen 50 ml	BD Biosciences, Heidelberg, DE

µl: Mikroliter; ml: Milliliter

3.3 Reagenzien

Tabelle 8 listet alle Reagenzien auf, die im Rahmen der unter Kapitel 4 beschriebenen Methoden zum Einsatz kamen.

Tabelle 8. Reagenzien

Reagenzien	Hersteller
6x DNA Loading Dye	Thermo Fisher, St. Leon Rot, DE
Chelex 100 Resin	BioRad, München, DE
dNTP Set 100 mM	Fermentas GmbH, St. Leon Rot, DE
Ethanol 99,8 %	Merck, Darmstadt, DE
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe, DE

Tabelle 8 wird auf der nächsten Seite weitergeführt.

3 Material

Reagenzien	Hersteller
GeneRuler 100 bp	Fermentas GmbH, St. Leon Rot, DE
GR Green	Labgene, Châtel-St.-Denis, CH
HyperLadder™IV	Bioline, Luckenwalde, DE
KOH-Lsg. 3 %	Merck, Darmstadt, DE
MgCl ₂ [25 mM]	Qiagen, Hilden, DE
Oxidase Bactident®-Teststreifen	Merck, Darmstadt, DE
peqGold Universal Agarose	peq Lab, Erlangen, DE
Taq-Polymerase [5 U/μl]	Qiagen, Hilden, DE

mM: Millimol; %: Prozent; bp: Basenpaar; U: Units; μl: Mikroliter

3.4 Antibiotika-Testblättchen

In Tabelle 9 sind die im Rahmen des Antibiotika-Resistenztests verwendeten Antibiotika dargestellt.

Tabelle 9. Antibiotika-Testblättchen

Antibiotikum	Beladung [μg]	Hersteller
Ampicillin	10	Mast Group Ltd., Bootle, GB
Amoxicillin-Clavulansäure	20/10	Oxoid, Hampshire, GB
Ampicillin-Sulbactam	10/10	Mast Group Ltd., Bootle, GB
Piperacillin	100	Mast Group Ltd., Bootle, GB
Piperacillin-Tazobactam	100/10	Mast Group Ltd., Bootle, GB
Cefazolin	30	Mast Group Ltd., Bootle, GB
Cefepim	30	Mast Group Ltd., Bootle, GB
Cefotaxim	30	Mast Group Ltd., Bootle, GB
Cefoxitin	30	Mast Group Ltd., Bootle, GB
Ceftazidim	30	Mast Group Ltd., Bootle, GB
Cefuroxim-Natrium	30	Mast Group Ltd., Bootle, GB
Cephalothin	30	Mast Group Ltd., Bootle, GB
Imipenem	10	Mast Group Ltd., Bootle, GB
Meropenem	10	Mast Group Ltd., Bootle, GB
Amikacin	30	Mast Group Ltd., Bootle, GB
Gentamicin	10	Mast Group Ltd., Bootle, GB
Tetracyclin	30	Mast Group Ltd., Bootle, GB
Ciprofloxacin	5	Mast Group Ltd., Bootle, GB
Levofloxacin	5	Mast Group Ltd., Bootle, GB
Ofloxacin	5	Mast Group Ltd., Bootle, GB
Chloramphenicol	30	Mast Group Ltd., Bootle, GB
Trimethoprim-Sulfamethoxazol	1,25/23,75	Oxoid, Hampshire, GB

μg: Mikrogramm

3.5 Puffer

Die Tabellen 10 und 11 geben die für die Herstellung der verwendeten Puffer benötigten Inhaltsstoffe und deren Mengenangaben an.

Tabelle 10. 1x Tris-EDTA (TE)-Puffer

Inhaltsstoffe	Mengenangabe	Hersteller
Tris HCl	1,21 g	Roth, Karlsruhe, DE
EDTA	0,292 g	Roth, Karlsruhe, DE
Aqua dest.	990 ml	

g: Gramm; ml: Milliliter

Tabelle 11. 10x Tris Borat EDTA (TBE)-Puffer

Inhaltsstoffe	Menge in g/l Aqua dest.	Hersteller
Tris-Puffer	108	Roth, Karlsruhe, DE
Borsäure	55	Roth, Karlsruhe, DE
EDTA	9,3	Roth, Karlsruhe, DE

g: Gramm; l: Liter

3.6 Nährmedien

Die Tabellen 12, 13, 14, 15 und 16 geben die verwendeten Nährmedien, einschließlich ihrer Inhaltsstoffe und den zur Herstellung verwendeten Mengenangaben wieder.

Tabelle 12. Alkalisches Peptonwasser (APW)

Inhaltsstoffe	Menge in g/l Aqua dest.	Hersteller
Hefeextrakt	3	Oxoid, Hampshire, GB
Pepton	10	
Natriumchlorid	20	
	pH 8,6 ± 0,2; 25 °C	

g: Gramm; l: Liter; °C: Grad Celsius

Tabelle 13. Chrom-Agar

Inhaltsstoffe	Menge in g/l Aqua dest.	Hersteller
Agar	15	CHROMagar, Paris, FR
Pepton und Hefeextrakt	8	
Salze	51,4	
Chromogener Mix	0,3	
	pH 9,0 ± 0,2	

g: Gramm; l: Liter

Tabelle 14. LB-Medium (Miller)

Inhaltsstoffe	Menge in g/l Aqua dest.	Hersteller
Caseinpepton	10	Merck, Darmstadt, DE
Hefeextrakt	5	
Natriumchlorid	10	
	pH 7,5 ± 0,2; 25°C	

g: Gramm; ml: Milliliter; °C: Grad Celsius

Tabelle 15. Mueller-Hinton-Agar

Inhaltsstoffe	Menge in g/l Aqua dest.	Hersteller
Fleischextrakt	300	BD Biosciences, Heidelberg, DE
Casein-Säurehydrolysat	17,5	
Stärke	1,5	
Agar	17	
	pH 7,0 ± 0,2; 25 °C	

g: Gramm; l: Liter; °C: Grad Celsius

Tabelle 16. Thiosulfat-Zitrat-Gallesalz-Saccharose-Agar (TCBS)

Inhaltsstoffe	Menge in g/l Aqua dest.	Hersteller
Hefeextrakt	5	Oxoid, Hampshire, GB
Bakteriologisches Pepton	10	
Natriumthiosulfat	10	
Natriumcitrat	10	
Gallesalzmischung	8	
Sucrose	20	
Natriumchlorid	10	
Eisen-(III)-citrat	1	
Bromthymolblau	0,04	
Thymolblau	0,04	
Agar	14	
	pH 8,6 ± 0,2; 25 °C	

g: Gramm; l: Liter; °C: Grad Celsius

3.7 Herstellung von Nährmedien

Alkalisches Peptonwasser (APW)

Zur Herstellung des alkalischen Peptonwassers gab man auf einen Liter destillierten Wassers 3 g Hefeextrakt, 10 g Pepton und 20 g Natriumchlorid. Dieses Gemisch wurde unter Hitzezufuhr auf einem Magnetrührer mit Heizplatte erwärmt und gemischt. Nach dem Lösen der festen Inhaltsstoffe wurde der pH-Wert, bei einer Temperatur von 25 °C, auf 8,6 eingestellt. Im Anschluss erfolgte für 15 Minuten eine Erhitzung auf 121 °C in einem Autoklaven. In separaten Probengefäßen wurden stets Sterilitätskontrollen mitgeführt, die vor der Verwendung der hergestellten Nährlösung für 2 Tage bebrütet wurden.

Chrom-Agar

Für die Herstellung des Chrom-Agars wurden 74,7 g des Chrom-Agar-Trockenmediums in einem Liter destillierten Wassers durch Rühren auf einem Magnetrührer gelöst. Die Sterilisation des Agars erfolgte für eine Stunde in einem Dampftopf bei 100 °C. Anschließend verbrachte man das Gefäß in ein Wasserbad (55 °C), in dem der Agar für 30 Minuten abkühlte und dann in Petrischalen gegossen wurde. Auch hier wurden zwei Platten als Sterilitätskontrolle mitgeführt.

LB-Medium (Miller)

Das verwendete LB-Medium setzte sich zusammen aus 10 g Caseinpeptonen, 5 g Hefeextrakt und 10 g Natriumchlorid. Diese Inhaltstoffe gab man auf einen Liter destilliertes Wasser, stellte den pH-Wert auf 7,5 ein und autoklavierte das Medium für 20 Minuten bei 121 °C. Vor der Verwendung der Agarplatten wurde eine Sterilitätskontrolle durchgeführt.

Mueller-Hinton-Agar

Zur Herstellung des Mueller-Hinton-Agars wurden 38 g des Mueller-Hinton-Trockenmediums mit einem Liter destillierten Wassers gemischt und durch Aufkochen in Lösung gebracht. Als nächster Schritt erfolgte für 15 Minuten eine Autoklavierung bei 121 °C. Nach dem Abkühlen in einem Wasserbad wurde der Agar gegossen. Vor der Verwendung der Agarplatten wurde eine Sterilitätskontrolle durchgeführt.

Thiosulfat-Zitrat-Gallensalz-Saccharose-Agar (TCBS)

Zur Anfertigung von Thiosulfat-Zitrat-Gallensalz-Saccharose-Agar wurden 88 g TCBS-Trockenmedium in einem Liter destilliertem Wasser suspendiert und auf einem Magnetrührer bis zum vollständigen Lösen erwärmt. Dann erfolgte eine Erhitzung von 30 Minuten in einem Dampftopf bei 100 °C. Vor der Verwendung der Agarplatten wurde eine Sterilitätskontrolle durchgeführt.

3.8 Primer

In Tabelle 17 sind die Primer aller verwendeten PCR-Systeme dargestellt.

Tabelle 17. Verwendete Primer

Primer	Sequenz (5'-3')	Referenz
<i>Vc.sodB-F</i>	AAG ACC TCA ACT GGC GGT A	Tarr <i>et al.</i> (2007)
<i>Vc.sodB-R</i>	GAA GTG TTA GTG ATC GCC AGA GT	
<i>Vm.sodB-F</i>	CAT TCG GTT CTT TCG CTG AT	
<i>Vm.sodB-R2</i>	GAA GTG TTA GTG ATT GCT AGA GAT	
<i>Vp.fluA-79F</i>	GCA GCT GAT CAA AAC GTT GAG T	
<i>Vp.fluA-934R</i>	ATT ATC GAT CGT GCC ACT CAC	
<i>Vv.hsp-326F</i>	GTC TTA AAG CGG TTG CTG C	
<i>Vv.hsp-697R</i>	CGC TTC AAG TGC TGG TAG AAG	
<i>VA-F</i>	CGA GTA CAG TCA CTT GAA AGC C	Di Pinto <i>et al.</i> (2005)
<i>VA-R</i>	CAC AAC AGA ACT CGC GTT ACC	
<i>UtoxF</i>	GAS TTT GTT TGG CGY GAR CAA GGT T	Bauer und Rørvik (2007)
<i>VptoxR</i>	GGT TCA ACG ATT GCG TCA GAA G	
<i>VctoxR</i>	GGT TAG CAA CGA TGC GTA AG	
<i>VvtoxR</i>	AAC GGA ACT TAG ACT CCG AC	
<i>ctxA-1</i>	CTC AGA CGG GAT TTG TTA GGC ACG	Keasler und Hall (1993)
<i>ctxA-2</i>	TCT ATC TCT GTA GCC CCT ATT ACG	
<i>ompW-1</i>	CAC CAA GAA GGT GAC TTT ATT GTG	Nandi <i>et al.</i> (2000)

Tabelle 17 wird auf der nächsten Seite fortgeführt.

3 Material

Primer	Sequenz (5'-3')	Referenz
<i>ompW-2</i>	GAA CTT ATA ACC ACC CGC G	Nandi <i>et al.</i> (2000)
<i>gro-1</i>	AGG TCA GGC TAA GCG CGT AAG C	Hossain <i>et al.</i> (2012)
<i>gro-2</i>	GTC ACC GTA TTC ACC CGT CGC T	
<i>tdh-1</i>	TAT CCA TGT TGG CTG CAT TCA AAA C	Hossain <i>et al.</i> (2013)
<i>tdh-2</i>	TCT TCA CCA ACA AAG TTA GCT ACA	
<i>trh-1</i>	TTC AAC GGT CTT CAC AAA ATC AGA	
<i>trh-2</i>	AAA CAT ATG TCC ATT TCC GCT CTC	
<i>VCO1F2</i>	CAA CAG AAT AGA CTC AAG AA	Yamasaki <i>et al.</i> (1999)
<i>VCO1R2</i>	TAT CTT CTG ATA CTT TTC TAC	
<i>VCO139F2</i>	TTA CCA GTC TAC ATT GCC	Rivera <i>et al.</i> (2003)
<i>VCO139R2</i>	CGT TTC GGT AGT TTT TCT GG	
<i>wl-40183</i>	CAACATAACCACGTCTGAACC	Chen <i>et al.</i> (2012)
<i>wl-40184</i>	TCGTGTATTTTCATTAGTTCCG	
<i>wl-46714</i>	TCCGAGGGATATTGAAGGGT	
<i>wl-46715</i>	AATCGTCCGATAGGCTTGC	
<i>wl-43924</i>	TCTTCCGCCAACTCAGCA	
<i>wl-43925</i>	TCAGTTGGAGACTCGCCTTC	
<i>wl-43918</i>	ATGCGATGACTAAAAAAGGGT	
<i>wl-43919</i>	ATTTATTGATCGGCAAGAAGTC	
<i>wl-46712</i>	GCACTCGGAAACCAGAGATTA	
<i>wl-46713</i>	GCTAACTCCTCGCCTATCAG	
<i>wl-41028</i>	GTAACCTCGCCTTTCCTCG	
<i>wl-41029</i>	CGGACTCTGCGAAAGTAAAG	
<i>wl-41018</i>	CAAATGCGTAACGGTAACA	
<i>wl-41019</i>	TGACCATCAGGACCGTAAGT	
<i>wl-41024</i>	GCGGCATTGAACCAGAC	
<i>wl-41025</i>	TATTTTCGAGTGTGTACGGC	
<i>wl-46686</i>	ATTGGTGGGAATGGACGAGT	
<i>wl-46687</i>	TGGCAACTCACAGAGCTCAT	
<i>wl-41016</i>	TAATGAAATAGAAGTCGTGGC	
<i>wl-41017</i>	GTATTCCTGAACTGGCTC	
<i>wl-40185</i>	TGGTCTTTGGCTTGCTCAC	
<i>wl-40186</i>	GATTTCCATACAGGCTAACG	
<i>wl-41026</i>	TGACGGTCAAAGAGCTACGC	
<i>wl-41027</i>	ACGGACTCTGCGAAAGTAAAG	
<i>AP1-F</i>	CCTTGGGTGTGCTTAGAGGATG	Flegel und Lo (2014)
<i>AP1-R</i>	GCAAACATATCGCGCAGAACACC	
<i>AP2-F</i>	TCACCCGAATGCTCGCTTGTGG	
<i>AP2-R</i>	CGTCGCTACTGTCTAGCTGAAG	

sodB: Superoxiddismutase; *flaE*: Untereinheit E des Flagellen-Apparates; *hsp60*: Hitzeschock-Protein; *toxR*: Signaltransduktionsprotein; CTX-Choleratoxin; *ctxA*: Choleratoxin Untereinheit A; *ompW*: äußeres Membranprotein; *groEL*: Hitzeschock-Protein; *tdh*: Thermostabiles direktes Hämolyisin; *trh*: TDH-verwandtes Hämolyisin; *wbeO*: Acetyl-CoA Transferase

3.9 Software

Nachfolgende Software-Produkte wurden im Rahmen dieser Arbeit verwendet.

AlphaImager (Proteinsimple, Santa Clara, USA)

EndNote X5 (Thomson, Reuters, Carlsbad, USA)

Microsoft Office für Mac Edition 2011 (Microsoft, Redmond, USA)

Stata/SE 12.0 für Windows (StataCorp LP, Texas, USA)

MedCalc Free statistical calculators 16.7 (MedCalc Software bvba, Ostend, Belgien)

Adobe Photoshop CC , Version 2014.2.2 (Adobe, San José, USA)

4 Methoden

4.1 Aufbau der Studie

Das Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung von aus Ecuador stammenden Shrimps (*Litopenaeus vannamei*) auf das Vorkommen von humanpathogenen *Vibrio* spp. (*V. alginolyticus*, *V. cholera*, *V. mimicus*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*). Die Untersuchung gliederte sich in zwei Teile. Von Februar 2012 bis Oktober 2012 wurden Shrimps aus dem Einzelhandel untersucht, die von einem Markt und aus zwei Supermarktfilialen stammten. In dem Zeitraum von November 2012 bis März 2013 erfolgte die Probennahme direkt aus Aquakulturen. Während der Beprobung von Shrimps produzierenden Aquakulturen wurden mittels eines Fragebogens Daten zur Herkunft der Larven, Haltung, Fütterung, Medikamentengabe und Zuchtdauer erhoben (siehe Anhang).

4.2 Beprobung

4.2.1 Probennahme aus dem Einzelhandel

Im Rahmen der Untersuchung auf das Vorkommen von Vibrionen in Shrimps aus dem Einzelhandel in Ecuador wurden 71 Proben von verschiedenen Marktständen und aus zwei Filialen einer Supermarktkette in der Stadt Cuenca entnommen. Die Probennahme fand stets zur gleichen Uhrzeit am Morgen statt. Der Transport ins Labor und die Lagerung bis zur Bearbeitung erfolgten in einer Kühlbox auf Kühlelementen. Die Probenbearbeitung erfolgte im direkten Anschluss an den Probenkauf.

4.2.2 Probennahme von Shrimps-Aquakulturen

Geografische Lage

Die im Rahmen dieser Arbeit beprobten Aquakulturen befanden sich in den Provinzen El Oro und Guayas. Innerhalb dieser wurden die 19 beprobten Aquakulturen den Bezirken Safando, Balao, Tenguel, Machala, Isla Jambelí und Santa Rosa zugeordnet. Die Orte der Probennahme sind in Abbildung 5 eingezeichnet.

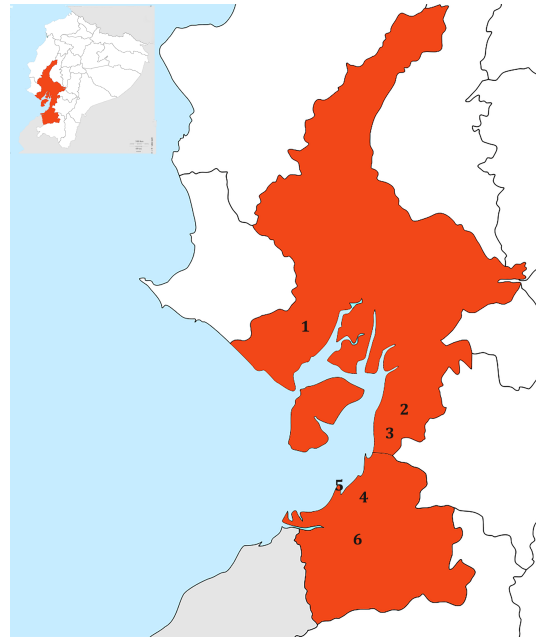


Abbildung 5. Orte der Probennahme in den Provinzen Guayas und El Oro

1: Safando, 2: Balao, 3: Tenguel, 4: Machala, 5: Isla Jambelí, 6: Santa Rosa

Quelle: http://d-maps.com/carte.php?num_car=3400&lang=de

Probennahme

Die Probennahme umfasste 158 Becken von 19 verschiedenen Aquakulturen. Die Entnahme der Proben erfolgte unabhängig vom Zuchtzeitpunkt der Tiere. Es wurden möglichst alle Becken einer Aquakultur zur gleichen Zeit beprobt. Pro Becken wurden ca. 50 g Shrimps (3-10 Shrimps, abhängig von Größe und Gewicht) entnommen. Die Entnahme erfolgte mithilfe eines Wurfnetzes, das von der jeweiligen Aquakultur-Farm zur Verfügung gestellt wurde. Die Proben wurden anschließend in verschließbaren Plastikbeuteln abgepackt. Der Transport der Proben erfolgte in einer Kühlbox (Temperatur: 4 ± 2 °C) mit anschließender Aufbewahrung im Kühlschrank (Temperatur: 4 ± 2 °C) bis zum Untersuchungsbeginn am nächsten Tag.

4.3 Speziesidentifizierung

4.3.1 Isolierung und biochemische Identifizierung

Der kulturelle Nachweis und die biochemische Identifizierung von Vibrionen erfolgten entsprechend des standardisierten Nachweisverfahrens ISO/TS 21872-1/2: Microbiology of food and animal feeding stuffs–Horizontal method for the detection of potentially enteropathogenic *Vibrio* spp.–Part 1: Detection of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio cholerae*; Part 2: Detection of species other than *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio cholerae*.

Isolierung

Mithilfe sterilen Präparationsbestecks wurden mehrere Shrimps eines Beckens zerteilt und in einen Stomacherbeutel gegeben. Es wurden alle Körperanteile genutzt, ein Aliquot von 10 g eingewogen und anschließend zerstoßen. Nach Zugabe von 90 g

alkalischen Peptonwassers und intensivem Mischen erfolgte eine Bebrütung bei 37 °C für 24 ± 3 Stunden.

Nach der Voranreicherung wurde die Menge einer Impföspitze des bebrüteten Mediums entnommen und auf TCBS-Agar mittels Verdünnungsausstrich ausgebracht. Es erfolgte eine weitere Bebrütung bei 37 °C für 24 ± 3 Stunden.

Gemäß der ISO/ TS 21872-1:2007 (E) und ISO/ TS 21872-2:2007 (E) wurden von allen angewachsenen, verdächtigen Kolonien mindestens fünf gleiche bzw. alle vorhandenen Kolonien abgenommen und subkultiviert.

Eine Abweichung von dem in den ISO/TS 21872-1 und ISO/TS 21872-2 beschriebenen Verfahren bestand darin, dass die Subkultivierung der verdächtigen Kolonien nicht auf LB-Agar (Lysogeny broth), sondern erneut auf TCBS-Agar stattfand, welcher wiederum bei 37 °C für 24 ± 3 Stunden inkubiert wurde. In Abbildung 6 ist die Isolierung schematisch dargestellt.

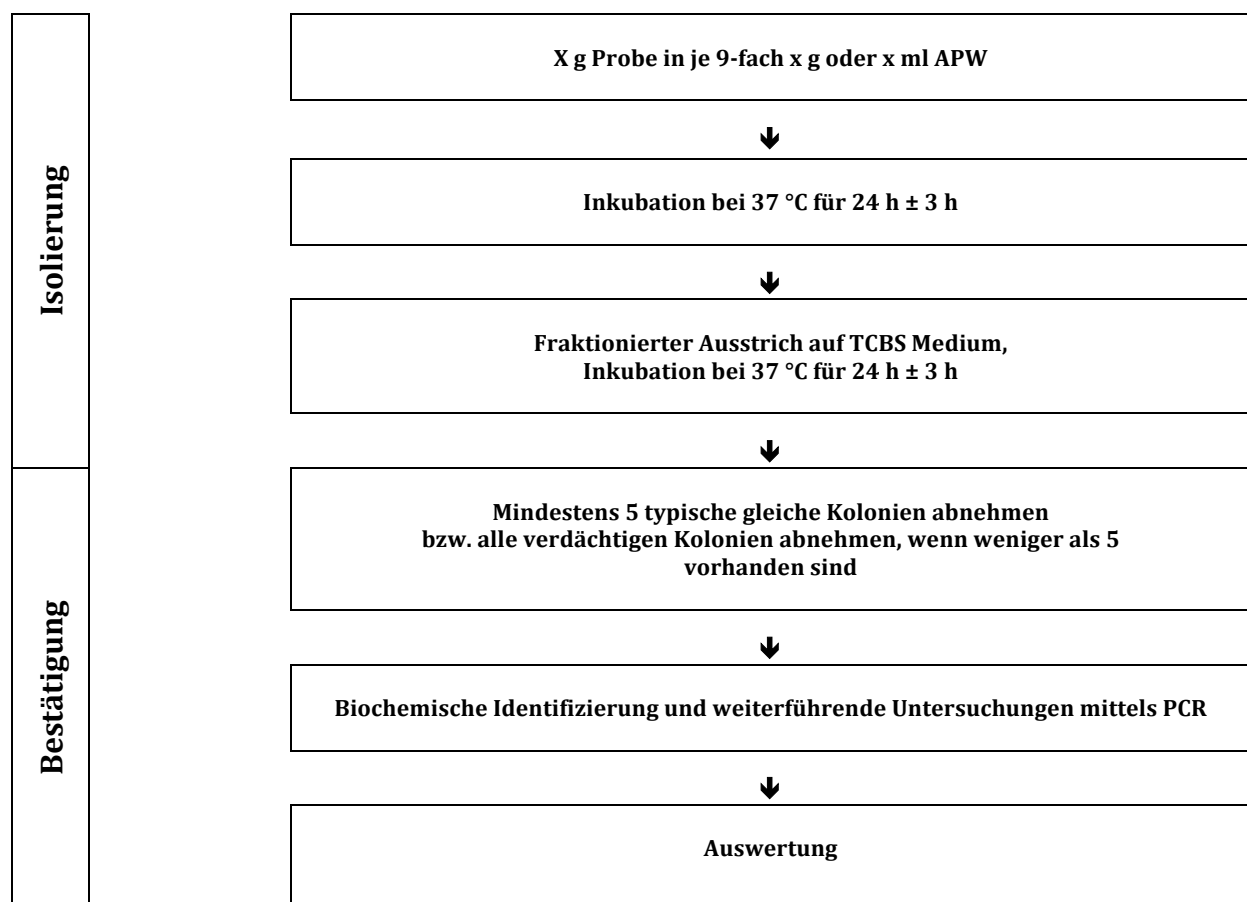


Abbildung 6. Fließschema zur konventionellen Isolierung von *Vibrio* spp.
ISO/TS 21872-2:2007, modifiziert nach Herrfurth *et al.* (2013)

Biochemische Identifizierung

Zur biochemischen Identifizierung der ausgewählten Kolonien kamen drei Tests zum Einsatz. Bestimmt wurden das Gram-Verhalten, die Oxidase-Aktivität und die Mobilität. Von allen zu untersuchenden Kolonien wurde eine Flüssigkultur hergestellt und für die Untersuchungen genutzt. Für die Flüssigkultur wurden mit APW befüllte Reagenzgläser mit jeweils einer zu untersuchenden Kultur beimpft und für 24 Stunden bei 37 °C inkubiert.

Oxidase-Test

Aus den Flüssigkulturen entnommenes Material wurde auf der Reaktionszone des Cytochromoxidase-Teststäbchens (Merck) verrieben. Nach 20 bis 60 Sekunden wurde das Ergebnis entsprechend der auf der Verpackung abgebildeten Farbskala abgelesen. Eine Verfärbung des Testfeldes zu violett oder blauviolett stellte eine positive Reaktion dar. Keine Farbveränderung oder ein gelb verfärbtes Testfeld standen für ein negatives Ergebnis.

KOH-Test

Dieser Test diente der Überprüfung des Gram-Verhaltens. Verwendet wurde eine 3 %ige KOH-Lösung (Merck). Sichtbar wurde diese Reaktion, wenn es beim Herausziehen der Impföse durch die visköse Konsistenz des Gemischs zu einer Fadenbildung kam.

Mit einer Einmalöse wurden ein bis drei Tropfen der 3 %igen KOH-Lösung auf einen Objektträger gegeben. Mithilfe einer Pipette wurde abzentrifugiertes Material der Flüssigkulturen entnommen und mit der KOH-Lösung verrieben.

Mobilitätstest

Zur Überprüfung der Beweglichkeit wurden ein bis zwei Tropfen der Flüssigkulturen auf einen Objektträger gegeben, mit einem Deckgläschen versehen, und mit einem Öl-Immersions-Objektiv bei 100-facher Vergrößerung betrachtet. Auf diese Weise konnten die Beweglichkeit und die Form der untersuchten Bakterien beurteilt werden. Als positives Ergebnis galt das Vorhandensein stäbchenförmiger Bakterien mit einer hohen Mobilität.

Zur weiteren Identifizierung und Differenzierung wurden PCR Methoden angewendet.

4.3.2 Polymerase-Kettenreaktion-Systeme

Für diese Arbeit wurden verschiedene Polymerase-Kettenreaktion (PCR)-Systeme verwendet. Nachstehend werden die genutzten PCR-Systeme erläutert.

4.3.2.1 DNA-Isolation

Zu untersuchendes Koloniematerial wurde in 400 µl 0,1 % Tris-EDTA-Puffer (TE-Puffer) unter Zuhilfenahme eines Vortexers (Gemmy Industrial Corporation oder Janke & Kunkel) resuspendiert. Im Anschluss zentrifugierte man die Suspension bei 4,770 x g für 10 Minuten (Zentrifuge, Thermo Fisher Scientific) oder bei 4 °C und 16,873 x g für 4 Minuten (Zentrifuge, Eppendorf). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 400 µl 0,5 % Chelex® 100 Resin-Lösung (BioRad) resuspendiert.

Darauf folgte eine Inkubation mit kontinuierlicher Bewegung bei 700 rpm und 56 °C über 60 Minuten, nachfolgend für 15 Minuten bei 95 °C in einem Thermomixer (Eppendorf). Nach diesem Zyklus folgte eine weitere Zentrifugation bei 4,770 x g für 15 Minuten oder bei 4 °C und 16,873 x g für 10 Minuten. Der die bakterielle DNA enthaltende Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß übertragen und bis zur Untersuchung bei 4 °C gelagert.

4.3.2.2 Multiplex-Polymerase-Kettenreaktion zur Speziesidentifizierung

Zur Speziesidentifizierung kamen zwei multiplex (m)-PCR-Systeme zur Anwendung. Ein Protokoll, angelehnt an Di Pinto *et al.* (2005) und Tarr *et al.* (2007) wurde eingesetzt, um das Vorkommen von *V. alginolyticus*, *V. cholerae*, *V. mimicus*, *V. parahaemolyticus* und *V. vulnificus* zu detektieren.

Die Identifizierung der Spezies erfolgte nach Tarr *et al.* (2007) für *V. cholerae*, *V. mimicus*, *V. parahaemolyticus* und *V. vulnificus* anhand folgender Gene: *V. cholerae-sodB*, *V. mimicus-sodB*, *V. parahaemolyticus-flaE*, *V. vulnificus-hsp60* (Tarr *et al.* 2007).

Das Primerpaar zum Nachweis von *V. alginolyticus* entstammte der Arbeit von Di Pinto *et al.* (2005) und war spezifisch für ein Kollagenase-codierendes Gen. Die Sequenzen der verwendeten Primer sind in Tabelle 18 dargestellt.

Das verwendete Reaktionsgemisch für eine Reaktion setzte sich wie folgt zusammen: 1x Puffer, 3 mM MgCl₂, 0,25 mM von jedem dNTP, 0,5 Units Taq-Polymerase, 1 µl DNA-Isolat, 2,5 µl Primer-Mix und 10 µl destilliertes Wasser eingesetzt. Das Volumen pro Reaktion betrug 20 µl. Das verwendete Reaktionsgemisch wich von den in der Originalpublikation verwendeten Konditionen ab. Das von Tarr *et al.* (2007) genutzte Reaktionsgemisch enthielt eine niedrigere Konzentration an MgCl₂ (1,5 mM) und dNTP (0,2 mM) sowie größere Mengen an Taq-Polymerase (2 Units) und DNA-Isolat (1,5 µl).

Die Konzentrationen der Primer für den zuvor hergestellten Primer-Mix sind in Tabelle 19 wiedergegeben.

Tabelle 18. Primer-Sequenzen der PCR nach Di Pinto *et al.* (2005) und Tarr *et al.* (2007)

Spezies	Primer	Zielgen	Sequenz (5'-3')	Referenz
<i>V. cholerae</i>	<i>Vc.sodB-F</i>	<i>sodB</i>	AAG ACC TCA ACT GGC GGT A	Tarr <i>et al.</i> (2007)
	<i>Vc.sodB-R</i>		GAA GTG TTA GTG ATC GCC AGA GT	
<i>V. mimicus</i>	<i>Vm.sodB-F</i>	<i>sodB</i>	CAT TCG GTT CTT TCG CTG AT	
	<i>Vm.sodB-R2</i>		GAA GTG TTA GTG ATT GCT AGA GAT	
<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>Vp.flasE-79F</i>	<i>flaE</i>	GCA GCT GAT CAA AAC GTT GAG T	
	<i>Vp.flasE-934R</i>		ATT ATC GAT CGT GCC ACT CAC	
<i>V. vulnificus</i>	<i>Vv.hsp-326F</i>	<i>hsp60</i>	GTC TTA AAG CGG TTG CTG C	
	<i>Vv.hsp-697R</i>		CGC TTC AAG TGC TGG TAG AAG	
<i>V. alginolyticus</i>	<i>VA-F</i>	Kollagenase	CGA GTA CAG TCA CTT GAA AGC C	Di Pinto <i>et al.</i> (2005)
	<i>VA-R</i>		CAC AAC AGA ACT CGC GTT ACC	

sodB: Superoxiddismutase; *flaE*: Untereinheit E des Flagellen-Apparates; *hsp60*: Hitzeschock-Protein

Tabelle 19. Primer-Konzentrationen und Fragmentgrößen der PCR nach Di Pinto *et al.* (2005) und Tarr *et al.* (2007)

Primer	Konzentration	Fragment [bp]
<i>Vc.sodB</i>	0,5 µM	248
<i>Vm.sodB</i>	0,75 µM	121
<i>Vp.flasE</i>	1 µM	897
<i>Vv.hsp</i>	0,25 µM	410
<i>VA</i>	0,5 µM	737

µM: Mikromolar; bp: Basenpaar

Das folgende PCR-Protokoll wurde genutzt: 95 °C für 5 Minuten, gefolgt von 30 Zyklen bei jeweils 92 °C für 40 Sekunden, 62 °C für 1 Minute, 72 °C für 1,5 Minuten, abschließend folgte eine Elongation bei 72 °C für 7 Minuten. Das von Tarr *et al.* (2007) genutzte Protokoll beinhaltete eine längere initiale Denaturierung (15 Minuten) sowie eine höhere Anzahl an Zyklen (35) und eine geringere Temperatur beim Annealing (57 °C).

Die Sichtbarmachung der Ergebnisse erfolgte für alle beschriebenen PCR-Systeme mittels Gelelektrophorese in einem 2 %-Agarosegel und wird unter 4.5 beschrieben.

Das zweite mPCR-System war angelehnt an die Arbeiten von Di Pinto *et al.* (2005) und Bauer und Rørvik (2007).

Die verwendeten Primer für *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* und *V. vulnificus* resultierten aus der von Bauer und Rørvik (2007) entwickelten mPCR. Zur Identifizierung von *V. alginolyticus* wurde ein Primer von Di Pinto *et al.* (2005) benutzt. Die Primer-Sequenzen sind in Tabelle 20 abgebildet.

Das eingesetzte Reaktionsgemisch enthielt für eine Probe 1x Puffer, 1 mM MgCl₂, 0,25 mM von jedem dNTP, 1,5 Units Taq-Polymerase, 2 µl DNA-Isolat, 1,4 µl Primer-Mix und 15,3 µl destilliertes Wasser. Der Gesamtansatz betrug pro Reaktion 25 µl. Das eingesetzte Reaktionsgemisch unterschied sich gegenüber dem von Bauer und Rørvik (2007) verwendeten Reaktionsgemisch in der Menge des Reaktionsansatzes (50 µl) sowie der Konzentrationen der Primer (0,6 µM *UtoxF*, 0,4 µM *toxR*), der Taq-Polymerase (1,5 U/µl) und des MgCl₂ (1,5 mM).

Die Angaben zur Zusammensetzung des Primer-Mix sind in Tabelle 21 dargestellt.

Tabelle 20. Primer-Sequenzen der PCR nach Di Pinto *et al.* (2005) und Bauer und Rørvik (2007)

Spezies	Primer	Zielgen	Sequenz (5'-3')	Referenz
	<i>UtoxF</i>	<i>toxR</i>	GAS TTT GTT TGG CGY GAR CAA GGT T	Bauer und
<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>VptoxR</i>	<i>toxR</i>	GGT TCA ACG ATT GCG TCA GAA G	Rørvik
<i>V. cholerae</i>	<i>VctoxR</i>	<i>toxR</i>	GGT TAG CAA CGA TGC GTA AG	(2007)
<i>V. vulnificus</i>	<i>VvtoxR</i>	<i>toxR</i>	AAC GGA ACT TAG ACT CCG AC	
<i>V. alginolyticus</i>	<i>VA-F</i>	Kollagenase	CGA GTA CAG TCA CTT GAA AGC C	Di Pinto <i>et al.</i>
	<i>VA-R</i>		CAC AAC AGA ACT CGC GTT ACC	(2005)

toxR: Signaltransduktionsprotein

Tabelle 21. Primer-Konzentrationen und Fragmentgrößen der PCR nach Di Pinto *et al.* (2005) und Bauer und Rørvik (2007)

Primer	Konzentration	Fragment [bp]
<i>UtoxF</i>	0,5 µM	
<i>VptoxR</i>	0,5 µM	297
<i>VctoxR</i>	0,5 µM	640
<i>VvtoxR</i>	0,5 µM	435
<i>VA-F</i>	0,5 µM	737
<i>VA-R</i>	0,5 µM	

µM: Mikromolar; bp: Basenpaar

Für die PCR wurde folgendes Temperaturprofil genutzt: Initiale Denaturierung bei 94 °C für 4 Minuten, zur Amplifikation 30 Zyklen von jeweils 30 Sekunden bei 94 °C, 30 Sekunden bei 61 °C, 30 Sekunden bei 72 °C und eine finale Extension bei 72 °C für 7 Minuten. Das hier verwendete Temperaturprofil wies gegenüber dem von Bauer und Rørvik (2007) beschriebenen Temperaturprofil Unterschiede auf. Die Temperatur bei der initialen Denaturierung unterschied sich um 1 °C (95 °C). Ebenfalls abweichend war die Anzahl der Zyklen (25) und innerhalb dieser, die Temperatur der Denaturierung (95 °C) und des Annealings (55 °C).

Eine Untersuchung auf weitere *Vibrio* spp. (*V. metschnikovii* und *V. orientalis*) erfolgte nur in Einzelfällen. Die Anzahl der mittels Matrix-unterstützter Laser-Desorption/Ionisation (MALDI) identifizierten Isolate lag bei fünf. Die Untersuchung der fünf Isolate erfolgte, um Isolate zu identifizieren, die unter Verwendung der beiden oben genannten PCR-Systeme das Auftreten unspezifischer Amplifikate zeigten, jedoch keiner der untersuchten *Vibrio* spp. zuzuordnen waren.

4.4 Molekularbiologische Charakterisierung von *V. cholerae* und *V. parahaemolyticus*

Für Isolate der Spezies *V. cholerae* und *V. parahaemolyticus* erfolgten zur Identifizierung von Serogruppen und der Codierung von Virulenzgenen weitere auf multiplex-PCR-Systemen basierende Untersuchungen. In die Untersuchungen einbezogen wurden dabei auch mehrere Stämme einer *Vibrio* sp., die aus derselben Probe stammten. Die Zahl der untersuchten Isolate überstieg daher die Anzahl der positiven Proben (Tab. 33).

Isolate der Spezies *V. cholerae* (n = 29) wurden auf das Vorhandensein des Cholera-toxin-codierenden Gens *ctx* untersucht. Weiterhin wurde die Zugehörigkeit zu den pandemischen Serogruppen O1 und O139 ermittelt.

Bei *V. parahaemolyticus*-Isolaten (n = 460) erfolgte eine Untersuchung auf das Vorkommen der Virulenzgene *tdh* und *trh* sowie eine Zuordnung zu zwölf bekannten somatischen Oberflächenantigenen (O1-O12).

4.4.1 Codierung von Virulenzgenen

4.4.1.1 *Vibrio cholerae*

Zum Nachweis von Toxin-produzierenden *V. cholerae*-Stämmen diente eine an Nandi *et al.* (2000) angelehnte duplex-PCR. Die Sequenzen der Primer sind in Tabelle 22 abgebildet.

Das Reaktionsgemisch bestand pro Reaktion aus 1x Puffer, 6 mM MgCl₂, 0,25 mM von jedem dNTP, 1,5 Units Taq-Polymerase, 1 µl DNA-Isolat, 1,45 µl Primer-Mix und 11,25 µl destilliertem Wasser. Das verwendete Reaktionsgemisch entsprach mit Ausnahme der Menge an DNA-Isolat (3 µl) und der Konzentration von MgCl₂ (2 mM) dem von Nandi *et al.* (2000) publizierten PCR-Protokoll.

Die Primer-Konzentrationen sind in Tabelle 23 dargestellt.

Tabelle 22. Primer-Sequenzen der PCR nach Nandi *et al.* (2000)

Toxin	Primer	Zielgen	Sequenz (5'-3')	Referenz
CTX	<i>ctxA-1</i>	<i>ctxA</i>	CTC AGA CGG GAT TTG TTA GGC ACG	Keasler und
	<i>ctxA-2</i>		TCT ATC TCT GTA GCC CCT ATT ACG	Hall (1993)
	<i>ompW-1</i>	<i>ompW</i>	CAC CAA GAA GGT GAC TTT ATT GTG	Nandi <i>et al.</i>
	<i>ompW-2</i>		GAA CTT ATA ACC ACC CGC G	(2000)

CTX-Choleratoxin; *ctxA*: Choleratoxin Untereinheit A; *ompW*: äußeres Membranprotein

Tabelle 23. Primer-Konzentrationen und Fragmentgrößen der PCR nach Nandi *et al.* (2000)

Primer	Konzentration	Fragment [bp]
<i>ctxA-1</i>	0,25 µM	301
<i>ctxA-2</i>	0,25 µM	
<i>ompW-1</i>	1,2 µM	588
<i>ompW-2</i>	1,2 µM	

µM: Mikromolar; bp: Basenpaar

Die Ausführung der PCR fand mit einem Volumen von 25 µl pro Reaktion statt. Das Programm beinhaltete eine initiale Denaturierung bei 94 °C für 5 Minuten. Darauf folgten 30 Zyklen mit einer Denaturierung bei 94 °C für 30 Sekunden, einem Annealing bei 64 °C für 30 Sekunden und einer Elongation bei 72 °C für 30 Sekunden. Die finale Elongation bei 72 °C betrug 3 Minuten.

4.4.1.2 *Vibrio parahaemolyticus*

Zur Identifizierung von virulenten *V. parahaemolyticus*-Stämmen wurde eine multiplex-PCR nach Hossain *et al.* (2013) angewendet. Die verwendeten Primer detektierten den speziesspezifischen Marker *groEL* und die beiden Virulenzmarker *tdh* und *trh* (Hossain *et al.* 2012; Hossain *et al.* 2013).

Die Zusammensetzung des Reaktionsgemischs war wie hier dargestellt: 1x Puffer, 6 mM MgCl₂, 0,25 mM von jedem dNTP, 1,5 Units Taq-Polymerase, 1 µl DNA-Isolat (100 ng/µl), 2,1 µl Primer-Mix und 10,6 µl destilliertes Wasser. Das Volumen pro Reaktion betrug 25 µl. Das in der Originalpublikation beschriebene Reaktionsgemisch betrug pro Reaktionsansatz 50 µl. Weitere Unterschiede gegenüber dem hier verwendeten Reaktionsgemisch bestanden bei der Konzentration der dNTPs (0,2 mM) sowie der Menge von DNA (1 µg) und Taq-Polymerase (0,25 µl ExTaq Polymerase).

Die Sequenzen und Konzentrationen der Primer geben die Tabelle 24 und 25 wieder.

Tabelle 24. Primer-Sequenzen der PCR nach Hossain *et al.* (2012) und Hossain *et al.* (2013)

Toxin	Primer	Zielgen	Sequenz (5'-3')	Referenz
	<i>gro-1</i>	<i>groEL</i>	AGG TCA GGC TAA GCG CGT AAG C	Hossain <i>et al.</i>
	<i>gro-2</i>		GTC ACC GTA TTC ACC CGT CGC T	(2012)
TDH	<i>tdh-1</i>	<i>tdh</i>	TAT CCA TGT TGG CTG CAT TCA AAA C	Hossain <i>et al.</i>
	<i>tdh-2</i>		TCT TCA CCA ACA AAG TTA GCT ACA	(2013)

Tabelle 24 wird auf der nächsten Seite fortgeführt.

Toxin	Primer	Zielgen	Sequenz (5'-3')	Referenz
TRH	<i>trh-1</i>	<i>trh</i>	TTC AAC GGT CTT CAC AAA ATC AGA	Hossain <i>et al.</i> (2013)
	<i>trh-2</i>		AAA CAT ATG TCC ATT TCC GCT CTC	

groEL: Hitzeschock-Protein; *tdh*: Thermostabiles direktes Hämolyisin; *trh*: TDH-verwandtes Hämolyisin

Tabelle 25. Primer-Konzentrationen und Fragmentgrößen der PCR nach Hossain *et al.* (2012) und Hossain *et al.* (2013)

Primer	Konzentration	Fragment [bp]
<i>gro-1</i>	0,5 µM	510
<i>gro-2</i>	0,5 µM	
<i>tdh-1</i>	1 µM	382
<i>tdh-2</i>	1 µM	
<i>trh-1</i>	1,5 µM	171
<i>trh-2</i>	1,5 µM	

µM: Mikromolar; bp: Basenpaar

Verwendet wurde folgendes Programm: Initiale Denaturierung bei 94 °C für 5 Minuten. Daran schlossen sich 30 Zyklen mit einer Denaturierung bei 94 °C für 30 Sekunden, einem Annealing bei 69 °C für 30 Sekunden und einer Elongation bei 72 °C für 30 Sekunden an. Die finale Elongation bei 72 °C betrug 5 Minuten.

4.4.2 Serotypisierung

4.4.2.1 *Vibrio cholerae*

Für alle *V. cholerae*-Isolate fand eine Untersuchung auf die Zugehörigkeit zu den Serogruppen O1 und O139 statt. Das verwendete multiplex-PCR-System entstammte der Arbeit von Rivera *et al.* (2003) (Rivera *et al.* 2003).

Das Reaktionsgemisch bestand aus 1x Puffer, 6 mM MgCl₂, 0,25 mM von jedem dNTP, 1,5 Units Taq-Polymerase, 1 µl DNA-Isolat, 1,6 µl Primer-Mix und 11,1 µl destilliertem Wasser. Das Gesamtvolumen pro Reaktion betrug 25 µl. Unterschiede gegenüber dem von Rivera *et al.* (2003) beschriebenen Reaktionsgemischs bestanden bei den Konzentrationen von MgCl₂ (2,0 mM) und dNTP (0,2 mM) sowie bei der Menge an Taq-Polymerase (0,625 Units).

Die Tabellen 26 und 27 geben die Sequenzen und Konzentrationen der verwendeten Primer wieder.

Tabelle 26. Primer-Sequenzen der PCR nach Rivera *et al.* (2003)

Serogruppe	Primer	Zielgen	Sequenz (5'-3')	Referenz
O1	<i>VC01F2</i>	<i>wbeO</i>	CAA CAG AAT AGA CTC AAG AA	Yamasaki <i>et al.</i> (1999)
	<i>VC01R2</i>		TAT CTT CTG ATA CTT TTC TAC	
O139	<i>VC0139F2</i>	<i>wbeO</i>	TTA CCA GTC TAC ATT GCC	Rivera <i>et al.</i> (2003)
	<i>VC0139R2</i>		CGT TTC GGT AGT TTT TCT GG	

wbeO: Acetyl-CoA Transferase

Tabelle 27. Primer-Konzentrationen und Fragmentgrößen der PCR nach Rivera *et al.* (2003)

Primer	Konzentration	Fragment [bp]
VCO1F2	0,8 µM	647
VCO1R2	0,8 µM	
VCO139F2	0,8 µM	741
VCO139R2	0,8 µM	

µM: Mikromolar; bp: Basenpaar

Das verwendete Thermoprofil beinhaltete folgende Reaktionsschritte: Initiale Denaturierung bei 94 °C für 2 Minuten, zur Amplifikation 30 Zyklen von jeweils 30 Sekunden bei 94 °C, 45 Sekunden bei 57 °C, 45 Sekunden bei 72 °C und abschließend eine Extension bei 72 °C für 3 Minuten. Die Konditionen des von Rivera *et al.* (2003) veröffentlichten PCR-Protokolls beinhalteten folgende Schritte: Initiale Denaturierung bei 94 °C für 2 Minuten, zur Amplifikation 35 Zyklen von jeweils 30 Sekunden bei 94 °C, 60 Sekunden bei 55 °C, 3 Minuten bei 72 °C und abschließend eine Extension bei 72 °C für 5 Minuten.

4.4.2.2 *Vibrio parahaemolyticus*

Das von Chen *et al.* (2012) entwickelte mPCR-System zur Identifizierung von zwölf somatischen Oberflächenantigenen für *V. parahaemolyticus* wurde genutzt, um die Isolate in Serogruppen zu differenzieren. Die zwölf Primerpaare waren in zwei Gruppen aufgeteilt. Hier werden die jeweiligen O-Serogruppen mit ihren entsprechenden Zielgenen aufgelistet: Gruppe 1: O1-*wvaG*, O2-*wvaR*, O4-*orf16*, O5-*wvcA*, O6-*wvcJ*, O10-*wvcP*; Gruppe 2: O3-*VP205*, O7-*wvcN*, O8-*wvdG*, O9-*wvdH*, O11-*wvdB*, O12-*wvcP* (Chen *et al.* 2012).

Das verwendete Reaktionsgemisch mit einem Gesamtvolumen von 30 µl pro Reaktion bestand aus 1x Puffer, 2,6 mM MgCl₂, 0,25 mM von jedem dNTP, 0,25 Units Taq-Polymerase, 1 µl DNA-Isolat, 0,4 µl Primer-Mix und 19,4 µl destilliertem Wasser. Abweichungen von dem von Chen *et al.* (2012) beschriebenen Reaktionsgemisch bestanden bei den Konzentrationen von MgCl₂ (2,5 mM), dNTP (0,16 mM) und der Menge an Taq-Polymerase (1,5 Units).

Die Tabellen 28 und 29 zeigen die Sequenzen und Konzentrationen der verwendeten Primer sowie die Fragmentgröße der Amplifikate.

Tabelle 28. Primer-Sequenzen der PCR nach Chen *et al.* (2012)

Serogruppe	Primer	Zielgen	Sequenz (5'-3')
Gruppe 1			
O1	<i>wl-40183</i>	<i>wvaG</i>	(F)CAACATAACCACGTCTGAACC
	<i>wl-40184</i>		(R) TCGTGTATTTTCATTAGTTCCGG
O2	<i>wl-46714</i>	<i>wvaR</i>	(F)TCCGAGGGATATTGAAGGGT
	<i>wl-46715</i>		(R) AATCGTCCGATAGGCTTGC
O4	<i>wl-43924</i>	<i>orf16</i>	(F) TCTTCCGCCAACTCAGCA
	<i>wl-43925</i>		(R) TCAGTTGGAGACTCGCCTTC
O5	<i>wl-43918</i>	<i>wvcA</i>	(F) ATGCGATGACTAAAAAAGGGT

Tabelle 28 wird auf der nächsten Seite fortgeführt.

Serogruppe	Primer	Zielgen	Sequenz (5'-3')
05	wl-43919	wvcA	(R) ATTTATTGATCGGCAAGAAGTC
06	wl-46712	wvcJ	(F) GCACTCGGAAACCAGAGATTA
	wl-46713		(R) GCTAACTCCTCGCCTATCAG
010	wl-41028	wvcP	(F) GTAACCTCGCCTTTCCTCG
	wl-41029		(R) CGGACTCTGCGAAAGTAAAG
Gruppe 2			
03	wl-41018	VP205	(F) CAAATGCGTAACGGTAACA
	wl-41019		(R) TGACCATCAGGACCGTAAGT
07	wl-41024	wvcN	(F) GCGGCATTGAACCAGAC
	wl-41025		(R) TATTTTCGAGTGTGTACGGC
08	wl-46686	wvdG	(F) ATGGTGGAATGGACGAGT
	wl-46687		(R) TGGCAACTCACAGAGCTCAT
09	wl-41016	wvdH	(F) TAATGAAATAGAAGTCGTGGC
	wl-41017		(R) GTATTCCTGAACTGGCTC
011	wl-40185	wvdB	(F) TGGTCTTTGGCTTGCTCAC
	wl-40186		(R) GATTTCCATACAGGCTAACG
012	wl-41026	wvcP	(F) TGACGGTCAAAGAGCTACGC
	wl-41027		(R) ACGGACTCTGCGAAAGTAAAG

Tabelle 29. Primer-Konzentrationen und Fragmentgrößen der PCR nach Chen *et al.* (2012)

Primer	Konzentration	Serogruppe	Fragment [bp]
Gruppe 1			
wl-40183, wl-40184	0,12 µM; 0,12 µM	01	474
wl-46714, wl-46715	0,12 µM; 0,12 µM	02	238
wl-43924, wl-43925	0,05 µM; 0,05 µM	04	671
wl-43918, wl-43919	0,05 µM; 0,05 µM	05	852
wl-46712, wl-46713	0,08 µM; 0,08 µM	06	1409
wl-41028, wl-41029	0,10 µM; 0,10 µM	010	343
Gruppe 2			
wl-41018, wl-41019	0,05 µM; 0,05 µM	03	868
wl-41024, wl-41025	0,12 µM; 0,12 µM	07	385
wl-46686, wl-46687	0,05 µM; 0,05 µM	08	680
wl-41016, wl-41017	0,06 µM; 0,06 µM	09	419
wl-40185, wl-40186	0,08 µM; 0,08 µM	011	524
wl-41026, wl-41027	0,12 µM; 0,12 µM	012	256

µM: Mikromolar; bp: Basenpaar

Die PCR-Parameter waren folgende: Initiale Denaturierung bei 93 °C für 10 Minuten. Darauf folgten 30 Zyklen mit einer Denaturierung bei 95 °C für 30 Sekunden, einem Annealing bei 60 °C für 45 Sekunden und einer Extension bei 72 °C für 1 Minute. Die abschließende Extension bei 72 °C betrug 7 Minuten.

4.4.3 Akutes Hepatopankreatisches Nekrose-Syndrom

Das verwendete PCR-System zur Identifizierung AHPNS-auslösender *V. parahaemolyticus*-Stämme stammte von Flegel und Lo (2014). Verwendet wurden

beide in der Veröffentlichung beschriebenen Methoden (Flegel und Lo 2014). Alle *V. parahaemolyticus*-Isolate wurden jeweils mit dem Primer-Set AP1 und dem Primer-Set AP2 untersucht.

Das eingesetzte Reaktionsgemisch setzte sich wie folgt zusammen: 1x Puffer, 8 mM MgCl₂, 0,15 mM von jedem dNTP, 0,5 Units Taq-Polymerase, 1 µl DNA-Isolat, 0,4 µl Primer-Mix und 11,5 µl destilliertes Wasser.

Tabelle 30 und 31 zeigen die Primer-Sequenzen beider Methoden sowie die Konzentrationen und Fragmentgrößen beider Primer-Sets.

Tabelle 30. Primer-Sequenzen der PCR nach Flegel und Lo (2014)

Spezies	Primer	Sequenz (5'-3')
<i>V. parahaemolyticus</i>	AP1-F	CCT TGG GTG TGC TTA GAG GAT G
	AP1-R	GCA AAC TAT CGC GCA GAA CAC C
	AP2-F	TCA CCC GAA TGC TCG CTT GTG G
	AP2-R	CGT CGC TAC TGT CTA GCT GAA G

Tabelle 31. Primer-Konzentrationen und Fragmentgrößen der PCR nach Flegel und Lo (2014)

Primer	Konzentration	Fragment [bp]
AP1-F	0,4 µM	700
AP1-R	0,4 µM	
AP2-F	0,4 µM	700
AP2-R	0,4 µM	

µM: Mikromolar; bp: Basenpaar

Das Volumen für eine Reaktion betrug 25 µl, verwendet wurde nachstehendes Thermoprofil: Initiale Denaturierung bei 95 °C für 5 Minuten. Daran schlossen sich 30 Zyklen mit einer Denaturierung bei 94 °C für 30 Sekunden, einem Annealing bei 60 °C für 30 Sekunden und einer Elongation bei 72 °C für 60 Sekunden an. Die finale Elongation bei 72 °C betrug 10 Minuten.

4.5 Gelelektrophorese

Die Sichtbarmachung der PCR-Amplifikate erfolgte für alle beschriebenen PCR-Systeme durch gelelektrophoretische Auftrennung in einem 2 %-Agarosegel. Zur Herstellung des Gels wurden Tris-Borat-EDTA-Puffer (TBE-Puffer) und Agarose (peQ Lab) gemischt und aufgekocht, bis die Lösung schlierenfrei war. Nach dem Abkühlen auf 60 °C goss man ein ca. 0,5 cm starkes Gel, welches nach dem Aushärten in eine mit TBE-Puffer befüllte Elektrophoresekammer überführt wurde.

Als DNA Farbstoff wurde für die PCR nach Di Pinto *et al.* (2005) und Tarr *et al.* (2007) Ethidiumbromid (Roth) oder GR Green (Labgene) verwendet. Für alle anderen PCR-Systeme wurde GR Green (Labgene) als Farbstoff eingesetzt.

Von beiden Farbstoffen wurden je 2 µl in ein 0,5 ml Reaktionsgefäß gegeben und mit 98 µl 6x DNA Loading Dye (Thermo Fisher) gemischt. Anschließend pipettierte man für jede Probe und Marker je 2 µl dieses Ladepuffer-Farbstoff-Gemischs in die Vertiefungen einer 96-Well-Mikrotiterplatte. Ein 5 µl-Aliquot des PCR-Produktes bzw. 1,5 µl des

Markers GenRuler 100 bp (Fermentas) wurde mit dem vorgelegten Ansatz gemischt und in die Geltaschen eines 2 %-Agarosegels eingebracht. Die Gelelektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 80-120 Volt über einen Zeitraum von ca. 60 Minuten.

Die Auswertung und Dokumentation der Gele fand mithilfe des Gel-Dokumentationssystems AlphaImager®HP (Proteinsimple) statt.

4.6 Datenerhebung zu Produktions- und Managementfaktoren in Aquakulturen

Im Rahmen der Probennahme von Aquakulturen wurden Daten zur Produktivität und des Aquakulturmanagements erhoben. Der verwendete Fragebogen ist im Anhang dargestellt. Untersuchungen zum Einfluss verschiedener Produktions- und Managementfaktoren von Shrimps-Aquakulturen auf das Vorkommen von *V. alginolyticus*, *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* und *V. vulnificus* beinhalteten die Größe der Aquakulturen, die Besatzdichte der Becken mit Larven, die Antibiotika- und Probiotikagabe, den Herkunftsort der Larven sowie den pH-Wert, den Salzgehalt und die Temperatur des Wassers.

4.7 Antibiotikaresistenz

4.7.1 Probenauswahl

Einbezogen in die Untersuchung wurden 245 Isolate der Spezies *V. alginolyticus* (n = 67), *V. cholerae* (n = 16), *V. parahaemolyticus* (n = 154) und *V. vulnificus* (n = 8). Die Auswahl der Isolate erfolgte so, dass jeweils mindestens ein Isolat aller beprobten Becken der 19 untersuchten Aquakulturen in der Untersuchung vertreten war. Wurden in einem Becken multiple *Vibrio* spp. nachgewiesen, erfolgte die Einbeziehung von jeweils einem Isolat pro Spezies.

4.7.2 Methode und Durchführung

Zur Untersuchung der Antibiotikaresistenzen wurden Agardiffusionstests (Kirby-Bauer Methode) durchgeführt. Getestet wurden 22 Antibiotika aus sechs Stoffgruppen: Beta-Lactam-Antibiotika, Aminoglykoside, Tetracycline, Chinolone, Phenicol, Sulfonamide-Diaminopyrimidin Kombination (Tab. 32).

Bei den verwendeten Antibiotika handelte es sich um Substanzen, die der Literatur nach in Aquakulturen eingesetzt wurden und Antibiotika, die für andere veterinärmedizinische Bereiche in Ecuador zugelassen waren sowie solche, die ausschließlich in der Humanmedizin eingesetzt wurden.

Zu den Substanzen, deren Einsatz für Aquakulturen in der Literatur beschrieben wurde, gehörten: Ampicillin, Amoxicillin, Ciprofloxacin, Gentamicin, Tetracyclin, Trimethoprim-Sulfamethoxazol und Chloramphenicol (Holmstrom *et al.* 2003; Park *et al.* 2012). Für andere veterinärmedizinische Bereiche in Ecuador zugelassen waren Ampicillin, Amoxicillin-Clavulansäure, Ciprofloxacin, Gentamicin, Tetracyclin und Trimethoprim-Sulfamethoxazol (Agrocalidad 2012).

Die Auswahl der Methode und der zu testenden Antibiotika erfolgte entsprechend den Empfehlungen des Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI 2005; CLSI 2006; CLSI 2007). Abweichungen von diesen Vorgaben gab es bei der Herstellung des Inokulums und beim Beimpfen der Agarplatten.

In Vorversuchen wurden verschiedene Isolate, die sich in einem Stammhaltungssystem zur Langzeitlagerung von Mikroorganismen (Cryobank, Mast Group Ltd.) befanden, in 2 ml APW-Medium überführt und bei 35 °C für ca. 12 Stunden bebrütet. Von den so hergestellten Flüssigkulturen wurden verschiedene Mengen auf Mueller-Hinton-Agarplatten (BD Biosciences) gegeben, ausplattiert und für ca. 12 Stunden bebrütet. Der Test ergab, dass durch die Verwendung von 100 µl Flüssigkultur immer ein gleichmäßiger Bakterienrasen erreicht wurde. Alle verwendeten Isolate wurden nach diesem Verfahren angezüchtet.

Vor dem Aufbringen auf die Mueller-Hinton-Agarplatten wurden alle Flüssigkulturen optisch auf Verunreinigungen untersucht. Nach dem Ausplattieren und Trocknen der Platten wurde pro Isolat jeweils eine der vier Agarplatten mit den entsprechenden Antibiotika-Testblättchen (Mast Group Ltd., Oxoid) bestempelt (DiscMaster™ 3 DISPENSER, Mast Group Ltd.). Nach dem Aufbringen wurden die Testblättchen mit einer sterilen Pinzette angedrückt und die Agarplatten innerhalb von 15 Minuten in einen Brutschrank verbracht, wo sie für 16 bis 20 Stunden bei 35 °C inkubiert wurden.

Die Angaben zu den Herstellern und der Anordnung, in welcher die Antibiotikablättchen aufgebracht wurden, zeigt Tabelle 32.

Die Auswertung der Platten erfolgte am darauf folgenden Tag durch Ausmessen der Hemmhöhe. Dazu wurde zunächst geprüft, ob sich ein gleichmäßiger Bakterienrasen gebildet hatte. War das nicht der Fall, konnte die Probe nicht ausgewertet werden und das Isolat wurde erneut angezüchtet und analysiert.

Zum Ausmessen der Hemmhöhe wurden die Agarplatten von der Unterseite her betrachtet und vor einen schwarzen nicht reflektierenden Hintergrund mit einer dahinter liegenden Lichtquelle gehalten. Mit einem Lineal wurde der Durchmesser der koloniefreien Zonen um die Testblättchen gemessen.

Die herangezogenen Grenzwerte entstammten den Empfehlungen des Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI 2005) (Tab. 32).

Tabelle 32. Für den Agardiffusionstest verwendete Antibiotika-Testblättchen und Hemmhofgrenzwerte (mm)

Platte	Antibiotikum	Beladung [µg]	Hemmhofgröße [mm]		
			S	I	R
1	Ampicillin	10	≥17	14-16	≤13
1	Amoxicillin-Clavulansäure	20/10	≥18	14-17	≤13
1	Ampicillin-Sulbactam	10/10	≥15	12-14	≤11
1	Piperacillin	100	≥21	18-20	≤17
1	Piperacillin-Tazobactam	100/10	≥21	18-20	≤17
1	Cefazolin	30	≥18	15-17	≤14
2	Cefepim	30	≥18	15-17	≤14
2	Cefotaxim	30	≥23	15-22	≤14
2	Cefoxitin	30	≥18	15-17	≤14
2	Ceftazidim	30	≥18	15-17	≤14
2	Cefuroxim-Natrium	30	≥18	15-17	≤14
2	Cephalothin	30	≥18	15-17	≤14
3	Imipenem	10	≥16	14-15	≤13
3	Meropenem	10	≥16	14-15	≤13
3	Amikacin	30	≥17	15-16	≤14

Tabelle 32 wird auf der nächsten Seite fortgeführt.

Platte	Antibiotikum	Beladung [µg]	Hemmhofgröße [mm]		
			S	I	R
3	Gentamicin	10	≥15	13-14	≤12
3	Tetracyclin	30	≥19	15-18	≤14
3	Ciprofloxacin	5	≥21	16-20	≤15
4	Levofloxacin	5	≥17	14-16	≤13
4	Ofloxacin	5	≥16	13-15	≤12
4	Chloramphenicol	30	≥18	13-17	≤12
4	Trimethoprim-Sulfamethoxazol	1,25/23,75	≥16	11-15	≤10

S-Sensibel; I-Intermediär; R-Resistent; mm:Millimeter; µg: Mikrogramm

4.7.3 Begriffserklärungen

Für die im Rahmen der Antibiotikaresistenztestung erhobenen Ergebnisse (mm für die Hemmhofdurchmesser) erfolgte eine Beurteilung anhand von Grenzwerten und eine Einteilung in die Kategorien sensibel, intermediär und resistent (RKI 2014). Diese Kategorien sind nach der weltweit gültigen ISO 20776-1 wie folgt definiert:

Sensibel (S): „Als sensibel gegen ein bestimmtes Antibiotikum wird ein Bakterienstamm dann bezeichnet, wenn er in vitro von einer Konzentration dieses Wirkstoffs inhibiert wird, die mit einer hohen therapeutischen Erfolgswahrscheinlichkeit assoziiert ist“.

Intermediär (I): „Als intermediär gegen ein bestimmtes Antibiotikum wird ein Bakterienstamm dann bezeichnet, wenn er in vitro von einer Konzentration dieses Wirkstoffs inhibiert wird, die mit einem unsicheren therapeutischen Ergebnis assoziiert ist“.

Resistent (R): „Als resistent gegen ein bestimmtes Antibiotikum wird ein Bakterienstamm dann bezeichnet, wenn er in vitro von einer Konzentration dieses Wirkstoffs inhibiert wird, die mit einer hohen Wahrscheinlichkeit des Therapieversagens assoziiert ist“.

Bei Multiresistenz handelt es sich um die gleichzeitige Unempfindlichkeit von Bakterien gegenüber mehr als einem antimikrobiellen Wirkstoff (Werckenthin *et al.* 2005).

4.8 Statistische Auswertung

Für die Bearbeitung und statistische Auswertung der Daten wurden Microsoft Excel und Stata/SE 12.0 genutzt. Der Einfluss von Produktions- und Managementfaktoren auf das Vorkommen von *Vibrio* spp. in Shrimps aus Aquakulturen wurde durch die Berechnung des Quotenverhältnisses (odds ratio) mit einem 95 %-Konfidenzintervall und des Signifikanzwertes (p-Wert) mithilfe eines Odds Ratio Rechners (MedCalc Software bvba) ermittelt. Das Quotenverhältnis ist eine statistische Maßzahl für den Zusammenhang einer Exposition und einem Merkmal. Das Quotenverhältnis vergleicht die Chancen (odds) für das Auftreten eines Merkmals, zum einen, wenn eine Exposition vorliegt und zum anderen, wenn keine Exposition vorliegt (Szumilas 2010). Ein Quotenverhältnis < 1 gibt an, dass die Chancen der ersten Gruppe höher sind, das untersuchte Merkmal aufzuweisen. Ein Quotenverhältnis > 1 gibt an, dass die Chancen der ersten Gruppe niedriger sind, das untersuchte Merkmal aufzuweisen. Beträgt der Wert des Quotenverhältnisses 1, gibt es keinen Unterschied zwischen den Chancen beider Gruppen (Ackermann *et al.* 2013). Das 95 %-Konfidenzintervall erlaubt eine Einschätzung der Genauigkeit des Quotenverhältnisses. Auf eine hohe Genauigkeit des

Quotenverhältnisses deutet ein Konfidenzintervall hin, das einen kleinen Wertebereich einschließt. Ein Konfidenzintervall, das einen großen Wertebereich einschließt, deutet hingegen auf eine geringe Präzision des Quotenverhältnisses hin. Eine Aussage über die statistische Signifikanz lässt sich durch das Quotenverhältnis nicht eindeutig ableiten. Diese wird durch den Signifikanzwert bestimmt (Szumilas 2010).

5 Ergebnisse

5.1 Prävalenz von *Vibrio* spp. in Shrimps aus Ecuador

5.1.1 Einzelhandel und Aquakulturen

Das Vorkommen von mindestens einer *Vibrio* sp. wurde bei 219 (95,6 %) der 229 untersuchten Proben nachgewiesen. Die Prävalenzen für die einzelnen Spezies sind in Tabelle 33 dargestellt. Den größten Anteil zeigte die Spezies *V. parahaemolyticus* mit 80,8 %, gefolgt von *V. alginolyticus* (50,2 %), *V. cholerae* (11,4 %) und *V. vulnificus* (3,5 %). Die Spezies *V. mimicus* konnte in keiner der untersuchten Proben nachgewiesen werden.

Tabelle 33. Prävalenz von *Vibrio* spp. in Shrimps aus dem Einzelhandel und Aquakulturen

<i>Vibrio</i> sp.	Prävalenz
<i>V. alginolyticus</i>	50,2 % (115/229)
<i>V. cholerae</i>	11,4 % (26/229)
<i>V. parahaemolyticus</i>	80,8 % (185/229)
<i>V. vulnificus</i>	3,5 % (8/229)
<i>V. mimicus</i>	0 % (0/229)

5.1.2 Multiple *Vibrio* spp.

Der Nachweis multipler *Vibrio* spp. erfolgte für 45,9 % aller Proben. Ausschließlich eine *Vibrio* sp. wurde bei 49,8 % der untersuchten Proben beider Probengruppen detektiert (Tab. 34).

Tabelle 34. Prävalenz multipler *Vibrio* spp. in Proben aus dem Einzelhandel und Aquakulturen

Multiple <i>Vibrio</i> spp.	Prävalenz
1 <i>Vibrio</i> sp.	49,8 % (114/229)
≥ 2 <i>Vibrio</i> spp.	45,9 % (105/229)

Von den 105 Proben mit multiplen Spezies fanden sich bei 92 Proben zwei Spezies, bei 13 Proben drei Spezies. Die Kombinationen der verschiedenen *Vibrio* spp., die gemeinsam in einer Probe detektiert wurden, sind in Tabelle 35 dargestellt. Die am häufigsten vorkommende Kombination bei zwei Spezies war mit 68,6 % *V. alginolyticus* und *V. parahaemolyticus*. Bei drei Spezies wurde die Kombination aus *V. alginolyticus*, *V. cholerae* und *V. parahaemolyticus* (7,6 %) am häufigsten nachgewiesen.

Tabelle 35. Multiple *Vibrio* spp. in Proben aus dem Einzelhandel und Aquakulturen

Anzahl <i>Vibrio</i> spp.	Kombination	Häufigkeit [%]
2 Spezies	<i>V. alginolyticus</i> , <i>V. parahaemolyticus</i>	68,6
	<i>V. parahaemolyticus</i> , <i>V. cholerae</i>	13,3
	<i>V. parahaemolyticus</i> , <i>V. vulnificus</i>	3,8
	<i>V. alginolyticus</i> , <i>V. vulnificus</i>	1
	<i>V. alginolyticus</i> , <i>V. orientalis</i>	1
3 Spezies	<i>V. alginolyticus</i> , <i>V. cholerae</i> , <i>V. parahaemolyticus</i>	7,6
	<i>V. cholerae</i> , <i>V. parahaemolyticus</i> , <i>V. vulnificus</i>	1,9
	<i>V. alginolyticus</i> , <i>V. parahaemolyticus</i> , <i>V. metschnikovii</i>	1,9
	<i>V. alginolyticus</i> , <i>V. parahaemolyticus</i> , <i>V. vulnificus</i>	1

Betrachtete man die Probengruppen Einzelhandel und Aquakultur getrennt, ergab sich für den Nachweis einer *Vibrio* sp. bei Proben aus dem Einzelhandel (49,3 %) und Proben aus Aquakulturen (50 %) nahezu die gleiche Prävalenz.

Multiple *Vibrio* spp. konnten bei 39,4 % der aus dem Einzelhandel stammenden Proben detektiert werden. Für Aquakultur-Shrimps lag dieser Anteil bei 48,7 %.

Beim Auftreten von zwei Spezies wurden *V. alginolyticus* und *V. parahaemolyticus* gemeinsam in 75 % der Proben aus dem Einzelhandel mit multiplen *Vibrio* spp. detektiert. Für Aquakultur-Shrimps lag der Anteil bei 66,2 %.

In Bezug auf drei gemeinsam nachgewiesene *Vibrio* spp. war die Kombination von *V. alginolyticus*, *V. cholerae* und *V. parahaemolyticus* für beide Probengruppen, die am häufigsten detektierte. Sie lag bei Proben aus dem Einzelhandel bei 7,1 % und bei Proben von Aquakulturen bei 7,8 %. Unterschiede zeigten sich bei den Kombinationen, die mit einer geringeren Häufigkeit nachgewiesen wurden (siehe Tab. 36, 37).

Tabelle 36. Multiple *Vibrio* spp. in Proben aus dem Einzelhandel

Anzahl <i>Vibrio</i> spp.	Kombination	Häufigkeit [%]
2 Spezies	<i>V. alginolyticus</i> , <i>V. parahaemolyticus</i>	75
	<i>V. cholerae</i> , <i>V. parahaemolyticus</i>	7,1
	<i>V. alginolyticus</i> , <i>V. orientalis</i>	3,6
3 Spezies	<i>V. alginolyticus</i> , <i>V. cholerae</i> , <i>V. parahaemolyticus</i>	7,1
	<i>V. alginolyticus</i> , <i>V. metschnikovii</i> , <i>V. parahaemolyticus</i>	7,1

Tabelle 37. Multiple *Vibrio* spp. in Proben aus Aquakulturen

Anzahl <i>Vibrio</i> spp.	Kombination	Häufigkeit [%]
2 Spezies	<i>V. alginolyticus</i> , <i>V. parahaemolyticus</i>	66,2
	<i>V. cholerae</i> , <i>V. parahaemolyticus</i>	15,6
	<i>V. parahaemolyticus</i> , <i>V. vulnificus</i>	5,2
	<i>V. alginolyticus</i> , <i>V. vulnificus</i>	1,3
3 Spezies	<i>V. alginolyticus</i> , <i>V. cholerae</i> , <i>V. parahaemolyticus</i>	7,8
	<i>V. cholerae</i> , <i>V. parahaemolyticus</i> , <i>V. vulnificus</i>	2,6
	<i>V. alginolyticus</i> , <i>V. parahaemolyticus</i> , <i>V. vulnificus</i>	1,3

5.1.3 Einzelhandel

In den aus dem Einzelhandel stammenden Proben ($n = 71$) konnte in 45 *V. parahaemolyticus* (63,4 %) nachgewiesen werden. *V. alginolyticus* war mit 59,2 % die am zweithäufigsten vorkommende Spezies. Auf *V. cholerae* entfiel ein Anteil von 7 %. *V. vulnificus* und *V. mimicus* konnten in keiner Probe detektiert werden. Die Spezies *V. orientalis* (1,4 %) und *V. metschnikovii* (2,8 %) wurden in einer bzw. in zwei Proben nachgewiesen (Tab. 38). Das Vorkommen mindestens einer *Vibrio* sp. wurde bei 88,7 % der Proben festgestellt. Die Proben aus dem Einzelhandel gliederten sich in Wildfänge ($n = 23$) und Aquakultur-Shrimps ($n = 42$) sowie sechs Proben ohne Herkunftsangabe.

Die als Wildfänge und Aquakultur-Shrimps klassifizierten Proben stammten von Marktständen des Marktes „El Arenal“ in Cuenca. Die Bezugsquelle der verkauften Meeresfrüchte war der Hafen „Puerto Bolívar“ in der Stadt Machala. Der Verkauf von Shrimps erfolgte roh. Die Waren wurden gekühlt transportiert, jedoch nicht tiefgefroren. Beim Verkauf lagerten die Shrimps in separaten Gefäßen lose auf Eis.

Die Proben ohne Herkunftsangabe wurden aus Supermarktfilialen gezogen. Es handelte sich um rohe und gekochte Produkte, die jedoch alle zuvor und zum Teil noch zum Zeitpunkt des Verkaufs tiefgefroren waren. Sie wurden in einer Kühltheke lose auf Eis angeboten. Die Bezugsquelle und die Herkunft waren nicht bekannt.

Die Prävalenz für mindestens eine *Vibrio* sp. lag für Wildfänge bei 95,7 %. Aquakultur-Shrimps zeigten zu 90,5 % das Vorkommen mindestens einer *Vibrio* sp. Proben aus Supermärkten zeigten zu 50 % das Vorkommen mindestens einer *Vibrio* sp.

Tabelle 38. Prävalenz von *Vibrio* spp. in Shrimps aus dem Einzelhandel nach Herkunft

<i>Vibrio</i> sp.	Gesamt	Wildfänge	Aquakultur	Unbekannt
<i>V. alginolyticus</i>	59,2 % (42/71)	69,6 % (16/23)	57,1 % (24/42)	33,3 % (2/6)
<i>V. cholerae</i>	7 % (5/71)	0 % (0/23)	9,5 % (4/42)	16,7 % (1/6)
<i>V. parahaemolyticus</i>	63,4 % (45/71)	69,6 % (16/23)	66,7 % (28/42)	16,7 % (1/6)
<i>V. vulnificus</i>	0 % (0/71)	0 % (0/23)	0 % (0/42)	0 % (0/6)
<i>V. mimicus</i>	0 % (0/71)	0 % (0/23)	0 % (0/42)	0 % (0/6)
<i>V. metchnikovii</i>	2,8 % (2/71)	4,3 % (1/23)	2,4 % (1/42)	0 % (0/6)
<i>V. orientalis</i>	1,4 % (1/71)	0 % (0/23)	2,4 % (1/42)	0 % (0/6)

5.1.4 Aquakulturen

Bei den Proben, die direkt aus Aquakulturanlagen gezogen wurden, war *V. parahaemolyticus* mit 88,6 %, die am häufigsten nachgewiesene *Vibrio* sp. Darauf folgten *V. alginolyticus* mit 46,2 %, *V. cholerae* mit 13,3 % und *V. vulnificus* mit 5,1 %. *V. mimicus* wurde nicht detektiert (Tab. 39). Der Anteil an Proben, für den mindestens eine *Vibrio* sp. nachgewiesen wurde, betrug 98,7 %.

Die 19 beprobten Aquakulturanlagen variierten in ihrer Größe von drei bis 60 Becken

bzw. zwischen einer Fläche von 14-700 ha pro Aquakultur. Bei 14 Aquakulturen wurden alle besetzten Becken beprobt. Bei fünf Aquakulturen erstreckte sich die Probennahme auf einen Teil der besetzten Becken. Die Anzahl der beprobten Becken belief sich auf 158.

Tabelle 39. Prävalenz von *Vibrio* spp. in Shrimps aus Aquakulturen

<i>Vibrio</i> sp.	Prävalenz
<i>V. alginolyticus</i>	46,2 % (73/158)
<i>V. cholerae</i>	13,3 % (21/158)
<i>V. parahaemolyticus</i>	88,6 % (140/158)
<i>V. vulnificus</i>	5,1 % (8/158)
<i>V. mimicus</i>	0 % (0/158)

5.1.4.1 Lokale Prävalenz

Die Prävalenzen der detektierten *Vibrio* spp. nach den Probennahmebezirken sind in Abbildung 7 dargestellt. Aus Balao stammten 48 Proben. Aus den Bezirken Machala, Tenguel und Isla Jambelí wurden entsprechend 27, 24 und 23 Proben entnommen. Für Santa Rosa und Safando lag die Probenzahl bei 20 bzw. 16.

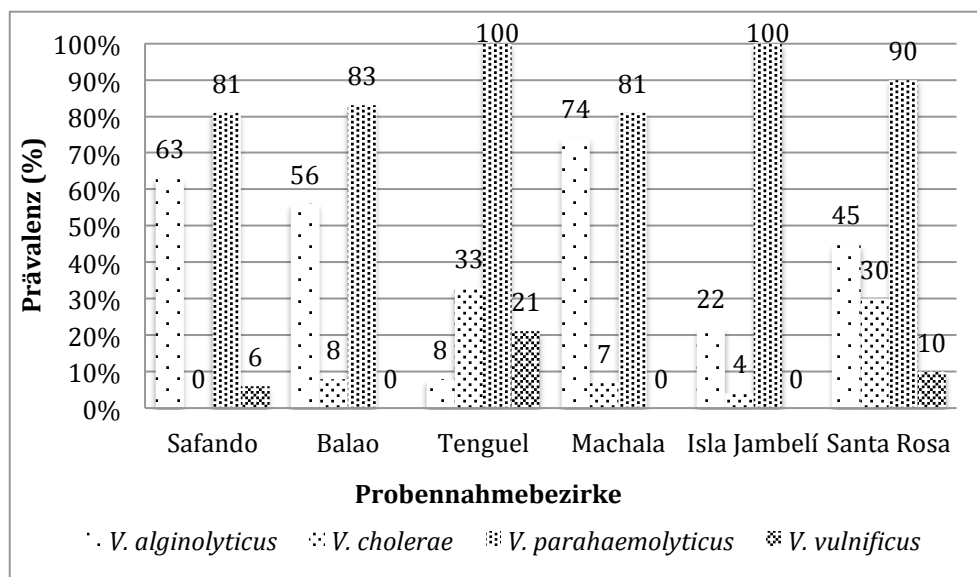


Abbildung 7. Prävalenz von *Vibrio* spp. nach Probennahmebezirken

Die Abbildung stellt die Prävalenzen (%) von *V. alginolyticus*, *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* und *V. vulnificus* für die jeweiligen Probennahmebezirke Balao, Safando, Machala, Isla Jambelí, Santa Rosa und Tenguel dar. Die angegebenen Prozentwerte wurden gerundet. Aus den Bezirken Balao, Safando, Machala, Isla Jambelí, Santa Rosa und Tenguel wurden entsprechend 48, 16, 27, 23, 20 und 24 Proben entnommen.

Isolate von *V. alginolyticus* wurden in Proben aus allen Bezirken detektiert. Der höchste Anteil wurde bei Proben aus Machala (74,1 %) nachgewiesen, der geringste Anteil

wurde bei Proben aus Tenguel (8,3 %) ermittelt.

V. cholerae wurde in fünf der sechs Bezirke nachgewiesen (Balao, Machala, Isla Jambelí, Santa Rosa, Tenguel). Die höchste Prävalenz (33,3 %) wurde in Tenguel ermittelt.

V. parahaemolyticus war in allen Bezirken die am häufigsten nachgewiesene Spezies. Eine Prävalenz von 100 % zeigten Proben von der Isla Jambelí und aus Tenguel. Den geringsten Anteil an *V. parahaemolyticus* wiesen Proben aus Safando (81,3 %) auf.

Isolate von *V. vulnificus* fanden sich in Proben aus Safando (6,3 %), Santa Rosa (10 %) und Tenguel (20,8 %).

5.2 Molekularbiologische Charakterisierung

5.2.1 Codierung von Virulenzgenen

5.2.1.1 *Vibrio cholerae*

Die Codierung von Virulenzgenen für *V. cholerae*-Isolate wurde anhand einer an Nandi *et al.* (2000) angelehnten PCR untersucht. Keines der untersuchten Isolate (n = 29) zeigte ein positives Ergebnis für das Vorhandensein der A-Untereinheit des Cholera-toxin-codierenden Gens *ctxA*.

5.2.1.2 *Vibrio parahaemolyticus*

Für *V. parahaemolyticus* erfolgte eine Untersuchung auf das Vorkommen der *tdh* und *trh* Gene. Keines der untersuchten Isolate (n = 460) erwies sich als Träger von *tdh* und *trh*.

5.2.2 Serotypisierung

5.2.2.1 *Vibrio cholerae*

Eine Untersuchung auf die Zugehörigkeit zu den pandemischen Serogruppen O1 und O139 wurde mittels eines von Rivera *et al.* (2003) entwickelten PCR-Systems durchgeführt. Keines der untersuchten Isolate (n = 29) wurde den Serogruppen O1 oder O139 zugeordnet.

5.2.2.2 *Vibrio parahaemolyticus*

Für 328 Isolate der Spezies *V. parahaemolyticus* erfolgte eine Zuordnung zu den zwölf somatischen Oberflächenantigenen (O1-O12) (Tab. 40). Verwendet wurde hierfür ein von Chen *et al.* (2012) entwickeltes PCR-System. Unter allen Isolaten konnten elf der zwölf Serogruppen detektiert werden. Die Serogruppe O12 wurde nicht nachgewiesen. Der größte Anteil entfiel auf die Serogruppe O11 (39,9 %). O1 wurde bei 17,1 % der Isolate detektiert. O2 wurde bei 9,8 % der Isolate nachgewiesen. Auf die Serogruppen O3, O5 und O8 entfielen entsprechend 6,7 %, 6,4 % und 6,4 %. Die Serogruppen O4 (2,1 %), O6 (3,7 %), O7 (3,4 %), O9 (2,1 %) und O10 (2,4 %) wurden nur bei einem geringen Teil der Isolate nachgewiesen.

Tabelle 40. Serogruppen der *V. parahaemolyticus*-Isolate

Serogruppe	Prävalenz
01	17,1 % (56/328)
02	9,8 % (32/328)
03	6,7 % (22/328)
04	2,1 % (7/328)
05	6,4 % (21/328)
06	3,7 % (12/328)
07	3,4 % (11/328)
08	6,4 % (21/328)
09	2,1 % (7/328)
010	2,4 % (8/328)
011	39,9 % (131/328)
012	0 % (0/328)

5.3 Datenerhebung zu Produktions- und Managementfaktoren in Aquakulturen

Tabelle 41 gibt einen Überblick über die Produktions- und Managementfaktoren von 18 der untersuchten Aquakulturen. Die Daten einer der 19 beprobten Aquakulturen wurden aufgrund von unvollständigen Angaben bei der Datenerhebung für die Auswertung der Produktions- und Managementfaktoren nicht berücksichtigt. Die Größe der Aquakulturen variierte stark und reichte von sehr kleinen Aquakulturen mit 14 Hektar, drei Becken und zwei Arbeitern bis zu 700 Hektar, 60 Becken und 60 Arbeitern. Für die Herkunft der Larven wurden zehn verschiedene Larvenzuchtanlagen genannt. Weitere Angaben zur Anzahl der Larven, die pro Hektar ausgebracht wurden (10.000-110.000), zur Zyklusdauer (90-180 Tage) und zum Ertrag (1,59-4,54 t/ha/Jahr) wurden erhoben. Der Sauerstoffgehalt der Becken wurde bei 15 Aquakulturen ausschließlich über Wasserwechsel ($\leq 1-3$ % Beckenvolumen/Tag) (Sonnenholzner *et al.* 2002) reguliert. Die Anwendung von Antibiotika wurde von sechs Aquakulturbetreibern angegeben. Kaum Unterschiede gab es in Bezug auf die Probiotikaverwendung, die nur in einer Aquakultur nicht erfolgte. Die Mehrheit der befragten Aquakulturbetreiber ($n = 16$) gab an, den Gesundheitszustand der Larven zu untersuchen. Ein „all-in, all-out“-System erfolgte bei acht Aquakulturen. Alle Aquakulturen verwendeten die Shrimps-Spezies *L. vannamei*, kommerzielles Futtermittel, Brackwasser in den Zuchtbecken und

fürten Qualitätskontrollen während der Zucht durch. Der pH-Wert und die Salinität des Wassers variierten in Abhängigkeit von der geografischen Lage der Aquakulturanlagen sowie dem Beprobungszeitpunkt. Die Auswertungen beziehen sich in diesen beiden Punkten entsprechend auf 17 (134 Becken) bzw. 15 (135 Becken) Aquakulturen. Die Wassertemperatur der Zuchtbecken wurde auf jeder Aquakulturanlage gemessen.

Tabelle 41. Produktions- und Managementfaktoren der untersuchten Aquakulturen

Produktionsfaktoren	Ergebnisse aller Aquakultur-Farmen
Größe (ha)	14-700
Anzahl Becken	3-60
Arbeiter	2-60
Spezies	<i>Litopenaeus vannamei</i>
Larvenzuchtanlage (Herkunft der Larven)	10
Larven/ha	10.000-110.000
Zyklus-Zeiten in Tagen	90-180
Produktion (t/ha/Jahr)	1,59-4,54
Fütterung	Kommerzielles Futtermittel
Belüftung der Becken	
Wasserwechsel	15* (134)**
Paddel	1* (8)**
Wasserwechsel&Paddel	2* (12)**
Antibiotika	
Ja	6* (34)**
Nein	12* (120)**
Probiotika	
Ja	17* (146)**
Nein	1* (8)**
Qualitätskontrollen während der Zucht	
Ja	18* (154)**
Nein	0
Zuchtsystem	
All-in, all-out	8* (44)**
Multiple Altersgruppen	10* (110)**
Untersuchung der Larven	
Ja	16* (126)**
Nein	2* (28)**
Wasser der Becken	Brackwasser
pH	6,5-8,5
Salinität (ppt)	5-35
Temperatur (°C)	23,5-32

ha: Hektar; t: Tonne; ppt: Promille; °C: Grad Celsius; *Anzahl der Aquakultur-Farm, **Anzahl der Becken

5.3.1 Einfluss der Produktions- und Managementfaktoren auf das Vorkommen von *Vibrio* spp.

Untersuchungen zum Einfluss verschiedener Produktions- und Managementfaktoren von Shrimps-Aquakulturen auf das Vorkommen von *V. alginolyticus*, *V. cholerae*,

V. parahaemolyticus und *V. vulnificus* sind im Folgenden dargestellt. Die Tabelle 42 stellt die Produktionsfaktoren dar, für welche ein signifikanter Einfluss auf die Prävalenz von *Vibrio* spp. festgestellt wurde. Es wird die Anzahl der Proben wiedergegeben, die unter die festgelegten Grenzwerte fielen. Für die jeweilige *Vibrio* sp. ist die Anzahl der Proben mit einem positiven Nachweis der entsprechenden Spezies und der Prävalenz für die untersuchten Faktoren angegeben. Das Quotenverhältnis (odds ratio) gibt Auskunft über die Stärke des Zusammenhangs der untersuchten Faktorenmerkmale. Die Auswertungen der übrigen Produktions- und Managementfaktoren, für die kein signifikanter Einfluss auf die Prävalenz von *Vibrio* spp. festgestellt wurde, sind im Anhang (Tab. 52-55) aufgeführt.

Tabelle 42. Einfluss verschiedener Produktions- und Managementfaktoren auf das Vorkommen von *Vibrio* spp.

<i>Vibrio</i> sp. Produktionsfaktoren	Anzahl der Proben	Nachweis von <i>Vibrio</i> sp.	Prävalenz von <i>Vibrio</i> sp.	Odds Ratio (95 % Konfidenzintervall)	p-Wert
<i>V. alginolyticus</i>					
Größe (ha)					
≥ 150	70	38	54,3 %	1,93 (1,01-3,68)	0,046
< 150	84	32	38,1 %		
Probiotika					
Ja	146	62	42,5 %	0,04 (0,003-0,77)	0,03
Nein	8	8	100 %		
Salinität (ppt)* ²					
≤ 25	51	13	25,5 %	0,39 (0,18-0,83)	0,01
> 25	83	39	47 %		
Temperatur (°C)					
≥ 28	92	25	27,2 %	0,14 (0,07-0,29)	0,0001
< 28	62	45	72,6 %		
<i>V. cholerae</i>					
pH-Wert* ¹					
≤ 8	121	13	10,7 %	0,16 (0,05-0,54)	0,003
> 8	14	6	42,9 %		
Salinität (ppt)* ²					
≤ 25	51	15	29,4 %	6,5 (2,19-19,26)	0,0007
> 25	83	5	6 %		
Temperatur (°C)					
≥ 28	92	17	18,5 %	3,29 (1,05-10,30)	0,04
< 28	62	4	6,5 %		
<i>V. parahaemolyticus</i>					
Größe (ha)					
≥ 150	70	58	82,9 %	0,31 (0,10-0,92)	0,03
< 150	84	79	94 %		

Tabelle 42 wird auf der nächsten Seite fortgeführt.

<i>Vibrio</i> sp. Produktionsfaktoren	Anzahl der Proben	Nachweis von <i>Vibrio</i> sp.	Prävalenz von <i>Vibrio</i> sp.	Odds Ratio (95 % Konfidenzintervall)	p-Wert
Temperatur (°C)					
≥ 28	92	90	97,8 %	14,36 (3,15-65,47)	0,0006
< 28	62	47	75,8 %		
<i>V. vulnificus</i>					
Salinität (ppt) ^{*2}					
≤ 25	51	7	13,7 %	13,05 (1,55-109,46)	0,02
> 25	83	1	1,2 %		

ha: Hektar; ppt: Promille; °C: Grad Celsius; *¹ ausgewertet für 15 Aquakulturen (135 Becken); *² ausgewertet für 16 Aquakulturen (134 Becken)

Ein signifikanter Einfluss auf die Prävalenz von mindestens einer *Vibrio* sp. wurde für die Aquakulturgröße in Hektar, den Einsatz von Probiotika sowie die Salinität, die Temperatur und der pH-Wert des Wassers detektiert.

Die Größe der Aquakulturen zeigte einen signifikanten Einfluss auf die Prävalenz von *V. alginolyticus* und *V. parahaemolyticus*. Für *V. alginolyticus* lag das Quotenverhältnis bei 1,93 (1,01-3,68). Damit zeigten Aquakulturen mit einer Größe von 150 ha oder mehr, ein signifikant höheres Auftreten von *V. alginolyticus*. Für *V. parahaemolyticus* zeigten Aquakulturen mit einer Größe von weniger als 150 ha ein signifikant höheres Vorkommen. Das Quotenverhältnis betrug 0,31 (0,10-0,92).

Die Verwendung von Probiotika war mit einem signifikant niedrigeren ($p = 0,03$) Vorkommen von *V. alginolyticus* assoziiert. Das Quotenverhältnis betrug 0,04 (0,003-0,77).

Das Quotenverhältnis für den pH-Wert von 0,16 (0,05-0,54) wies darauf hin, dass ein pH-Wert von mehr als 8 das Vorkommen von *V. cholerae* signifikant verstärkte.

Die Salinität zeigte einen signifikanten Einfluss auf das Vorkommen von *V. alginolyticus*, *V. cholerae* und *V. vulnificus*. Bei einer Salinität von mehr als 25 ppt zeigte sich eine höhere Prävalenz von *V. alginolyticus*. Das Quotenverhältnis betrug 0,39 (0,18-0,83). Bei einem Salzgehalt von 25 ppt oder darunter zeigte sich ein signifikant höheres Auftreten von *V. cholerae* und *V. vulnificus*. Das Quotenverhältnis für *V. cholerae* lag bei 6,5 (2,19-19,26). Für *V. vulnificus* betrug das Quotenverhältnis 13,05 (1,55-109,46).

Für die Temperatur wurde ein signifikanter Einfluss auf *V. alginolyticus*, *V. cholerae* und *V. parahaemolyticus* detektiert. Temperaturen unterhalb von 28 °C begünstigten das Auftreten von *V. alginolyticus*. Das Quotenverhältnis für diesen Produktionsfaktor betrug 0,14 (0,07-0,29). Für *V. cholerae* und *V. parahaemolyticus* zeigte sich ein signifikant höheres Vorkommen bei Temperaturen von 28 °C oder darüber. Für *V. cholerae* betrug das Quotenverhältnis 3,29 (1,05-10,30). Für *V. parahaemolyticus* lag das Quotenverhältnis bei 14,36 (3,15-65,47).

5.3.2 Einfluss der Larvenzuchtanlage auf das Vorkommen von *Vibrio* spp.

Die im Rahmen der Datenerhebung erfassten Herkunftsangaben der verwendeten Larven beinhalteten zehn Larvenzuchtanlagen (Tab. 41). Die Bezugsquelle der Larven von einem Großteil der beprobten Becken (68,2 %) ließ sich dabei auf vier Larvenzuchten (1-4) zurückführen. Für die restlichen 49 Becken (31,8 %) wurde die Herkunft der Larven unter „andere“ zusammengefasst, darunter zwei Aquakulturen, die keine Aussage zur Herkunft der Larven machen konnten. Abbildung 8 stellt die

Prävalenzen von *V. alginolyticus*, *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* und *V. vulnificus* für vier Larvenzuchtanlagen (1-4) dar. Aus der Larvenzuchtanlage 1 stammten die Larven von 20 Proben. Die Larvenzuchten 2, 3 und 4 waren der Herkunftsort von entsprechend 28, 47 und zehn Proben.

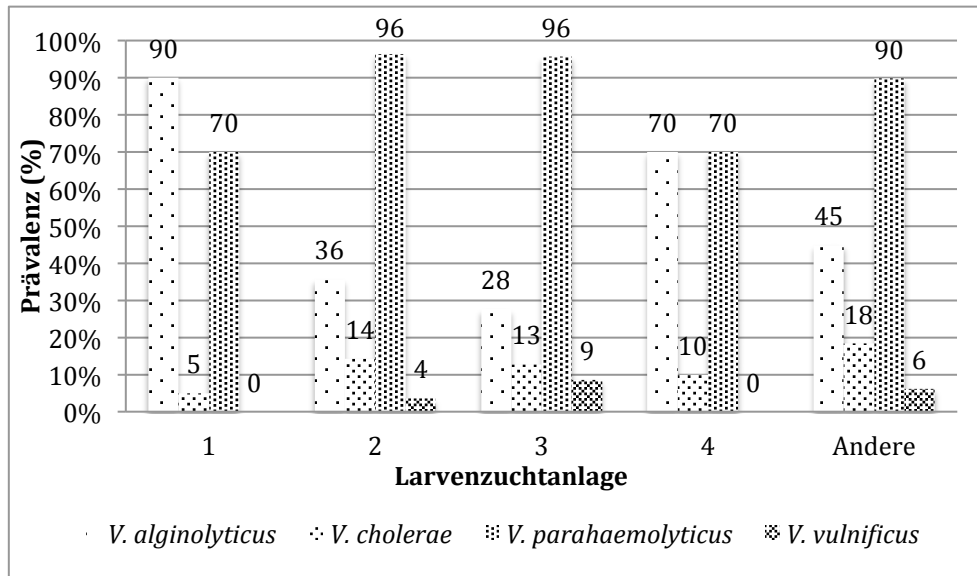


Abbildung 8. Prävalenz von *Vibrio* spp. in Shrimps aus verschiedenen Larvenzuchtanlagen

Dargestellt ist die Prävalenz von *Vibrio* spp. in Shrimps aus vier Larvenzuchtanlagen (1-4). Unter „andere“ sind Proben unterschiedlicher Herkunft zusammengefasst. Die angegebenen Prozentwerte wurden gerundet. Die Larvenzuchten 1, 2, 3 und 4 waren der Herkunftsort von entsprechend 20, 28, 47 und zehn Proben. Unter „andere“ ist die Herkunft von 49 Proben zusammengefasst.

Für Proben, deren Larven aus Larvenzuchtanlage 1 stammten, zeigte *V. alginolyticus* mit 90 % die höchste Prävalenz. *V. parahaemolyticus* wurde in 70 % der Proben detektiert und auf *V. cholerae* entfiel ein Anteil von 5 %. *V. vulnificus* wurde nicht nachgewiesen. Die ursprünglich aus Larvenzucht 2 stammenden Proben zeigten zu 96,4 % ein Vorkommen von *V. parahaemolyticus*. Der Anteil von *V. alginolyticus*-positiven Proben lag bei 35,7 %. Ein Nachweis von *V. cholerae* und *V. vulnificus* erfolgte entsprechend in 14,3 % und 3,6 % der Proben. Die höchste Prävalenz lag bei Larvenzucht 3 ebenfalls bei *V. parahaemolyticus* (95,7 %). Darauf folgten *V. alginolyticus* (27,7 %), *V. cholerae* (12,8 %) und *V. vulnificus* (8,5 %). Für Larvenzucht 4 zeigten *V. alginolyticus* (70 %) und *V. parahaemolyticus* (70 %) die gleiche Prävalenz. *V. cholerae* wurde in 10 % der Proben gefunden. Für *V. vulnificus* erfolgte kein Nachweis. Bei den unter „andere“ zusammengefassten Proben zeigte *V. parahaemolyticus* einen Anteil von 89,8 %. Die Prävalenzen von *V. alginolyticus*, *V. cholerae* und *V. vulnificus* betragen entsprechend 44,9 %, 18,4 % und 6,1 %.

5.4 Akutes Hepatopankreatisches Nekrose-Syndrom

V. parahaemolyticus-Stämme (n = 188) wurde mittels einer von Flegel und Lo (2014) entwickelten PCR-Methode auf die Anwesenheit des Plasmids hin untersucht, welches bei AHPNS-auslösenden *V. parahaemolyticus*-Stämmen identifiziert wurde. Für alle in die Untersuchung einbezogenen Stämme wurden jeweils die Primer-Sets AP1 und AP2 verwendet. Bei keinem der untersuchten Isolate ergab sich ein positives Resultat. Sechs

Isolate, die aus dem Einzelhandel stammten, zeigten bei der Verwendung des Primer-Sets AP2 Banden bei 400 bp, 300 bp oder 150 bp. Diese Ergebnisse wurden als negativ gewertet. Dieselben Isolate zeigten unter Verwendung des Primer-Sets AP1 keine Amplifikate.

5.5 Antibiotikaresistenz

5.5.1 Resistenzprofile der untersuchten Isolate

Mittels des Agardiffusionstests wurden 245 Isolate der Spezies *V. alginolyticus* (n = 67), *V. cholerae* (n = 16), *V. parahaemolyticus* (n = 154) und *V. vulnificus* (n = 8) auf ihre Empfindlichkeit gegenüber 22 Antibiotika aus sechs Stoffgruppen geprüft.

Von den 245 untersuchten Isolaten zeigten 235 (95,9 %) mindestens eine Resistenz. Insgesamt 75,9 % der Isolate erwiesen sich als multiresistent, resistent gegenüber einem Antibiotikum waren 20 %. Die Beladung der Antibiotika-Testblättchen und die herangezogenen Grenzwerte zur Auswertung sind in Tabelle 32 dargestellt. Abbildung 9 stellt die resistenten und intermediären Isolate für die Gesamtheit der getesteten Isolate dar. Die Tabellen 43-46 geben die Resistenzprofile für *V. alginolyticus*, *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* und *V. vulnificus* getrennt betrachtet wieder. Die angegebenen Prozentwerte beziehen sich auf die Anzahl der Isolate, die von der jeweiligen *Vibrio* sp. getestet wurden.

In Betrachtung aller getesteten Isolate wurde für jedes der 22 Antibiotika mindestens ein resistentes Isolat registriert (Abb. 9).

Auf die Stoffgruppe der Beta-Lactam-Antibiotika entfiel der größte Anteil (61,7 %) der detektierten Resistenzen. Die Anteile an resistenten Isolaten für Stoffe aus den Gruppen der Aminoglycoside und Tetracycline betragen entsprechend 14,7 % und 15,2 %. Die Stoffgruppen mit deutlich geringeren Resistenzen waren Chinolone (6,6 %), Sulfonamide (1,5 %) und Chloramphenicol (0,4 %).

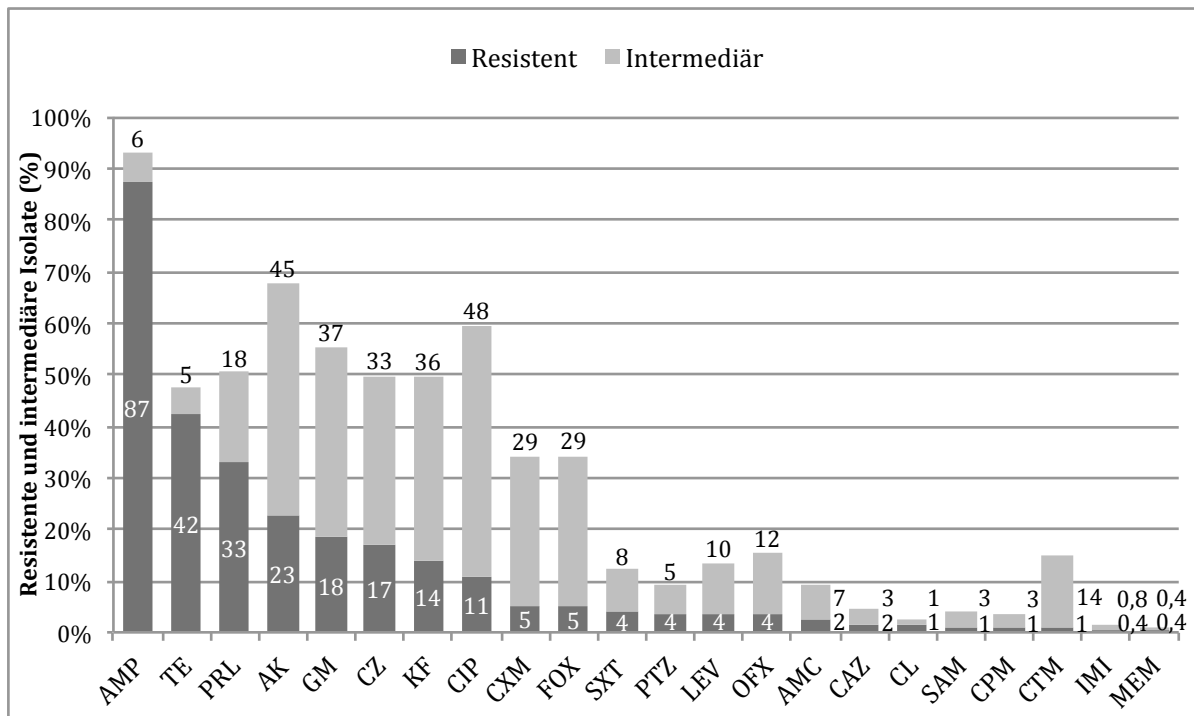


Abbildung 9. Anteil resistenter und intermediärer Isolate

Die Abbildung stellt den Anteil resistenter und intermediärer *Vibrio* spp.-Isolate gegenüber 22 Antibiotika dar. Die angegebenen Prozentwerte sind, ausgenommen für die beiden zuletzt genannten Antibiotika, gerundet.

AMP: Ampicillin; AMC: Amoxicillin-Clavulansäure; SAM: Ampicillin-Sulbactam; PRL: Piperacillin; PTZ: Piperacillin-Tazobactam; CZ: Cefazolin; CPM: Cefepim; CTM: Cefotaxim; FOX: Cefoxitin; CAZ: Ceftazidim; CXM: Cefuroxim-Natrium; KF: Cephalothin; IMI: Imipenem; MEM: Meropenem; AK: Amikacin; GM: Gentamicin; TE: Tetracyclin; CIP: Ciprofloxacin; LEV: Levofloxacin; OFX: Ofloxacin; CL: Chloramphenicol; SXT: Trimethoprim-Sulfamethoxazol

Bezogen auf die einzelnen Antibiotika war Ampicillin das Antibiotikum, auf das die größte Zahl an Isolaten unempfindlich reagierte. Bei der von uns genutzten Konzentration zeigten 214 (87,3 %) der 245 getesteten Isolate eine Resistenz gegenüber Ampicillin und wurden in ihrem Wachstum nicht gehemmt. Tetracyclin folgte an zweiter Stelle mit 104 resistenten Isolaten (42,4 %), Piperacillin lag mit 33,1 % (n = 81) an dritter Stelle. Amikacin und Gentamicin gehörten mit 22,9 % und 18,4 %, gefolgt von Cefazolin (17,1 %), Cephalothin (13,9 %) und Ciprofloxacin (11 %) zu den Antibiotika mit einem nennenswerten Anteil an Resistenzen. Alle Weiteren lagen unter 10 % (Abb. 9).

Ciprofloxacin (48,2 %) wies die größte Anzahl als intermediär eingestufte Ergebnisse auf. Für Amikacin zeigten 44,9 % der Isolate eine intermediäre Reaktion, gefolgt von Gentamicin mit 36,7 %. Für Cephalothin (35,9 %), Cefazolin (32,7 %), Cefoxitin (29,4 %) und Cefuroxim-Natrium (29 %) zeigten jeweils mehr als 70 Isolate eine intermediäre Reaktion. Für Ampicillin (5,7 %), Tetracyclin (5,3 %) und Piperacillin (17,6 %) lag nur eine geringe Anzahl an intermediären Isolaten vor.

Die wenigsten Resistenzen zeigten sich für Imipenem (0,4 %) und Meropenem (0,4 %). Für beide Substanzen wurde jeweils ein Isolat detektiert, das unempfindlich war und entsprechend zwei Isolate und ein Isolat, die intermediär waren. Gegenüber Ampicillin-Sulbactam (0,8 %), Cefepim (0,8 %) und Cefotaxim (0,8 %) zeigten jeweils zwei Isolate Resistenzen. Die Anzahl der intermediären Reaktionen variierte mit sieben bzw. acht Isolaten bei Cefepim und Ampicillin-Sulbactam, bis zu 35 bei Cefotaxim. Resistent gegenüber Chloramphenicol (1,2 %) waren drei Isolate. Der Anteil an intermediären Isolaten lag ebenfalls bei drei Isolaten (1,2 %).

5.5.1.1 *Vibrio alginolyticus*

Es wurden 67 *V. alginolyticus*-Isolate untersucht. Für 21 der getesteten Antibiotika wurde mindestens ein resistentes Isolat ermittelt (Tab. 43). Insgesamt zeigten 64 Isolate (95,5 %) gegenüber mindestens einem Antibiotikum eine Resistenz, der Großteil gegenüber mehreren Antibiotika (Tab. 48).

Die größte Häufung an Resistenzen fand sich für *V. alginolyticus* bei Ampicillin (92,5 %), Piperacillin (67,2 %) und Tetracyclin (31,3 %). Auf die Substanzen Cefazolin (29,9 %), Cephalothin (28,4 %), Amikacin (28,4 %) und Ciprofloxacin (25,4 %) reagierte mehr als ein Viertel der Isolate unempfindlich. Für die restlichen Antibiotika lagen die Werte mit 0 % bis 20,9 % deutlich darunter. Gegenüber Imipenem reagierte keines der Isolate resistent. Ein Isolat wurde als intermediär eingestuft.

Eine intermediäre Reaktion zeigten die meisten *V. alginolyticus*-Isolate gegenüber Ciprofloxacin (62,7 %). Für Cephalothin lag der Anteil bei 46,3 %, gefolgt von Cefazolin, Amikacin und Gentamicin mit jeweils 35,8 %.

Tabelle 43. Resistenzprofil der *V. alginolyticus*-Isolate (n = 67)

Antibiotikum	<i>V. alginolyticus</i>					
	R		I		S	
	Anzahl	Anteil	Anzahl	Anteil	Anzahl	Anteil
Ampicillin	62	92,5 %	3	4,5 %	2	3 %
Piperacillin	45	67,2 %	11	16,4 %	11	16,4 %
Tetracyclin	21	31,3 %	5	7,5 %	41	61,2 %
Cefazolin	20	29,9 %	24	35,8 %	23	34,3 %
Cephalothin	19	28,4 %	31	46,3 %	17	25,4 %
Amikacin	19	28,4 %	24	35,8 %	24	35,8 %
Ciprofloxacin	17	25,4 %	42	62,7 %	8	11,9 %
Gentamicin	14	20,9 %	24	35,8 %	29	43,3 %
Cefuroxim-Natrium	8	11,9 %	22	32,8 %	37	55,2 %
Trimethoprim-Sulfamethoxazol	6	9 %	6	9 %	55	82,1 %
Cefoxitin	5	7,5 %	19	28,4 %	43	64,2 %
Levofloxacin	5	7,5 %	11	16,4 %	51	76,1 %
Amoxicillin-Clavulansäure	4	6 %	10	14,9 %	53	79,1 %
Ofloxacin	4	6 %	15	22,4 %	48	71,6 %
Piperacillin-Tazobactam	3	4,5 %	5	7,5 %	59	88,1 %
Ampicillin-Sulbactam	2	3 %	4	6 %	61	91 %
Cefotaxim	2	3 %	19	28,4 %	46	68,7 %
Ceftazidim	2	3 %	4	6 %	61	91 %
Cefepim	1	1,5 %	4	6 %	62	92,5 %
Meropenem	1	1,5 %	1	1,5 %	65	97 %
Chloramphenicol	1	1,5 %	2	3 %	64	95,5 %
Imipenem	0	0 %	1	1,5 %	66	98,5 %

R-Resistent; I-Intermediär; S-Sensibel

5.5.1.2 *Vibrio cholerae*

Bei der Untersuchung von *V. cholerae*-Isolaten wurden gegenüber zehn der 22 getesteten Antibiotika Resistenzen registriert (Tab. 44). Von den 16 untersuchten Isolaten erwiesen sich zwölf (75 %) als resistent gegenüber einer oder mehreren der getesteten Substanzen (Tab. 48).

Eine Ampicillinresistenz wiesen 37,5 % der Isolate auf. Für Cefazolin (25 %) und Cephalothin (25 %) wurden jeweils vier resistente Isolate detektiert. Für die restlichen Antibiotika lag die Anzahl an resistenten Isolaten bei eins (6,3 %) bis drei (18,8 %). Eine intermediäre Reaktion zeigte sich bei 17 Substanzen. Die größte Anzahl an intermediären Isolaten wurde für Cefoxitin (31,3 %) detektiert. Für die weiteren Antibiotika lag der Anteil unter 20 %.

Tabelle 44. Resistenzprofil der *V. cholerae*-Isolate (n = 16)

Antibiotikum	<i>V. cholerae</i>					
	R		I		S	
	Anzahl	Anteil	Anzahl	Anteil	Anzahl	Anteil
Ampicillin	6	37,5 %	3	18,8 %	7	43,8 %
Cefazolin	4	25 %	3	18,8 %	9	56,3 %
Cephalothin	4	25 %	2	12,5 %	10	62,5 %
Piperacillin	3	18,8 %	2	12,5 %	11	68,8 %
Amikacin	2	12,5 %	1	6,3 %	13	81,3 %
Tetracyclin	2	12,5 %	1	6,3 %	13	81,3 %
Amoxicillin-Clavulansäure	1	6,3 %	2	12,5 %	13	81,3 %
Cefepim	1	6,3 %	0	0 %	15	93,8 %
Ceftazidim	1	6,3 %	1	6,3 %	14	87,5 %
Cefuroxim-Natrium	1	6,3 %	2	12,5 %	13	81,3 %
Ampicillin-Sulbactam	0	0 %	2	12,5 %	14	87,5 %
Piperacillin-Tazobactam	0	0 %	2	12,5 %	14	87,5 %
Cefotaxim	0	0 %	3	18,8 %	13	81,3 %
Cefoxitin	0	0 %	5	31,3 %	11	68,8 %
Imipenem	0	0 %	1	6,3 %	15	93,8 %
Meropenem	0	0 %	0	0 %	16	100 %
Gentamicin	0	0 %	3	18,8 %	13	81,3 %
Ciprofloxacin	0	0 %	1	6,3 %	15	93,8 %
Levofloxacin	0	0 %	0	0 %	16	100 %
Ofloxacin	0	0 %	0	0 %	16	100 %
Chloramphenicol	0	0 %	0	0 %	16	100 %
Trimethoprim-Sulfamethoxazol	0	0 %	1	6,3 %	15	93,8 %

R-Resistent; I-Intermediär; S-Sensibel

5.5.1.3 *Vibrio parahaemolyticus*

Die 154 untersuchten *V. parahaemolyticus*-Isolate repräsentierten die größte Gruppe innerhalb dieser Untersuchung. Es fanden sich bei 98,7 % von ihnen Resistenzen gegen mindestens ein Antibiotikum (Tab. 48). Bei 18 der 22 Antibiotika kam jeweils mindestens ein Isolat vor, das unempfindlich reagierte (Tab. 45).

Das Antibiotikum, für das die meisten Resistenzen auftraten, war Ampicillin (92,2 %). An zweiter Stelle lag Tetracyclin mit 51,3 % der getesteten Isolate. Gegenüber Amikacin waren 22,1 % der Isolate resistent. Das Auftreten von Resistenzen lag für Piperacillin bei 20,1 %, für Gentamicin bei 19,5 % und für Cefazolin bei 11,7 %. Für alle weiteren Antibiotika lag der Anteil an resistenten Isolaten unter 10 %.

Intermediär reagierende Isolate kamen bei 20 der 22 getesteten Antibiotika vor. Die größten Anteile entfielen auf Amikacin (54,5 %), Ciprofloxacin (46,8 %) und Gentamicin (40,3 %). Für Cephalothin (35,1 %), Cefazolin (33,8 %), Cefoxitin (29,9 %) und Cefuroxim-Natrium (29,9 %) zeigten entsprechend 54, 52 und 46 Isolate eine

intermediäre Reaktion. Für die anderen Antibiotika lag der Anteil intermediärer Isolate unter 20 %.

Tabelle 45. Resistenzprofil der *V. parahaemolyticus*-Isolate (n = 154)

Antibiotikum	<i>V. parahaemolyticus</i>					
	R		I		S	
	Anzahl	Anteil	Anzahl	Anteil	Anzahl	Anteil
Ampicillin	142	92,2 %	8	5,2 %	4	2,6 %
Tetracyclin	79	51,3 %	7	4,5 %	68	44,2 %
Amikacin	34	22,1 %	84	54,5 %	36	23,4 %
Piperacillin	31	20,1 %	30	19,5 %	93	60,4 %
Gentamicin	30	19,5 %	62	40,3 %	62	40,3 %
Cefazolin	18	11,7 %	52	33,8 %	84	54,5 %
Cephalothin	11	7,1 %	54	35,1 %	89	57,8 %
Ciprofloxacin	10	6,5 %	72	46,8 %	72	46,8 %
Cefoxitin	7	4,5 %	46	29,9 %	101	65,6 %
Piperacillin-Tazobactam	5	3,2 %	6	3,9 %	143	92,9 %
Ofloxacin	5	3,2 %	14	9,1 %	135	87,7 %
Cefuroxim-Natrium	4	2,6 %	46	29,9 %	104	67,5 %
Levofloxacin	4	2,6 %	13	8,4 %	137	89 %
Trimethoprim-Sulfamethoxazol	4	2,6 %	12	7,8 %	138	89,6 %
Chloramphenicol	2	1,3 %	1	0,6 %	151	98,1 %
Amoxicillin-Clavulansäure	1	0,6 %	4	2,6 %	149	96,8 %
Ceftazidim	1	0,6 %	2	1,3 %	151	98,1 %
Imipenem	1	0,6 %	0	0 %	153	99,4 %
Ampicillin-Sulbactam	0	0 %	2	1,3 %	152	98,7 %
Cefepim	0	0 %	3	1,9 %	151	98,1 %
Cefotaxim	0	0 %	13	8,4 %	141	91,6 %
Meropenem	0	0 %	0	0 %	154	100 %

R-Resistent; I-Intermediär; S-Sensibel

5.5.1.4 *Vibrio vulnificus*

Für die acht untersuchten Isolate der Spezies *V. vulnificus* wurden Resistenzen gegenüber sechs der 22 getesteten Antibiotika festgestellt (Tab. 46). Resistenzen gegenüber einem Antibiotikum zeigten drei Isolate (37,5 %), vier Isolate (50 %) waren gegenüber zwei Antibiotika unempfindlich (Tab. 48).

Ampicillin (50 %) war mit vier resistent reagierenden Isolaten das Antibiotikum mit den häufigsten Resistenzen. Unempfindlich gegenüber Piperacillin (25 %) und Tetracyclin (25 %) reagierten jeweils zwei Isolate. Für Piperacillin-Tazobactam (12,5 %), Amikacin (12,5 %) und Gentamicin (12,5 %) kam jeweils ein resistentes Isolat vor.

Intermediäre Reaktionen zeigten sich gegenüber acht Antibiotika. Die größten Anteile lagen bei Ciprofloxacin (37,5 %) und Cefoxitin (25 %). Gegenüber Cefazolin, Cefuroxim-Natrium, Cephalothin, Amikacin, Gentamicin und Trimethoprim-Sulfamethoxazol reagierte jeweils ein Isolat (12,5 %) intermediär.

Tabelle 46. Resistenzprofil der *V. vulnificus*-Isolate (n = 8)

Antibiotikum	<i>V. vulnificus</i>					
	R		I		S	
	Anzahl	Anteil	Anzahl	Anteil	Anzahl	Anteil
Ampicillin	4	50 %	0	0 %	4	50 %
Piperacillin	2	25 %	0	0 %	6	75 %
Tetracyclin	2	25 %	0	0 %	6	75 %
Piperacillin-Tazobactam	1	12,5 %	0	0 %	7	87,5 %
Amikacin	1	12,5 %	1	12,5 %	6	75 %
Gentamicin	1	12,5 %	1	12,5 %	6	75 %
Amoxicillin-Clavulansäure	0	0 %	0	0 %	8	100 %
Ampicillin-Sulbactam	0	0 %	0	0 %	8	100 %
Cefazolin	0	0 %	1	12,5 %	7	87,5 %
Cefepim	0	0 %	0	0 %	8	100 %
Cefotaxim	0	0 %	0	0 %	8	100 %
Cefoxitin	0	0 %	2	25 %	6	75 %
Ceftazidim	0	0 %	0	0 %	8	100 %
Cefuroxim-Natrium	0	0 %	1	12,5 %	7	87,5 %
Cephalothin	0	0 %	1	12,5 %	7	87,5 %
Imipenem	0	0 %	0	0 %	8	100 %
Meropenem	0	0 %	0	0 %	8	100 %
Ciprofloxacin	0	0 %	3	37,5 %	5	62,5 %
Levofloxacin	0	0 %	0	0 %	8	100 %
Ofloxacin	0	0 %	0	0 %	8	100 %
Chloramphenicol	0	0 %	0	0 %	8	100 %
Trimethoprim-Sulfamethoxazol	0	0 %	1	12,5 %	7	87,5 %

R-Resistent; I-Intermediär; S-Sensibel

5.5.2 Multiresistenzen

In Tabelle 47 ist dargestellt, bei welcher Anzahl von Isolaten eine einfache bzw. multiple Resistenz vorlag. Die Anzahl an Unempfindlichkeiten, die bei den einzelnen Isolaten beobachtet wurde, variierte von eins bis 18.

Multiresistenzen gegenüber zwei oder drei Antibiotika kamen bei 69 (28,2 %) bzw. 57 (23,3 %) Isolaten vor. Das Auftreten von Resistenzen gegenüber vier und fünf antimikrobiellen Substanzen lag bei 11,8 % und 6,1 %. Der Anteil an Isolaten, die Resistenzen gegenüber sechs bis 18 Antibiotika zeigten, betrug zwischen 2,4 % und 0,4 %.

Tabelle 47. Vorkommen von Multiresistenzen

Resistenz	Anteil Isolate	Resistenz	Anteil Isolate	Resistenz	Anteil Isolate	Resistenz	Anteil Isolate
1	20 % (49/245)	3	23,3 % (57/245)	5	6,1 % (15/245)	7	1,2 % (3/245)
2	28,2 % (69/245)	4	11,8 % (29/245)	6	2,4 % (6/245)	8	0,8 % (2/245)

Tabelle 47 wird auf der nächsten Seite fortgeführt.

Resistenz	Anteil Isolate	Resistenz	Anteil Isolate	Resistenz	Anteil Isolate
9	0,4 % (1/245)	11	0,4 % (1/245)	18	0,4 % (1/245)
10	0,4 % (1/245)	16	0,4 % (1/245)		

Multiresistenzen wurden bei allen vier untersuchten *Vibrio* spp. festgestellt. Tabelle 48 stellt multiple Resistenzen für *V. alginolyticus*, *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* und *V. vulnificus* getrennt betrachtet dar.

Tabelle 48. Vorkommen multiresistenter Isolate von *V. alginolyticus*, *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* und *V. vulnificus*

Resistenz	<i>V. a.</i>	Anteil [%]	<i>V. c.</i>	Anteil [%]	<i>V. p.</i>	Anteil [%]	<i>V. v.</i>	Anteil [%]
1	8	11,9	3	18,8	35	22,7	3	37,5
2	11	16,4	5	31,3	49	31,8	4	50
3	17	25,4	4	25	36	23,4	0	0
4	11	16,4	0	0	18	11,7	0	0
5	5	7,5	0	0	10	6,5	0	0
6	4	6	0	0	2	1,3	0	0
7	1	1,5	0	0	2	1,3	0	0
8	2	3	0	0	0	0	0	0
9	1	1,5	0	0	0	0	0	0
10	1	1,5	0	0	0	0	0	0
11	1	1,5	0	0	0	0	0	0
16	1	1,5	0	0	0	0	0	0
18	1	1,5	0	0	0	0	0	0

V. a.: *Vibrio alginolyticus*; *V. c.*: *Vibrio cholerae*; *V. p.*: *Vibrio parahaemolyticus*; *V. v.*: *Vibrio vulnificus*

5.5.2.1 *V. alginolyticus*

Für *V. alginolyticus* zeigten sich bei 64 (95,5 %) der 67 untersuchten Isolate Resistenzen. Davon waren acht Isolate (11,9 %) gegenüber einem Antibiotikum resistent, 56 Isolate (83,6 %) waren multiresistent. Der Anteil an *V. alginolyticus*-Stämmen mit Resistenzen gegenüber sieben oder mehr der getesteten antimikrobiellen Substanzen betrug 11,9 %. Es wurde jeweils ein Isolat (1,5 %) festgestellt, das sich gleichzeitig unempfindlich gegenüber sieben, neun, zehn, elf, 16 oder 18 Antibiotika zeigte. Bei zwei Isolaten (3 %) wurden Resistenzen gegenüber acht Antibiotika festgestellt.

5.5.2.2 *V. cholerae*

Das Auftreten von Resistenzen bei *V. cholerae* wurde bei zwölf (75 %) der 16 getesteten Isolate nachgewiesen. Unempfindlich gegenüber einem Antibiotikum waren drei Isolate (18,8 %). Darüber hinaus wurden Multiresistenzen gegenüber zwei (n = 5) und drei (n = 4) Antibiotika festgestellt.

5.5.2.3 *V. parahaemolyticus*

Der Anteil an Isolaten, die unempfindlich gegenüber einem oder mehreren Antibiotika reagierten, lag für *V. parahaemolyticus* bei 98,7 %. Multiresistent waren 117 Isolate

(76 %), 22,4 % zeigten eine einfache Resistenz. Die Anzahl an Resistenzen pro Isolat, die am häufigsten ermittelt wurde, lag bei zwei und wurde bei 49 Isolaten (31,8 %) nachgewiesen. Bei 36 Isolaten (23,4 %) wurden Unempfindlichkeiten gegenüber drei antimikrobiellen Substanzen ermittelt. Resistenzen gegenüber vier, fünf, sechs und sieben Antibiotika pro Isolat, wurden jeweils bei 11,7 %, 6,5 %, 1,3 % und 1,3 % der Isolate festgestellt.

5.5.2.4 *V. vulnificus*

Bei *V. vulnificus* zeigten sieben der acht untersuchten Isolate Resistenzen. Resistent gegenüber einem Antibiotikum waren drei Isolate (37,5 %). Resistenzen gegen jeweils zwei Antibiotika wurden bei vier Isolaten (50 %) detektiert.

Die zehn Isolate (4,1 %), welche gegenüber allen getesteten Antibiotika sensibel waren, stammten von fünf Aquakulturen aus vier Regionen (Balao, Machala, Santa Rosa und Tenguel). Die Isolate verteilten sich auf die vier *Vibrio* Spezies *V. alginolyticus* (n = 3), *V. cholerae* (n = 4), *V. parahaemolyticus* (n = 2) und *V. vulnificus* (n = 1).

Jeweils ein Isolat der Spezies *V. cholerae* und *V. vulnificus* zeigten Sensibilität gegenüber allen getesteten Antibiotika. Für die restlichen Isolate wurden intermediäre Reaktionen gegenüber zwei bis neun Substanzen festgestellt. Die vorherrschende Substanz war hierbei Cephalothin, gegenüber der sieben Isolate intermediär reagierten. Gegenüber Ampicillin, Cefazolin, Cefoxitin und Ciprofloxacin waren es jeweils vier Isolate. Für Amikacin ergaben sich drei intermediäre Reaktionen, für Cefotaxim, Cefuroxim-Natrium, Gentamicin, Levofloxacin und Ofloxacin jeweils ein Isolat.

Es wurden 16 Isolate (6,5 %) ermittelt, die sehr hohe Resistenzen zeigten. Diese 16 Isolate der Spezies *V. alginolyticus* (n = 12) und *V. parahaemolyticus* (n = 4) waren gleichzeitig gegenüber sechs oder mehr Antibiotika unempfindlich.

Die Proben, aus denen die Isolate mit den höchsten individuellen Resistenzen stammten, wurden aus acht Aquakulturen entnommen. Die Aquakulturen lagen in den Bezirken Balao, Isla Jambelí, Machala, Safando und Santa Rosa. Aus Balao stammten acht Isolate, die Multiresistenzen gegenüber sechs (n = 2), sieben (n = 2), acht (n = 2), neun (n = 1) und elf (n = 1) Antibiotika zeigten. Aus dem Bezirk Santa Rosa stammten fünf Isolate mit Resistenzen gegenüber sechs (n = 2), sieben (n = 1), zehn (n = 1) und 16 (n = 1) der antimikrobiellen Substanzen. Aus den Gebieten Safando, Isla Jambelí und Machala stammte jeweils eines der Isolate. Das Isolat aus Safando war das Isolat, für das mit 18 Antibiotika der höchste Wert an individueller Multiresistenz ermittelt wurde. Die Isolate, die von Aquakulturen der Bezirke Isla Jambelí oder Machala stammten, waren jeweils gegenüber sechs Antibiotika unempfindlich.

5.5.3 Verteilung der Resistenzen auf die getesteten Antibiotika

Im Folgenden wird die Verteilung der Resistenzen auf die 22 getesteten antimikrobiellen Substanzen, die Anzahl beteiligter Antibiotika bei Multiresistenzen sowie das Vorkommen von unempfindlichen Isolaten in den einzelnen Aquakulturen und Bezirken dargestellt.

Tabelle 49 gibt die Häufigkeit der Resistenzen pro Isolat und die Anzahl von Isolaten an, die diese Resistenzen aufwiesen. Dem gegenübergestellt wird die Anzahl an Antibiotika-Kombinationen und die Zahl der antimikrobiellen Substanzen, auf die sich die Resistenzen verteilten.

Tabelle 49. Antibiotika-Kombinationen multiresistenter Isolate

Resistenz	Isolate	Antibiotika-Kombinationen	Beteiligte Antibiotika
1	49	1	4
2	69	19	15
3	57	25	16
4	29	20	14
5	15	14	15
6	6	6	11
7	3	3	13
8	2	2	12

Die Resistenz von Isolaten, die gegenüber einem Antibiotikum unempfindlich waren, verteilte sich auf vier Antibiotika. Die multiresistenten Isolate wiesen Resistenzen gegenüber bis zu 18 Antibiotika auf. Diese hohe Anzahl an beteiligten Antibiotika spiegelt sich auch in den ebenfalls hohen Zahlen von Antibiotika-Kombinationen wieder, die für die Multiresistenzen detektiert wurden.

Für die 69 Isolate, die Resistenzen gegenüber zwei der antimikrobiellen Substanzen aufwiesen, zeigten sich unter Beteiligung von 15 Substanzen 19 verschiedene Antibiotika-Kombinationen. Für Isolate, die gegenüber drei und vier Antibiotika Resistenzen zeigten, wurden entsprechend 25 und 20 Antibiotika-Kombinationen detektiert.

Alle ermittelten Antibiotika-Kombinationen für Isolate, die sich gegenüber zwei bis acht Antibiotika resistent zeigten, sind im Anhang dargestellt (Tab. 56-62). Die Verteilung der Resistenzen bei Isolaten mit einer einfachen Resistenz sowie für die multiresistenten Isolate, die Resistenzen gegenüber bis zu 18 Antibiotika zeigten und nur einfach auftraten, können der Abbildung 10 entnommen werden.

Die in Abbildung 10 dargestellte Verteilung der Resistenzen auf die getesteten Antibiotika zeigt, dass sich die Isolate (n=49) mit einfacher Resistenz auf vier Antibiotika verteilten. Resistent gegenüber Ampicillin waren 41 Isolate. Auf Tetracyclin und Amikacin entfielen vier bzw. drei Isolate. Ein Isolat war unempfindlich gegenüber Piperacillin. Bezogen auf alle getesteten Isolate waren Ampicillin (87,4 %), Tetracyclin (42,5 %), Piperacillin (33,1 %) und Amikacin (22,9 %) die Substanzen, gegenüber welchen die größte Zahl an Isolaten unempfindlich reagierte (Abb.9). Bei den multiresistenten Isolaten waren die vier Antibiotika bei dem Großteil aller Antibiotika-Kombinationen enthalten (Abb. 10, Tab. 56-62). Antibiotika, gegenüber denen sich nur eine geringe Zahl an Isolaten resistent zeigte, fanden sich hauptsächlich bei Isolaten, die gegenüber einer Vielzahl von Substanzen resistent waren (Abb.10). Unempfindlichkeiten gegenüber Ampicillin-Sulbactam (0,8 %), Cefotaxim (0,8 %) und Meropenem (0,4 %) fanden sich bei Isolaten mit Resistenzen gegenüber zehn, 16 oder 18 Antibiotika. Cefepim (0,8 %) und Imipenem (0,4 %), die ebenfalls zu den fünf Antibiotika mit der geringsten Zahl an Resistenzen gehörten, fanden sich bei Isolaten mit drei, fünf oder 16 Resistenzen.

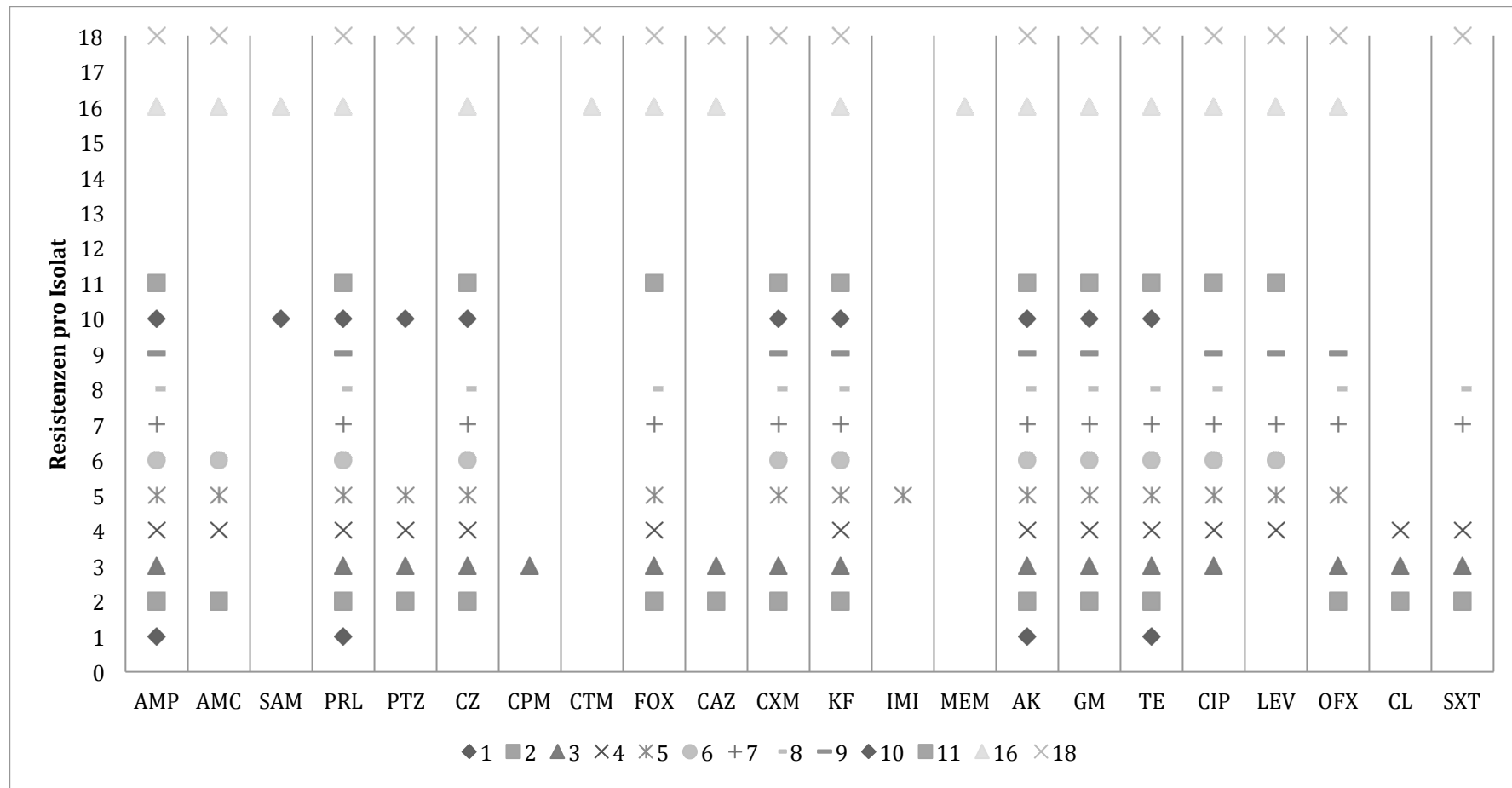


Abbildung 10. Verteilung der Antibiotikaresistenzen aller Spezies auf die getesteten Antibiotika

Die Abbildung stellt die Anzahl beteiligter Antibiotika bei einfach- und multiresistenten Isolaten dar. Die Darstellung bezieht sich auf alle untersuchten Isolate (n=245).

AMP: Ampicillin; AMC: Amoxicillin-Clavulansäure; SAM: Ampicillin-Sulbactam; PRL: Piperacillin; PTZ: Piperacillin-Tazobactam; CZ: Cefazolin; CPM: Cefepim; CTM: Cefotaxim; FOX: Cefoxitin; CAZ: Ceftazidim; CXM: Cefuroxim-Natrium; KF: Cephalothin; IMI: Imipenem; MEM: Meropenem; AK: Amikacin; GM: Gentamicin; TE: Tetracyclin; CIP: Ciprofloxacin; LEV: Levofloxacin; OFX: Ofloxacin; CL: Chloramphenicol; SXT: Trimethoprim-Sulfamethoxazol

5.5.3.1 Vorkommen von Antibiotikaresistenzen in Aquakulturen

Die Anzahl an Antibiotika, gegenüber denen Resistenzen registriert wurden, lag je nach Aquakultur-Farm (n = 19) zwischen zwei und 19 (Tab. 50).

Für Aquakultur 2, die innerhalb des Bezirkes Machala lag, wurde die geringste Anzahl an Resistenzen (Ampicillin, Piperacillin) detektiert. Für Aquakultur 7 aus dem Bezirk Santa Rosa, wurden mit 19 der 22 getesteten Antibiotika die meisten Resistenzen ermittelt. Auf die einzelnen Antibiotika entfielen zwischen eins und sechs resistente Isolate. Für die übrigen Aquakulturen lag die Anzahl an Antibiotika, gegenüber denen sich Resistenzen zeigten, im Durchschnitt bei 10,8. Resistenzen gegenüber Ampicillin und Piperacillin traten in allen Aquakulturen auf. Isolate, die gegenüber Tetracyclin unempfindlich waren, wurden in 18 Aquakulturen detektiert. Resistenzen gegenüber Amikacin und Gentamicin wurden bei Isolaten aus 17 Aquakulturen registriert. Unempfindlichkeiten gegenüber Ampicillin-Sulbactam, Imipenem und Meropenem wurden jeweils nur für eine Aquakultur ermittelt.

Tabelle 50. Detektierte Antibiotikaresistenzen in *Vibrio* spp. innerhalb der Aquakulturen

Aquakultur	Antibiotika-Kombination pro Aquakultur
1	AMP-PRL-CZ-FOX-CXM-KF-AK-GM-TE-CIP-LEV-OFX-SXT
2	AMP-PRL
3	AMP-PRL-CZ-KF-AK-GM-TE-CIP
4	AMP-AMC-PRL-CZ-FOX-CAZ-KF-AK-GM-TE-CIP
5	AMP-PRL-PTZ-CZ-FOX-CXM-KF-AK-GM-TE
6	AMP-PRL-CZ-KF-AK-GM-TE-CIP
7	AMP-AMC-SAM-PRL-PTZ-CZ-CTM-FOX-CAZ-CXM-KF-MEM-AK-GM-TE-CIP-LEV-OFX-CL
8	AMP-AMC-PRL-PTZ-CZ-CPM-CTM-FOX-CAZ-CXM-KF-AK-GM-TE-CIP-LEV-OFX-SXT
9	AMP-PRL-CZ-AK-GM-TE-SXT
10	AMP-PRL-PTZ-CZ-CXM-KF-AK-GM-TE-CIP-OFX
11	AMP-PRL-CZ-FOX-KF-AK-GM-TE-CL
12	AMP-PRL-CZ-KF-TE
13	AMP-PRL-CZ-KF-AK-GM-TE
14	AMP-PRL-PTZ-CZ-FOX-CXM-KF-AK-GM-TE-CIP-LEV-OFX-SXT
15	AMP-AMC-PRL-CPM-KF-AK-GM-TE-CIP
16	AMP-AMC-PRL-PTZ-CZ-FOX-CXM-KF-IMI-AK-GM-TE-CIP-CL-SXT
17	AMP-PRL-CZ-AK-GM-TE
18	AMP-PRL-CZ-CXM-KF-AK-GM-TE-CIP-LEV-SXT
19	AMP-PRL-CAZ-AK-GM-TE-CIP-LEV-OFX-SXT

AMP: Ampicillin; AMC: Amoxicillin-Clavulansäure; SAM: Ampicillin-Sulbactam; PRL: Piperacillin; PTZ: Piperacillin-Tazobactam; CZ: Cefazolin; CPM: Cefepim; CTM: Cefotaxim; FOX: Cefoxitin; CAZ: Ceftazidim; CXM: Cefuroxim-Natrium; KF: Cephalothin; IMI: Imipenem; MEM: Meropenem; AK: Amikacin; GM: Gentamicin; TE: Tetracyclin; CIP: Ciprofloxacin; LEV: Levofloxacin; OFX: Ofloxacin; CL: Chloramphenicol; SXT: Trimethoprim-Sulfamethoxazol

5.5.3.2 Vorkommen von Antibiotikaresistenzen in Probennahmebezirken

Für Santa Rosa wurden die meisten Resistenzen ermittelt (Tab. 51, Abb. 11). Isolate, die von Proben aus diesem Bezirk stammten, zeigten gegenüber 20 der 22 getesteten antimikrobiellen Substanzen Resistenzen. Für Balao (n = 16), Safando (n = 18), Machala (n = 12), Isla Jambelí (n = 13) und Tenguel (n = 15) lag die Anzahl an Antibiotika-Kombinationen durchschnittlich bei 14,8.

Tabelle 51. Detektierte Antibiotikaresistenzen in *Vibrio* spp. innerhalb der Probennahmebezirke

Bezirk	Antibiotika-Kombination pro Bezirk
Balao	AMP-AMC-PRL-PTZ-CZ-CPM-FOX-CXM-KF-AK-GM-TE-CIP-LEV-OFX-SXT
Safando	AMP-AMC-PRL-PTZ-CZ-CPM-CTM-FOX-CAZ-CXM-KF-AK-GM-TE-CIP-LEV-OFX-SXT
Machala	AMP-AMC-PRL-CZ-FOX-CAZ-KF-AK-GM-TE-CIP-CL
Isla Jambelí	AMP-PRL-PTZ-CZ-CXM-KF-AK-GM-TE-CIP-LEV-OFX-SXT
Santa Rosa	AMP-AMC-SAM-PRL-PTZ-CZ-CTM-FOX-CAZ-CXM-KF-MEM-AK-GM-TE-CIP-LEV-OFX-CL-SXT
Tenguel	AMP-AMC-PRL-PTZ-CZ-FOX-CXM-KF-IMI-AK-GM-TE-CIP-CL-SXT

AMP: Ampicillin; AMC: Amoxicillin-Clavulansäure; SAM: Ampicillin-Sulbactam; PRL: Piperacillin; PTZ: Piperacillin-Tazobactam; CZ: Cefazolin; CPM: Cefepim; CTM: Cefotaxim; FOX: Cefoxitin; CAZ: Ceftazidim; CXM: Cefuroxim-Natrium; KF: Cephalothin; IMI: Imipenem; MEM: Meropenem; AK: Amikacin; GM: Gentamicin; TE: Tetracyclin; CIP: Ciprofloxacin; LEV: Levofloxacin; OFX: Ofloxacin; CL: Chloramphenicol; SXT: Trimethoprim-Sulfamethoxazol

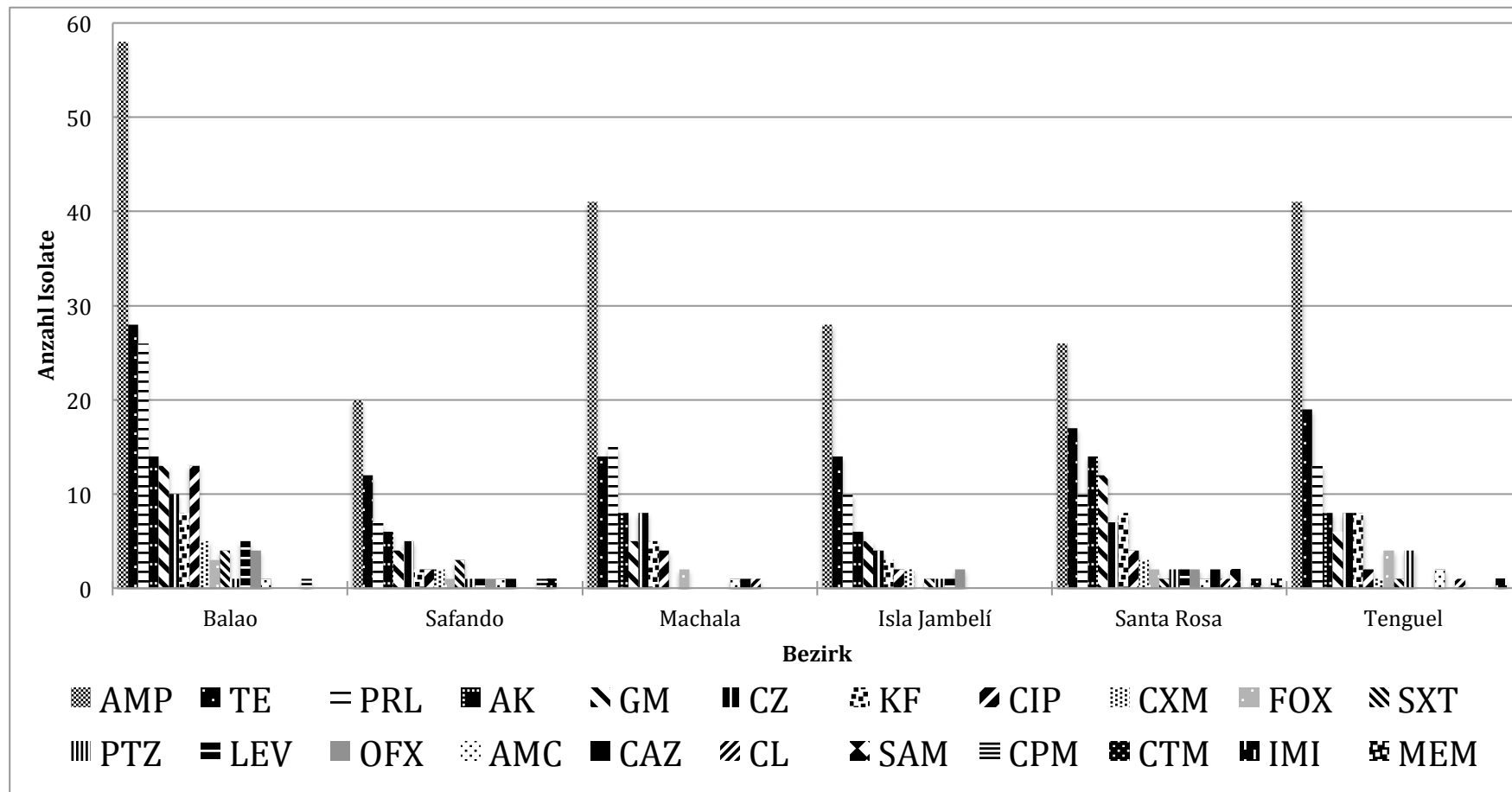


Abbildung 11. Detektierte Antibiotikaresistenzen in Bezirken

Die Abbildung stellt die Antibiotikaresistenzen dar, wie sie in den einzelnen Bezirken detektiert wurden. Die Darstellung bezieht sich auf alle untersuchten Isolate (n = 245). Aus den Bezirken Balao, Safando, Machala, Isla Jambelí, Santa Rosa und Tenguel stammten entsprechend 64, 23, 43, 30, 35 und 50 der untersuchten Isolate. AMP: Ampicillin; AMC: Amoxicillin-Clavulansäure; SAM: Ampicillin-Sulbactam; PRL: Piperacillin; PTZ: Piperacillin-Tazobactam; CZ: Cefazolin; CPM: Cefepim; CTM: Cefotaxim; FOX: Cefoxitin; CAZ: Ceftazidim; CXM: Cefuroxim-Natrium; KF: Cephalothin; IMI: Imipenem; MEM: Meropenem; AK: Amikacin; GM: Gentamicin; TE: Tetracyclin; CIP: Ciprofloxacin; LEV: Levofloxacin; OFX: Ofloxacin; CL: Chloramphenicol; SXT: Trimethoprim-Sulfamethoxazol

6 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, das Vorkommen von *Vibrio* spp. in Shrimps (*L. vannamei*) aus Ecuador zu ermitteln. Zudem erfolgten Untersuchungen zur Codierung von Toxingenen sowie hinsichtlich des Vorkommens von Antibiotikaresistenzen und der Anwesenheit von genetischen Markern, die in Zusammenhang mit AHPNS stehen, für Isolate, die aus Aquakulturen stammten. Mögliche Einflussfaktoren für ein gehäuftes Auftreten von *Vibrio* spp. wurden mithilfe von Produktions- und Managementdaten der Aquakulturen untersucht.

6.1 Prävalenz von *Vibrio* spp. in Shrimps aus Ecuador

Die Untersuchung der insgesamt 229 Proben, die sich aus den Probengruppen Einzelhandel (n = 71) und Aquakulturen (n = 158) zusammensetzten, wies das Vorkommen mindestens einer *Vibrio* sp. in 95,6 % (n = 219) der Proben nach. Die höchste Prävalenz zeigte *V. parahaemolyticus* mit 80,8 %. Darauf folgten *V. alginolyticus* (50,2 %), *V. cholerae* (11,4 %) und *V. vulnificus* (3,5 %).

Diese Ergebnisse stimmen mit bereits publizierten Studien aus Ecuador (Mohney *et al.* 1994), Thailand (Woodring *et al.* 2012), Sri Lanka (Koralage *et al.* 2012) Frankreich (Robert-Pillot *et al.* 2014) und Indien (Sudha *et al.* 2014) überein, die ebenfalls hohe Prävalenzen von *Vibrio* spp., insbesondere von *V. parahaemolyticus* und *V. alginolyticus*, aus rohen Meeresfrüchten nachwiesen.

Mohney *et al.* (1994) identifizierten bei der Untersuchung von zehn *L. vannamei*-Aquakulturen und drei Larvenzuchtanlagen in Ecuador *V. parahaemolyticus*- (n = 20), *V. alginolyticus*- (n = 8), *V. vulnificus*- (n = 6) und *V. vulnificus/V. harveyi*-Isolate (n = 4). Dies steht im Einklang mit unseren Resultaten. Im Unterschied zu unseren Ergebnissen wurde *V. cholerae* nicht detektiert, was vermutlich auf die geringe Probenzahl zurückzuführen war, die Mohney *et al.* (1994) verwendeten.

Woodring *et al.* (2012) untersuchten verschiedene von Märkten und Supermärkten stammende Meeresfrüchte in Bangkok, Thailand. Sie stellten bei 92 % der Proben das Vorkommen von mindestens einer *Vibrio* sp. fest. Die höchste Prävalenz zeigte *V. parahaemolyticus* mit 68 %. Diese Ergebnisse entsprechen unseren Daten. Im Unterschied zu unseren Beobachtungen verzeichneten Woodring *et al.* (2012) höhere Prävalenzen für *V. cholerae* (51 %), *V. vulnificus* (14 %) und *V. mimicus* (8 %), aber ein geringeres Vorkommen von *V. alginolyticus* (15 %) (Woodring *et al.* 2012). Die deutlich höhere Prävalenz von *V. cholerae* und das deutlich niedrigere Vorkommen von *V. alginolyticus* in den thailändischen Proben stehen im Kontrast zu den Ergebnissen unserer Arbeit. Eine mögliche Ursache für die höhere Prävalenz von *V. cholerae* (non-01) in Meeresfrüchten aus Thailand (51 %), gegenüber Proben aus Ecuador (11,4 %), könnte mit dem endemischen Auftreten von Cholera in Thailand (WHO 2011a) verbunden sein. Eine höhere Prävalenz von *V. cholerae* O1/O139 in Umweltproben in Cholera-Endemiegebieten, gegenüber Nicht-Endemiegebieten, wurde beschrieben (Alam *et al.* 2006; Ceccarelli *et al.* 2015). Dies könnte auch für *V. cholerae*-non-01/non-0139-Isolate zutreffen, da Untersuchungen aus Cholera-Epidemie- und Endemiegebieten demonstrierten, dass z. T. hohe Anteile (bis zu 69 %) der *V. cholerae*-Infektionen durch *V. cholerae*-non-01/non-0139-Stämme ausgelöst wurden (Dalsgaard *et al.* 1999; Hasan *et al.* 2012; Dutta *et al.* 2013). Einen Einfluss könnten auch die unterschiedlichen Nachweismethoden haben. Bei Woodring *et al.* (2012) wurde die auf

biochemischen Tests beruhende Speziesidentifizierung nicht durch PCR-basierte Nachweismethoden ergänzt. Die Identifizierung von *Vibrio* spp. mithilfe biochemischer Methoden führt häufig zu ungenauen Ergebnissen (Thompson *et al.* 2004).

Eine in Sri Lanka durchgeführte Studie zur Prävalenz von *Vibrio* spp. in Shrimps untersuchte ausschließlich Proben aus Aquakulturen und stellte in 95 % aller beprobten Becken *Vibrio* spp. fest. *V. parahaemolyticus* (91 %) war die am häufigsten vorkommende Spezies. Darauf folgten *V. alginolyticus* (19 %), *V. cholerae* (4 %) und *V. vulnificus* (2 %) (Koralage *et al.* 2012). Diese Ergebnisse stimmen überwiegend mit unseren Daten überein.

Robert-Pillot *et al.* (2014) wiesen bei der Untersuchung von Krustentieren (n = 91), Fisch (n = 64) und Muscheln (n = 12) *V. parahaemolyticus* (31,1 %), *V. cholerae* (0,6 %) und *V. vulnificus* (12,6 %) nach. Die Prävalenz von *V. parahaemolyticus* aus Shrimps, die aus Ecuador stammten, betrug 56,1 %. Ein Nachweis von mindestens einer *Vibrio* sp. erfolgte aus 58 Proben (34,7 %) (Robert-Pillot *et al.* 2014). *V. parahaemolyticus* zeigte auch hier die höchste Prävalenz, was ebenso im Einklang mit unseren Resultaten steht wie das deutlich geringere Vorkommen von *V. cholerae* und *V. vulnificus*. Die gegenüber unseren Ergebnissen deutlich niedrigere Gesamtprävalenz sowie die Prävalenzen für die einzelnen Spezies waren vermutlich darauf zurückzuführen, dass der Großteil (77,8 %) der Proben tiefgefroren war.

Sudha *et al.* (2014) detektierten in 65,5 % der untersuchten Meeresfrüchte von Märkten in Cochin, Indien *Vibrio* spp. Von den sechs nachgewiesenen *Vibrio* spp. zeigte *V. parahaemolyticus* (68,1 %) die höchste Prävalenz. *V. alginolyticus* (18,1 %), *V. vulnificus* (2 %), *V. cholerae* (1 %), *V. harveyi* (1 %) und *V. mimicus* (1 %) zeigten ein geringeres Vorkommen (Sudha *et al.* 2014). Auch diese Daten wurden durch die von uns ermittelten Ergebnisse bestätigt. In anderen Arbeiten dominierten jedoch *V. alginolyticus* (Vandenberghé *et al.* 1999; Baffone *et al.* 2000; Chitov *et al.* 2009b) oder *V. cholerae* (Banerjee *et al.* 2012).

Ein Nachweis der Spezies *V. metschnikovii* und *V. orientalis* erfolgte in unserer Arbeit nur in Einzelfällen. Nach dem wiederholten Auftreten unspezifischer PCR-Amplifikate wurden fünf Isolate mithilfe Matrix-unterstützter Laser-Desorption/Ionisation (MALDI) identifiziert. In zwei Fällen wurde *V. metschnikovii* nachgewiesen, in einem Fall *V. orientalis*. Das Vorkommen dieser *Vibrio* spp. in verschiedenen Meeresfrüchten, unter anderem in Shrimps, wurde auch in anderen Arbeiten beschrieben (Buck 1991; Elhadi *et al.* 2004; Gopal *et al.* 2005). Es ist anzunehmen, dass unsere Proben, neben den fünf identifizierten Isolaten, noch weitere Isolate von *V. metschnikovii* und *V. orientalis* enthielten. Das Vorkommen von *V. metschnikovii* in rohen Shrimps stellt ein potentiell Infektionsrisiko für den Menschen dar (Matte *et al.* 2007).

Bei der getrennten Betrachtung der von uns untersuchten Probengruppen, Einzelhandel und Aquakulturen, zeigten sich Unterschiede in Bezug auf die Prävalenz von *Vibrio* spp. Der Nachweis von mindestens einer *Vibrio* sp. erfolgte für 98,7 % der Proben von Aquakulturen. Die Proben aus dem Einzelhandel zeigten einen niedrigeren Anteil positiver Proben (88,7 %). Das Vorkommen multipler *Vibrio* spp. pro Probe wurde für beide Gruppen nachgewiesen. Hier lag der Anteil bei Proben von Aquakulturen (48,7 %) ebenfalls höher als bei Shrimps, die aus dem Einzelhandel stammten (39,4 %).

Die Unterschiede im Vorkommen von *Vibrio* spp. zwischen den beiden Probengruppen könnten durch die Lagerung der Shrimps verursacht worden sein. Aufgrund des geringen Probenumfangs kann jedoch ausschließlich eine Tendenz gesehen werden.

Bei den aus Supermarktfilialen stammenden Proben (n = 6) handelte es sich um rohe sowie um gekochte Produkte, die jedoch alle tiefgefroren waren. Die Prävalenz für mindestens eine *Vibrio* sp. betrug für diese Proben 50 %. In den übrigen Proben aus dem

Einzelhandel lag der Anteil von *Vibrio* spp. mit 95,7 % bei Wildfängen und 90,5 % bei kultivierten Shrimps, deutlich höher. Eine thermische Behandlung von Meeresfrüchten wie Einfrieren und Erhitzen hat einen starken Einfluss auf die Nachweisrate von Vibrionen (Johnston und Brown 2002; Vasudevan *et al.* 2002; Boonyawantang *et al.* 2012). Eine Inaktivierung von *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* und *V. vulnificus* erzielten Johnston und Brown (2002) mit einer Erhitzung auf 70 °C für 2 Minuten. Vasudevan *et al.* (2002) demonstrierten eine signifikante Reduktion ($p < 0,01$) von ursprünglich 10^3 - 10^4 KBE *V. parahaemolyticus* pro Fischfilet bei einer Lagertemperatur von -18 °C. Boonyawantang *et al.* (2012) ermittelten eine Reduktion der Zellzahl einer pathogenen *V. parahaemolyticus*-Population in Shrimps (*L. vannamei*) bei Temperaturen zwischen 10°C und -20°C. Die schnellste Reduktion erfolgte bei -10 °C.

Die thermische Behandlung der Proben aus Supermärkten könnte somit für ihre niedrige Prävalenz (50 %) von *Vibrio* spp. verantwortlich sein. Trotz des geringen Probenumfangs kann man daraus folgern, dass die niedrigere Nachweisrate von *Vibrio* spp. aus Shrimps aus dem Einzelhandel (88,7 %) Ecuadors, gegenüber Proben, die direkt aus Aquakulturen (98,7 %) entnommen wurden, mit deren thermischer Behandlung verbunden war und nicht mit der Herkunft der Proben zusammenhing. Dafür spricht auch, dass die Prävalenzen für die untersuchten *Vibrio* Spezies in beiden Probengruppen eine ähnliche Verteilung zeigten. Ebenso wies das ähnliche Vorkommen von multiplen *Vibrio* spp. pro Probe darauf hin, dass es keine großen Unterschiede in der Prävalenz der untersuchten *Vibrio* spp. zwischen den beiden Probengruppen gab. Zurückzuführen ist dies vermutlich darauf, dass Aquakulturanlagen in Ecuador in direkter Verbindung zum Meer standen. Es war daher kein unterschiedlicher Trend zwischen wildgefangenen und kultivierten Shrimps zu detektieren.

6.2 Molekularbiologische Charakterisierung

Untersuchungen zur Codierung von Virulenzgenen und eine Bestimmung von Serogruppen erfolgte für Isolate von *V. cholerae* und *V. parahaemolyticus*.

Alle getesteten *V. cholerae*-Isolate ($n = 29$) wurden als non-O1/non-O139 eingestuft. Keines der von uns untersuchten Isolate ($n = 29$) war Träger des *ctxA*-Gens. Es ist bekannt, dass die Mehrheit der *V. cholerae*-Stämme aus Umweltproben, die regelmäßig aus der aquatischen Umwelt isoliert werden, nicht-CTX-produzierende non-O1/non-139-Isolate sind (Faruque *et al.* 1998; Ceccarelli *et al.* 2015). Bei Untersuchungen in der Chesapeake Bay, USA, isolierten Ceccarelli *et al.* (2015) 395 *V. cholerae*-Isolate, die alle als non-O1/non-O139 eingestuft wurden. Träger des *ctxA*-Gens waren vier Isolate (1 %)(Ceccarelli *et al.* 2015). Die Tendenz eines geringen Vorkommens von *V. cholerae*-Isolaten der Serogruppen O1 und O139 in Umweltproben scheint sich nach den Resultaten unserer Arbeit auch für Ecuador zu bestätigen. Der höhere Anteil *ctxA*-tragender non-O1/non-O139-Isolate (1 %) in der Untersuchung aus den USA, gegenüber unseren Resultaten, könnte durch den deutlich größeren Probenumfang ($n = 395$) von *V. cholerae*-Isolaten zu erklären sein.

Nicht-Choleratoxin-produzierende non-O1/non-O139-Isolate können jedoch auch zu Gastroenteritiden, Septikämien, Ohr- oder Wundinfektionen beim Menschen führen (Morris 1990; Andersson und Ekdahl 2006; Kirschner *et al.* 2011; Khan *et al.* 2013). Der Konsum roher oder unzureichend erhitzter Meeresfrüchte gilt als die primäre Infektionsursache (Ceccarelli *et al.* 2015). Die Abwesenheit von *ctxA* in unseren Isolaten schließt somit eine Infektionsgefahr bei der Handhabung oder dem Verzehr von rohen oder unzureichend erhitzten Shrimps nicht aus. Da sowohl für *V. cholerae*-non-O1/non-O139-Isolate aus klinischen als auch aus Umweltproben die Codierung einer Vielzahl

von Virulenz-assoziierten Genen (*hlyA*, *rtxA*, TTSS) beschrieben ist (Chatterjee *et al.* 2009; Ceccarelli *et al.* 2015), bedarf es weiterer Untersuchungen, um die Pathogenität der isolierten *V. cholerae*-Stämme zu verifizieren.

Neben *V. cholerae* ist *V. parahaemolyticus* die zweite *Vibrio* Spezies mit pandemischem Potential (Matsumoto *et al.* 2000). Jedoch ist nur ein Prozentsatz von ca. 0,3-3 % der *V. parahaemolyticus*-Isolate, die aus Meeresfrüchten oder Umweltproben isoliert werden, pathogen (Nordstrom *et al.* 2007). Als pathogen werden Stämme betrachtet, die das thermostabile direkte Hämolysin und/oder das TDH-verwandte Hämolysin codieren (Drake *et al.* 2007). Die Tatsache, dass die meisten klinischen *V. parahaemolyticus*-Stämme *tdh* und/oder *trh* codieren, die Prävalenz derselben Gene in Isolaten aus der Umwelt aber sehr niedrig ist, ist der Grund, weshalb die Beziehung zwischen *V. parahaemolyticus*-Stämmen aus der Umwelt und klinischen Isolaten bisher noch kaum verstanden ist (Ottaviani *et al.* 2013).

Bei den von uns untersuchten Proben zeigte *V. parahaemolyticus* eine hohe Prävalenz (80,8 %) in rohen Shrimps, dagegen ergab die Untersuchung isolierter Stämme (n = 460) kein Vorkommen von *tdh* oder *trh*. Die Gefahr einer Infektion durch den Umgang oder Konsum roher oder unzureichend erhitzter Meeresfrüchte kann jedoch auch von nicht-*tdh/trh*- und nicht-T3SS2-codierenden *V. parahaemolyticus*-Stämmen ausgehen (Ottaviani *et al.* 2012). Jones *et al.* (2012) stellten die Codierung der klassischen Virulenzmarker für die Einschätzung der Pathogenität von *V. parahaemolyticus* infrage. Die Pathogenität von *V. parahaemolyticus* beruht auf einem komplexeren Pathogenitätsmechanismus (Jones *et al.* 2012). Aufgrund des Fehlens der klassischen Virulenzmarker bei den in dieser Arbeit isolierten *V. parahaemolyticus*-Stämmen kann keine eindeutige Aussage zu deren Pathogenität getroffen werden. Erst Untersuchungen zum Vorkommen weiterer Virulenzgene könnten Aufschluss über das Pathogenitätspotential geben.

Bisher gibt es keine Daten zum Vorkommen der Serogruppen von *V. parahaemolyticus* in Shrimps aus Ecuador. Deshalb wurden 328 unserer *V. parahaemolyticus*-Isolate analysiert. Es konnten elf der zwölf Serogruppen detektiert werden (Tab. 40). Die häufigste Serogruppe war O11 (39,9 %). An zweiter Stelle folgte O1 (17,1 %). Die Detektion zahlreicher Serogruppen aus Umweltproben korrelierte mit den Daten aus anderen Arbeiten. Die von Cabrera *et al.* (2004) untersuchten *V. parahaemolyticus*-Isolate (n = 46) aus Mexiko verteilten sich auf sechs Serogruppen, mit O3 als Häufigster (30 %) (Cabrera-Garcia *et al.* 2004). Ottaviani *et al.* (2013) ermittelten für 192 aus Italien stammende *V. parahaemolyticus*-Isolate, 51 verschiedene Serogruppen, mit O3:Kut als Häufigster (8,3 %). Mit den verfügbaren Antiseren waren 44,8 % der Kapselantigene und 13,5 % der somatischen Antigene nicht bestimmbar (Ottaviani *et al.* 2013). Eine Studie aus den USA wies bei *V. parahaemolyticus*-Isolaten aus Umweltproben (n = 67) und klinischen Proben (n = 77) mit Ausnahme von O2, O7 und O9 alle bekannten O-Serogruppen nach. Die Kapselantigene waren zu 49,3 % nicht bestimmbar. Von den 35 ermittelten Serogruppen zeigten neun ein Auftreten sowohl bei klinischen als auch bei Umweltproben (Jones *et al.* 2012).

6.3 Datenerhebung zu Produktions- und Managementfaktoren in Aquakulturen

Zusätzlich zur Bestimmung der Prävalenzen von Vibrionen in Shrimps wurde der Einfluss verschiedener Produktions- und Managementfaktoren von Shrimps-Aquakulturen auf das Vorkommen von *Vibrio* spp. untersucht. Für fünf der sieben

untersuchten Faktoren wurde ein signifikanter Einfluss auf die Prävalenz von einer oder mehrerer *Vibrio* spp. festgestellt.

Das Vorkommen, die Verbreitung und Persistenz von Vibrionen, die Teil des autochthonen Mikrobioms in marinen Gewässern sind, werden durch Umweltparameter des Meeres beeinflusst (Caburlotto *et al.* 2012). Die Temperatur wurde von Gil *et al.* (2004) und Huq *et al.* (2005) als Schlüsselfaktor für ein erhöhtes Vorkommen von *V. cholerae* und Cholera-Infektionen in Peru und Bangladesch identifiziert. Jedoch wird angenommen, dass sich der Einfluss von Umweltparametern auf das Vorkommen von *Vibrio* spp. in verschiedenen Regionen der Welt unterschiedlich auswirkt. Daher existiert kein generelles Einverständnis darüber, welche Faktoren das Vorkommen und die Persistenz von *Vibrio* spp. fördern (Caburlotto *et al.* 2012).

Einen Zusammenhang zwischen dem verstärkten Auftreten von *Vibrio* spp. und höheren Wassertemperaturen (33-34 °C gegenüber üblichen 28-29 °C) sowie einer Salinität von 28-40 ppt, gegenüber einem üblichen Wert von 12-15 ppt, wurde von Mohny *et al.* (1994) für Ecuador beschrieben. In den von uns vorgestellten Ergebnissen zeigten die Salinität und die Temperatur des Beckenwassers einen Einfluss auf jeweils drei *Vibrio* spp.

Eine Untersuchung aus Mexiko von Castañeda Chávez *et al.* (2005) beschrieb die Wassertemperatur und den Salzgehalt als wichtige Faktoren in Bezug auf das Vorkommen von *V. cholerae*. Sie isolierten *V. cholerae* non-O1 aus Austern und Wasser bei durchschnittlichen Wassertemperaturen von > 28 °C. Die Präsenz von *V. cholerae* O1 in Austern stand in Zusammenhang mit Temperaturen von > 31 °C (Castañeda Chávez *et al.* 2005). Dies steht im Einklang mit unseren Resultaten. Wir wiesen *V. cholerae* (non-O1/non-O139) vermehrt bei Temperaturen von ≥ 28 °C nach ($p = 0,04$).

Weiterhin zeigte sich bei Castañeda Chávez *et al.* (2005) ein signifikant ($p < 0,05$) höheres Vorkommen von *Vibrio* non-O1 in Wasserproben bei Temperaturen von 18,7-32,4 °C und einer Salinität von 0,149-17 ppt. Toxin-produzierende *V. cholerae*-O1-Isolate wurden, entsprechend der beiden Untersuchungsorte, bei durchschnittlich 31,4 °C, einem Salzgehalt von 24,18 ppt und einem pH-Wert von 9,15 sowie bei 31,1 °C, einem Salzgehalt von 6,27 ppt und einem pH-Wert von 8,74 nachgewiesen. Der Nachweis von *V. cholerae* bei einem Salzgehalt von ≤ 25 ppt ($p = 0,0007$) und einem pH-Wert von > 8 ($p = 0,003$) ist im Einklang mit unseren Resultaten. Saisonale Veränderungen der Wassertemperatur und der Salinität erklärten bei Castañeda Chávez *et al.* (2005) in den meisten Fällen das variable Vorkommen von *V. cholerae*. Beide Parameter zeigten einen signifikanten Zusammenhang. *V. alginolyticus* wurde bei Temperaturen von 21,8 °C und einem Salzgehalt von 11,05 ppt detektiert (Castañeda Chávez *et al.* 2005). In unserer Arbeit zeigte sich für *V. alginolyticus* ebenfalls ein signifikanter ($p = 0,0001$) Zusammenhang mit Temperaturen von < 28 °C. Es zeigte sich jedoch ein signifikant ($p = 0,01$) höherer Anteil von *V. alginolyticus* bei einer Salinität von > 25 ppt.

In der vorliegenden Arbeit wurde *V. parahaemolyticus* signifikant ($p = 0,0006$) häufiger nachgewiesen, wenn die Beckentemperatur bei ≥ 28 °C lag. Eine positive Korrelation zwischen dem Vorkommen von *V. parahaemolyticus* und der Temperatur von Meerwasser wurde mehrfach beschrieben (DePaola *et al.* 1990; Sobrinho *et al.* 2010). Die Ergebnisse von Sobrinho *et al.* (2010) zeigten einen signifikanten ($p < 0,001$) Zusammenhang zwischen dem Vorkommen von *V. parahaemolyticus* in Austern und der Wassertemperatur vor der brasilianischen Küste. Mit der Salinität ergab sich keine Korrelation ($p = 0,34$), was darauf hinwies, dass der Salzgehalt kein primärer Faktor für das Wachstum dieses Bakteriums war (Sobrinho *et al.* 2010). Auch DePaola *et al.* (1990) identifizierten die Temperatur als den Hauptfaktor für die Verbreitung von *V. parahaemolyticus* in den USA. Der Einfluss der Salinität ist demnach bei

V. parahaemolyticus geringer als bei *V. cholerae* (Kaper *et al.* 1979) und *V. vulnificus* (Kelly 1982) (DePaola *et al.* 1990). Dies steht im Einklang mit unseren Ergebnissen. Für die Salinität des Wassers, die in unserer Studie zwischen 5 und 35 ppt betrug, stellten wir keinen signifikanten Einfluss auf die Nachweisrate von *V. parahaemolyticus* fest. Im Gegensatz zu diesen Beobachtungen beschrieben Martinez-Urtaza *et al.* (2008b) für Galizien (Spanien) die Salinität als den primären Faktor, der die Verbreitung von *V. parahaemolyticus* beeinflusste. Für die Temperatur des Meerwassers hingegen wurde nur ein sekundärer Effekt für die Verbreitung von *V. parahaemolyticus* festgestellt (Martinez-Urtaza *et al.* 2008b). Martinez-Urtaza *et al.* (2008b) vermuteten, dass die Temperatur als primärer Faktor für die Verbreitung von *V. parahaemolyticus* dient, wenn der Salzgehalt des Wassers in einem niedrigen Bereich (< 30 ppt) liegt. Weist die Salinität hohe Werte auf, wie in ihrer Studie (30,9-36,2 ppt), ist sie der entscheidende Faktor für das Auftreten von *V. parahaemolyticus* (Martinez-Urtaza *et al.* 2008b).

Bei *V. vulnificus* war ein Salzgehalt von ≤ 25 ppt mit einer höheren Prävalenz (13,7 % gegenüber 1,2 %) assoziiert. Dies stimmt mit den Resultaten von Kelly (1982) überein. Bei seinen Untersuchungen zeigte *V. vulnificus* bei einem Salzgehalt von < 16 ppt eine signifikant ($p = 0,02$) höhere Nachweisrate. Die positive Korrelation mit Temperaturen > 25 °C, die Kelly (1982) detektierte, wiesen wir nicht nach.

Die Untersuchung der Größe von Aquakulturen als Produktionsfaktor zeigte, dass *V. parahaemolyticus* bei Aquakulturen mit einer Größe von < 150 ha eine signifikant ($p = 0,03$) höhere Prävalenz aufwies. Für *V. alginolyticus* zeigte sich eine höhere Nachweisrate in Aquakulturen, die eine Größe von ≥ 150 ha besaßen. Mikrobiologische Kontrollen zum Vorkommen von *Vibrio* spp. werden in Aquakulturen aufgrund ihrer Relevanz für die Shrimps-Gesundheit regelmäßig durchgeführt und dienen als Grundlage für das Management der Becken, darunter auch für die Anwendung von Antibiotika (López-Torres 2001; Noriega-Orozco *et al.* 2007). Man könnte annehmen, dass dies auch für Ecuador zutrifft, jedoch überwiegend für größere Aquakulturen (ASC 2014; Unger 2014), die häufig eine bessere Organisation aufweisen und modernere Techniken verwenden als kleinere Aquakulturanlagen (Alday *et al.* 2006; Rodriguez Loaiza und Sandoval Romero 2010; Anonym 2014). Das vermehrte Vorkommen von *V. alginolyticus* bei Aquakulturen, die eine Größe von ≥ 150 ha aufwiesen, spricht jedoch nicht dafür, dass eine mutmaßlich bessere Organisation des Aquakulturmanagements eine Rolle für das Vorkommen von *Vibrio* spielt. Bei der Betrachtung des Probiotikaeinsatzes als Managementfaktor zeigte sich für *V. alginolyticus* ein signifikant ($p = 0,03$) höheres Vorkommen in Shrimps, die nicht mit Probiotika behandelt wurden. Verschiedene Studien zum Probiotikaeinsatz in Aquakulturen wiesen eine Reduktion von *Vibrio* spp. in behandelten Zuchtbecken nach (Rengpipat *et al.* 1998; Vieira *et al.* 2007; Decamp *et al.* 2008). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass der Probiotikaeinsatz auch in den von uns untersuchten Aquakulturen zu einer Reduktion von *V. alginolyticus* geführt hat. Für die weiteren von uns untersuchten *Vibrio* spp. wurde hingegen kein signifikanter ($p > 0,05$) Zusammenhang mit dem Probiotikaeinsatz detektiert. Die Auswertbarkeit dieses Faktors ist jedoch aufgrund des geringen Anteils an unbehandelten Becken fraglich.

Die bei der Beprobung der Shrimps-Aquakulturen erhobenen Daten zur Herkunft der Larven demonstrierten die Verwendung von zehn verschiedenen Zuchtanlagen. Die Prävalenz von *V. alginolyticus*, *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* und *V. vulnificus* zeigte zum Teil große Unterschiede in Abhängigkeit zur verwendeten Zuchtanlage (Abb. 8). Insbesondere das Vorkommen von *V. alginolyticus* (27,7 %-90 %) variierte stark. Die Prävalenz von *V. alginolyticus* betrug bei der Betrachtung aller Proben ($n = 229$) 50,2 %. Bei der Auswertung auf der Ebene des Einzelhandels (59,2 %) und der Aquakulturen

(46,2 %) zeigte das Vorkommen von *V. alginolyticus* ebenfalls einen deutlich geringeren Anteil als der für Larvenzuchtanlagen 1 (90 %) und 4 (70 %) nachgewiesene Prozentsatz. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die Herkunft der Larven die Prävalenz von *Vibrio* spp. in Shrimps-Zuchten beeinflusst. *Vibrio* spp., die Teil der Darmflora sind, könnten von den Larvenzuchtanlagen in die Shrimps-Aquakulturen überführt worden sein (Tendencia und de la Pena 2001). In den untersuchten Farmen wurde eine prompte Überführung der Larven ohne vorherige Klärung durchgeführt. Für *V. parahaemolyticus* (70 %-96,4 %), *V. cholerae* (5 %-14,3 %) und *V. vulnificus* (0 %-8,5 %) zeigten sich ebenfalls variierende Prävalenzen.

6.4 Akutes Hepatopankreatisches Nekrose-Syndrom

V. parahaemolyticus besitzt neben seiner Bedeutsamkeit als humanpathogenem Erreger auch Relevanz als Auslöser von Fischkrankheiten. *V. parahaemolyticus* gilt als ein bedeutender bakterieller Infektionserreger für Shrimps (Aguirre-Guzman *et al.* 2001; Sudheesh und Xu 2001; Jayasree *et al.* 2006).

Für die Shrimps-Industrie von Belang ist das von *V. parahaemolyticus* ausgelöste Akute Hepatopankreatische Nekrose-Syndrom oder Early Mortality Syndrome, das zu großen Verlusten in asiatischen und mexikanischen Shrimps-Aquakulturen geführt hat (Flegel und Lo 2014; Nunan *et al.* 2014). Das Auftreten von AHPNS wurde zuerst in China (2009) festgestellt und anschließend in Vietnam (2010), Malaysia (2011), Thailand (2012) und Mexiko (2013) bestätigt (Flegel und Lo 2014; Tran *et al.* 2014). Informationen über eine weitere Ausbreitung auf die mittelamerikanischen Länder Nicaragua und Honduras wurden im Mai 2015 veröffentlicht. Die Proben, die ein positives Ergebnis für AHPNS zeigten, stammten aus den Jahren 2013, 2014 und 2015 (CNA 2015).

Die molekularbiologische Untersuchung von 188 *V. parahaemolyticus*-Isolaten, zur Detektion des für AHPNS verantwortlichen Plasmids (Yang *et al.* 2014), ergab ein negatives Resultat. Sechs Isolate, die von Märkten stammten, zeigten bei der Verwendung des Primer-Sets AP2 Banden bei 400 bp, 300 bp oder 150 bp. Diese Ergebnisse wurden als negativ gewertet. Das Auftreten unspezifischer Banden unterhalb von 700 bp entspricht einem Bericht von Flegel (2014) (Flegel 2014). Für das hier verwendete PCR-System (AP1 und AP2) erfolgte 2014 eine Weiterentwicklung, die AP3 genannt wurde und seither empfohlen wird (Sirikharin *et al.* 2014). Die Primer der von Sirikharin *et al.* (2014) veröffentlichten PCR-Methode (AP3) zeigten, verglichen mit den Resultaten für das Primer-Set AP2, eine höhere Spezifität (100 %) und einen höheren positiven Vorhersagewert (100 %). Für das Primer-Set AP2 lagen die Spezifität bei 97,7 % und der positive Vorhersagewert bei 97,4 %. Sirikharin *et al.* (2014) empfahlen für positive Ergebnisse, die unter Verwendung des Primer-Sets AP2 ermittelt wurden, eine zusätzliche Überprüfung mittels der AP3-Methode. Der negative Vorhersagewert lag für beide Primer-Sets bei 100 %. Eine Wiederholung unserer Ergebnisse mit dem neueren PCR-System (AP3) erachteten wir daher als nicht notwendig.

Für den Zeitraum der Probennahme waren keine Berichte über das Auftreten von AHPNS in Ecuador bekannt. Die in Ecuador gezüchtete Shrimps-Spezies *L. vannamei* gilt jedoch als empfänglich (FAO 2013a) und ein Auftreten in Wildpopulationen oder das Vorhandensein des Erregers in Aquakulturen, ohne Symptome auszulösen, konnte nicht ausgeschlossen werden. Darüber hinaus meldet Ecuador Krankheiten von Krustentieren nicht an die OIE (Office International des Epizooties) (Thompson 2014). Detaillierte Informationen zum Aufkommen von Shrimps-Krankheiten lagen somit nicht vor.

Betrachtete man die Verbreitung bekannter pandemischer Shrimps-Erkrankungen, wie

des White Spot Syndrome Virus (WSSV) und des Taura Syndrom Virus (TSV) oder das Auftreten des pandemischen *V. parahaemolyticus*-Klons O3:K6 in Südamerika ließ sich auch für AHPNS eine zunehmende globale Ausbreitung befürchten. Mit dem Ausbruch von AHPNS in Mexiko wurden die ersten Fälle außerhalb Asiens beschrieben (Nunan *et al.* 2014). Das 1992 in Ecuador nachgewiesene TSV verbreitete sich innerhalb weniger Jahre auf alle großen *L. vannamei*-Populationen der Region. Darunter waren Kolumbien und Peru (1993), Brasilien, El Salvador, Honduras, Guatemala, Hawaii, das Festland der USA (1994), Panama, Nicaragua, Belize, Mexiko (1995) und Costa Rica (1996) (Hasson *et al.* 1999). Zu einer Übertragung nach Asien kam es vermutlich durch infizierte Shrimps-Larven aus Mittelamerika (Lightner *et al.* 2012b).

Für das WSSV erfolgte eine Ausbreitung von Asien nach Amerika. Das Virus trat erstmals 1992 in Nordostasien auf und verbreitete sich rasch auf die Shrimps-Zuchtgebiete Asiens und des Indopazifiks (Lightner *et al.* 1997). Die Übertragung der Erkrankung auf den amerikanischen Kontinent erfolgte zunächst in den USA (1995), mutmaßlich über den Import gefrorener Shrimps und deren Weiterverarbeitung (Lightner 1996; Lightner *et al.* 1997). Der Ausbruch von WSSV in Mittel- und Südamerika (1999) war wahrscheinlich auf die Einfuhr infizierter Larven aus asiatischen Aquakulturen zurückzuführen (Alday de Graindorge 2000; McClennen 2004; Walker und Mohan 2009). In Zusammenhang mit der Ausbreitung der siebten Cholera-Pandemie (1991) und der Verbreitung des pandemischen *V. parahaemolyticus*-Klons O3:K6 (1997) auf Südamerika wird eine passive Übertragung von *Vibrio*-Populationen aus dem asiatischen Raum über das Meer, in Assoziation mit einer El Niño-Episode, diskutiert (Martinez-Urtaza *et al.* 2008a). Martinez-Urtaza *et al.* (2008a) legten die Vermutung nahe, dass durch eine El Niño-Episode ein temporärer, ostwärts gerichteter Korridor entsteht, der zu einer Übertragung von marinen Organismen und damit assoziierten Mikroorganismen führen könnte. Für den Ausbruch von AHPNS in Mexiko, der im April 2013 stattfand, wurde als Ursache ein illegaler Import von Shrimps-Larven, die zur Zucht bestimmten waren, vermutet (Flegel 2013).

Die Tatsache, dass AHPNS eine neu auftretende Erkrankung von Shrimps in Aquakulturen darstellte, deren Verbreitung im aquatischen Milieu erfolgte, machte Voraussagen zur weiteren Ausbreitung und den eventuellen ökonomischen Folgen für betroffene Länder sehr schwierig. Die oben genannten Verbreitungswege der viralen Shrimps-Pandemien TSV und WSSV oder eine Übertragung in Zusammenhang mit einer El Niño-Episode, erschienen jedoch auch für AHPNS möglich. McClenn (2004) identifizierte als Gründe für die schnelle Verbreitung von WSSV eine Kombination aus der Stärke der Erkrankung, fehlendem Bewusstsein und Prävention, die Internationalisierung der Shrimp-Industrie und die Steigerung intensiver Haltungssysteme (McClennen 2004). Für die Verbreitung von AHPNS in Asien könnten ähnliche Gründe eine Rolle gespielt haben (Flegel 2013). Für Ecuador waren jedoch in einigen Punkten Unterschiede identifizierbar.

Die gegen AHPNS ab 2013 in Ecuador getroffenen Präventivmaßnahmen, wie z. B. das Importverbot von lebenden Shrimps aus Ländern, in denen die Erkrankung detektiert wurde (Acuerdo Ministerial No.043, 25. Juli 2013, Acuerdo Ministerial No.001 24. Juli 2014), oder die Erhöhung biologischer Sicherheitsmaßnahmen (INP 2014) könnten eine dauerhafte Lösung sein, um eine weitere Ausbreitung von AHPNS zu verhindern. Vergleichbare Importverbote und Aktionspläne wurden auch für andere lateinamerikanische Länder wie Peru, Mexiko, Guatemala, Honduras und Panama entwickelt (Navarro *et al.* 2013; MEF 2014).

Weiterhin zeigte eine von Seafood Watch angefertigte Studie zur Evaluierung der Shrimps-Industrie in Ecuador generelle Unterschiede zu den Haltungssystemen von

Shrimps in Asien auf, die auch einen Einfluss gehabt haben könnten. Wie auch in der vorliegenden Arbeit beobachtet, existierten in Ecuador hauptsächlich extensive und semi-intensive Haltungssysteme. Die Menge an Larven, die bei der Aussaat in die Zuchtbecken eingesetzt wurde, lag in Ecuador für etwa 80 % des Sektors bei 7-12 Larven/m², wohingegen in Asien 60 Larven/m² üblich waren (Thompson 2014). Untersuchungen aus Vietnam und Thailand zur Ermittlung von Risikofaktoren für AHPNS, beschrieben eine erhöhte Anfälligkeit für AHPNS bei intensiven Haltungssystemen (NACA 2012; FAO 2013a). Daneben schien der Einsatz von Probiotika die Auswirkungen von AHPNS zu reduzieren (NACA 2012). Der Probiotikaeinsatz wurde zur AHPNS-Prävention empfohlen (MAC 2013). Die Verwendung von Probiotika wurde für den Großteil aller Aquakulturen in Ecuador angenommen (Thompson 2014). De Schryver *et al.* (2014) erachteten mikrobiologische Management Strategien als einen Schlüsselfaktor bei der AHPNS-Prävention (De Schryver *et al.* 2014).

Die in Ecuador angewandte Praxis einer dauerhaft niedrigen Produktionsstärke, welche aus dem Auftreten und der Persistenz von Viruserkrankungen (TSV, WSSV) resultierte (Thompson 2014), stand im Kontrast zu den Beobachtungen, die Flegel (2013) für den asiatischen Raum machte. Flegel (2013) vermutete, dass die schnelle regionale Verbreitung von AHPNS in Asien und der gleichzeitig beobachtete Anstieg von Infektionen mit Mikrosporidien (*Enterocytozoon hepatopenaei*) möglicherweise Ergebnis einer industrieweiten Abnahme der biologischen Sicherheitsmaßnahmen gewesen sein könnten. Die Ursache dessen könnte das stark reduzierte Auftreten von Krankheiten gewesen sein, das mit dem seit 2001 weitverbreiteten Einsatz von spezifisch pathogen-freien *L. vannamei*, erreicht wurde (Flegel 2013).

Eine andere Ursache für das bisherige Nicht-Auftreten von AHPNS in Ecuador könnte möglicherweise mit den hohen Raten an Antibiotikaresistenzen in Zusammenhang gestanden haben, die in den von uns untersuchten *V. parahaemolyticus*-Isolaten detektiert wurden. Yang *et al.* (2014) identifizierten in AHPNS-auslösenden *V. parahaemolyticus*-Isolaten ein extrachromosomales Plasmid, das die Sequenz eines insektiziden *pirAB* Toxins trug, welches für das Auslösen von AHPNS verantwortlich sein könnte (Yang *et al.* 2014). Da viele Antibiotikaresistenzen auf Plasmiden codiert sind und über diese weitergegeben werden (Carattoli 2013), könnte angenommen werden, dass die von uns festgestellten Resistenzen ebenfalls Plasmid-codiert waren. Dies führt zu der Überlegung, dass für *Vibrio* spp. durch das Bestehen eines permanenten äußeren Selektionsdruckes, die Aufgabe von Antibiotikaresistenzen zum Nachteil geraten würde. Dies hätte zur Folge, dass das große, von Yang *et al.* (2014) identifizierte Plasmid, das mutmaßlich Träger von für AHPNS verantwortlichen Genen ist, sich nicht behaupten kann. Plasmide, die das gleiche Reproduktionssystem besitzen, sind nicht kompatibel, dadurch verhindert die hohe Frequenz an Plasmiden möglicherweise die Weitergabe des AHPNS-auslösenden Plasmids (Novick 1987). Untersuchungen zur Antibiotikasensibilität aus Thailand und Vietnam zeigten, dass AHPNS-auslösende *V. parahaemolyticus*-Isolate Antibiotikaresistenzen besaßen oder im Laufe der Zeit erwarben (Kongrueng *et al.* 2014; Tran *et al.* 2014). Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen zeigten diese Untersuchungen jedoch kein hohes Maß an Multiresistenzen. Darüber hinaus können Resistenzen auch chromosomal codiert sein.

6.5 Antibiotikaresistenz

Der Einsatz von Antibiotika in Lebensmittel-liefernden Tieren und damit assoziierte Resistenzen sind ein weltweites Problem (Park *et al.* 2012). Gelangen verabreichte Antibiotika in die Umwelt, kann das zur Selektion von antibiotikaresistenten Bakterien

führen. Die direkte Gefahr für den Konsumenten liegt in Antibiotikarückständen, die sich im Gewebe von tierischen Produkten anreichern können und in der Übertragung von antibiotikaresistenten Bakterien auf den Menschen (Park *et al.* 2012; Romero *et al.* 2012). Darüber hinaus besteht die Möglichkeit des horizontalen Transfers von Resistenzgenen auf humanpathogene Erreger (Defoirdt *et al.* 2007). Der Zusammenhang der Nutzung von Antibiotika in Aquakulturen und der Häufigkeit von codierten Resistenzgenen in Bakterien wurde beschrieben (Angulo 2000; Cabello 2006; Jayasree *et al.* 2006). Für *V. cholerae* ist das Auftreten von Antibiotikaresistenzen in Umweltstämmen und klinischen Isolaten dokumentiert (Campos *et al.* 2004), ebenso ein möglicher Zusammenhang mit dem Antibiotikaeinsatz in Shrimps-Aquakulturanlagen (Weber *et al.* 1994). Für nicht-Cholera Vibrionen existieren weniger Daten zur Antibiotikasensibilität (Ottaviani *et al.* 2001).

Vor diesem Hintergrund erfolgte für 245 Isolate der Spezies *V. alginolyticus* (n = 67), *V. cholerae* (n = 16), *V. parahaemolyticus* (n = 154) und *V. vulnificus* (n = 8) eine Untersuchung auf ihre Empfindlichkeit gegenüber 22 Antibiotika aus sechs Stoffgruppen. Nach eingehender Literaturrecherche scheint diese Arbeit eine von wenigen Veröffentlichungen (Mohney *et al.* 1994) zu sein, die verschiedene *Vibrio* spp. aus Aquakultur-Shrimps in Ecuador isolierte und auf ihre Antibiotikasensibilität hin untersuchte. Der Fokus anderer Arbeiten lag häufig ausschließlich auf *V. cholerae*-Isolaten, die meist aus klinischen Proben stammten (Threlfall *et al.* 1993; Weber *et al.* 1994; Aldighieri *et al.* 1997; Gabastou *et al.* 2002) oder betraf nur eine geringe Zahl (≤ 10) von Proben aus Ecuador, die neben verschiedenen Meeresfrüchten aus anderen Ländern untersucht wurden (Berry *et al.* 1994; Wang *et al.* 2011).

Die 245 getesteten *Vibrio*-Isolate zeigten zu 95,9 % Resistenzen gegenüber mindestens einem Antibiotikum. Der Anteil von multiresistenten Isolaten lag bei 75,9 %. Vergleichbare Resultate von einer hohen Tendenz an Antibiotikaresistenzen, jedoch unter Einbeziehung unterschiedlicher *Vibrio* spp. und Antibiotika, sind aus anderen Regionen mit Shrimps-Aquakulturen bekannt (Manjusha *et al.* 2005; Costa *et al.* 2015). Aus Brasilien stammende *Vibrio* spp., die aus *L. vannamei* isoliert wurden (n = 100), zeigten zu 75 % Resistenzen gegenüber mindestens einem Antibiotikum. Multiresistenzen wurden für 33 % der Isolate detektiert (Costa *et al.* 2015). Aus Wasserproben und Meeresfrüchten in Indien isolierte *Vibrio* spp. (n = 119) zeigten zu 83,2 % Resistenzen gegenüber einem oder mehreren Antibiotika. Multiresistenzen wurden bei 54 % der Isolate detektiert (Manjusha *et al.* 2005).

Der Anteil an resistenten Isolaten variierte für die vier in der vorliegenden Arbeit untersuchten *Vibrio* spp. zum Teil stark. *V. parahaemolyticus*-Isolate wiesen mit 98,7 % die meisten resistenten Isolate auf. Resistent gegenüber zwei oder mehr Antibiotika waren 76 % der Isolate. Diese Daten korrelieren mit den Ergebnissen von Jun *et al.* (2012) aus Südkorea, die für alle untersuchten *V. parahaemolyticus*-Isolate Multiresistenzen feststellten. Sie beobachteten pro klinischem Isolat (n = 2) Resistenzen gegenüber mehr als vier Antibiotika. Für *V. parahaemolyticus*-Isolate aus Meeresfrüchten und Umweltproben (n = 22) wurden mehr als elf Resistenzen pro Isolat nachgewiesen (Jun *et al.* 2012). Antibiotikaresistente *V. parahaemolyticus*-Isolate aus klinischen Proben beschrieben auch Ottaviani *et al.* (2012). Diese aus Italien stammende Studie untersuchte mit Gastroenteritiden assoziierte *V. parahaemolyticus*-Isolate, die Resistenzen gegenüber jeweils sechs verschiedenen Antibiotika aufwiesen (Ottaviani *et al.* 2012).

Für *V. alginolyticus* (95,5 %) lag der Gesamtanteil an resistenten Isolaten in der vorliegenden Arbeit unter dem von *V. parahaemolyticus* (98,7 %). Es zeigte sich aber ein höherer Prozentsatz an Multiresistenzen. Für *V. alginolyticus* wurde sowohl die höchste

Anzahl an multiresistenten Isolaten (83,6 %), als auch die höchste Anzahl an Resistenzen pro Isolat (bis zu 18) ermittelt. Für *V. parahaemolyticus* wurden bis zu sieben Resistenzen pro Isolat detektiert. Das Resistenzprofil der 22 getesteten Antibiotika war bei *V. parahaemolyticus*- und *V. alginolyticus*-Isolaten sehr ähnlich. *V. parahaemolyticus*-Isolate zeigten zu 18 der getesteten Antibiotika Resistenzen. Für *V. alginolyticus* wurden, mit Ausnahme von Imipenem, gegenüber allen getesteten Substanzen Resistenzen festgestellt. Auf Ampicillin-Sulbactam, Cefepim, Cefotaxim, Imipenem und Meropenem, gegenüber denen nur eine der beiden Spezies Resistenzen zeigte, entfielen jeweils nur ein bis zwei resistente Isolate. Ähnliche Resultate von *V. alginolyticus*- und *V. parahaemolyticus*-Isolaten mit Multiresistenzen sind beschrieben (Baker-Austin *et al.* 2008; Jun *et al.* 2012; Lajnef *et al.* 2012; Letchumanan *et al.* 2015). Ein höheres Aufkommen von Multiresistenzen bei *V. alginolyticus* gegenüber *V. parahaemolyticus*-Isolaten beobachteten auch Oh *et al.* (2011). Aus Fisch-Aquakulturen in Südkorea isolierte *V. alginolyticus*-Isolate (n = 153) zeigten zu 85,6 % Resistenzen gegenüber mehr als einem Antibiotikum. Für *V. parahaemolyticus*-Isolate (n = 218) stellten sie 65,1 % fest. Der Anteil an Resistenzen gegenüber vier und mehr Antibiotika betrug für *V. alginolyticus* 11,1 %, für *V. parahaemolyticus* nur 5 % (Oh *et al.* 2011).

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten *V. cholerae*- und *V. vulnificus*-Isolate wiesen einen höheren Grad an Sensibilität auf als *V. alginolyticus* und *V. parahaemolyticus*. Zwar wurden bei zwölf *V. cholerae*-Isolaten (75 %) Resistenzen gegenüber ein bis drei Antibiotika detektiert, jedoch entfielen diese nur auf zehn Antibiotika aus drei Stoffgruppen (Beta-Lactame, Aminoglykoside, Tetracycline). Der Anteil an Multiresistenzen lag bei 56,3 %. Aus Brasilien stammende *V. cholerae*-Isolate aus Umweltproben (n = 14), die nicht zur Serogruppe O1 gehörten, zeigten mehrheitlich (65 %) Resistenzen zu ein bis zwei Antibiotika (Campos *et al.* 2004). Die Resistenzen verteilten sich auf fünf Antibiotika aus fünf Stoffgruppen (Beta-Lactame, Aminoglykoside, Sulfonamide, Tetracycline, Nitrofurane). *V. cholerae*-O1-Isolate aus klinischen Proben (n = 92) zeigten einen höheren Anteil an Resistenzen (98 %). Ebenfalls aus Umweltproben stammende *V. cholerae*-O1-Isolate (n = 42) zeigten zu 50 % Resistenzen gegenüber ein bis drei Antibiotika (Campos *et al.* 2004). In der vorliegenden Arbeit betrug der Anteil an *V. vulnificus*-Isolaten, die gegenüber mindestens einem Antibiotikum resistent waren 87,5 %. Dieser Anteil an resistenten Isolaten ist vergleichbar mit dem von Radu *et al.* (1998) detektierten Wert (83,3 %) bei der Untersuchung von *V. vulnificus*-Isolaten (n = 36) aus rotfleischigen Archenmuscheln (*Anadara granosa*). Im Gegensatz zu den in unserer Studie untersuchten Isolaten zeigten die *V. vulnificus*-Isolate aus Malaysia jedoch bis zu neun Resistenzen pro Isolat, die sich gegen Antibiotika aus sechs Stoffgruppen richteten (Radu *et al.* 1998). Wir detektierten Resistenzen gegenüber sechs Antibiotika aus drei Stoffgruppen (Beta-Lactame, Aminoglykoside, Tetracycline) und beobachteten bis zu zwei Resistenzen pro Isolat. Für *V. vulnificus* wurden insgesamt die wenigsten Resistenzen detektiert. *V. cholerae*- und *V. vulnificus*-Isolate wiesen meist Resistenzen gegenüber Ampicillin, Piperacillin und Tetracyclin auf. Im Gegensatz zu *V. alginolyticus* und *V. parahaemolyticus* zeigten sie zu 100 % Sensibilität gegenüber Ciprofloxacin, Levofloxacin, Ofloxacin, Chloramphenicol und Trimethoprim-Sulfamethoxazol. *V. cholerae* wies Resistenzen gegenüber einigen Cephalosporinen auf, die bei *V. vulnificus* nicht vorhanden waren. Alle untersuchten *V. vulnificus*-Isolate (n = 8) waren gegenüber Cephalosporinen, Cephamycinen und Carbapenemen sensibel.

Der hohe Anteil an resistenten Isolaten von *V. alginolyticus* und *V. parahaemolyticus* und der deutlich niedrigere Anteil bei *V. cholerae* und *V. vulnificus* könnten mit der

unterschiedlichen Prävalenz der verschiedenen *Vibrio* spp. zusammenhängen. Die genetischen Determinanten für Antibiotikaresistenzen, die in Mikroorganismen aus der aquatischen Umwelt, darunter auch *Vibrio* spp., gefunden wurden, waren häufig auf übertragbaren genetischen Elementen wie Plasmiden und Integrons lokalisiert (Defoirdt *et al.* 2011). Da der Erwerb von Antibiotikaresistenzen in Bakterien zu einem überwiegenden Teil durch horizontalen Gentransfer erfolgt (Balcazar *et al.* 2015) ist anzunehmen, dass Spezies mit einer höheren Prävalenz häufiger am Austausch mobiler genetische Elemente, darunter auch Antibiotikaresistenzgene, beteiligt sind. Die deutlich höhere Prävalenz von *V. parahaemolyticus* (80,8 %) und *V. alginolyticus* (50,2 %) gegenüber *V. cholerae* (11,4 %) und *V. vulnificus* (3,5 %) in Shrimps könnte demnach für die höheren Anteile an resistenten und multiresistenten Isolaten verantwortlich sein. Ein höherer Anteil an Resistenzen für *V. parahaemolyticus* (n = 77) gegenüber *V. cholerae* non-O1/non-O139 (n = 307) und *V. vulnificus* (n = 120) wurde auch für Isolate aus der Chesapeake Bay in den USA ermittelt (Shaw *et al.* 2014; Ceccarelli *et al.* 2015).

Relevant für die Entstehung von Antibiotikaresistenzen in der aquatischen Umwelt sind das Vorkommen von Resistenzgenen in autochthonen Mikroorganismen, die Einleitung von Antibiotika, antibiotikaresistenter Bakterien nach Kontakt mit Materie menschlichen und tierischen Ursprungs oder deren Passagierung, sowie industrielle Verunreinigungen (Alonso *et al.* 2001; Baquero *et al.* 2008; Rodriguez-Mozaz und Weinberg 2010). Natürlich im aquatischen Milieu vorkommende Bakterien können als Reservoir für Resistenzgene fungieren (Baquero *et al.* 2008). In Zusammenhang mit diesen Genen fördert die Verbreitung von Antibiotika, Desinfektionsmitteln, Detergenzien und Rückständen industrieller Verschmutzung wie Schwermetalle in der Umwelt, die Entwicklung und Weitergabe von Antibiotikaresistenzen im aquatischen Milieu (Baquero *et al.* 2008). Insbesondere der Antibiotikaeinsatz in Aquakulturen (Baticados *et al.* 1990; Angulo 2000; Cabello 2006; Romero *et al.* 2012) kann für die Entstehung von Resistenzen relevant sein (Baquero *et al.* 2008) und könnte auch für die in der vorliegenden Arbeit nachgewiesenen Antibiotikaresistenzen verantwortlich gewesen sein. Der generelle Einsatz von Antibiotika wurde von sechs der 18 befragten Aquakulturbetreiber angegeben.

Die Stoffgruppen, für die insgesamt die meisten Resistenzen festgestellt wurden, waren Beta-Lactame, Aminoglykoside und Tetracycline. Innerhalb der Gruppe der Beta-Lactame wurden am häufigsten Resistenzen gegenüber Penicillinen und Cephalosporinen der ersten und zweiten Generation detektiert. Gegenüber Carbapenemen, Cephalosporinen der dritten und vierten Generation sowie Kombinationen von Penicillinen mit Beta-Lactamase-Inhibitoren waren 84-99 % der Isolate sensibel. Der von uns detektierte hohe Anteil an Resistenzen gegenüber Ampicillin (87,3 %) korreliert mit den Ergebnissen vieler Studien (French *et al.* 1989; Okoh und Igbiosa 2010; Reboucas *et al.* 2011; Chikwendu *et al.* 2014). Für verschiedene *Vibrio* spp. wurden Ampicillin-Resistenzen von 45 % bis 100 % ermittelt. Die isolierten *Vibrio* spp. stammten aus Shrimps und anderen Meeresfrüchten, klinischen Proben, Meerwasserproben sowie aus Wasser von Flüssen, Aquakulturanlagen oder einer Kläranlage. Der in der vorliegenden Arbeit detektierte hohe Anteil an Resistenzen gegenüber Ampicillin und ein überwiegender Anteil an Sensibilität gegenüber Penicillinen, die mit einem Beta-Lactamase-Inhibitor kombiniert waren, korrelierte mit den Daten von Zanetti *et al.* (2001). *V. alginolyticus*-, *V. parahaemolyticus*- und *V. vulnificus*-Isolate, die aus Küstengewässern Nordsardiniens isoliert wurden, zeigten zu 88,9 % Resistenzen gegenüber Ampicillin. Gegenüber Amoxicillin-Clavulansäure detektierten Zanetti *et al.* (2001) eine geringe Resistenz

(1,9 %) (Zanetti *et al.* 2001). In der vorliegenden Arbeit betrug dieser Anteil 2,4 %. Aus der Stoffgruppe der Beta-Lactame zeigte sich für die Carbapeneme bei Zanetti *et al.* (2001), wie auch in der vorliegenden Studie, die niedrigste Resistenzrate für alle untersuchten *Vibrio* spp.

Aus der Stoffgruppe der Beta-Lactame ist der Einsatz semi-synthetischer Penicilline wie Ampicillin und Amoxicillin in Aquakulturen weitverbreitet, insbesondere in Fisch-Aquakulturen (Park *et al.* 2012). Der Einsatz von Amoxicillin in Shrimps-Aquakulturen wurde für Thailand beschrieben (Rico *et al.* 2013). Die in der vorliegenden Arbeit detektierte Resistenz gegenüber Ampicillin könnte demzufolge auf den Einsatz semi-synthetischer Penicilline wie Ampicillin und Amoxycillin hinweisen, was auf ihr hohes Kosten-Nutzen-Verhältnis zurückzuführen sein könnte (Park *et al.* 2012). Der Einsatz von Cephalosporinen ist in Aquakulturen hingegen nicht üblich (Park *et al.* 2012). Die von uns detektierten hohen Anteile an resistenten und intermediären Isolaten gegenüber einigen Cephalosporinen könnten daher auf Kreuzresistenzen mit Penicillinen zurückzuführen sein, die häufig auf einer enzymatischen Inaktivierung der Wirkstoffe durch Beta-Lactamasen beruhen (Schassan 1978; Werckenthin und Schwarz 2003).

Die überwiegende Sensibilität gegenüber Carbapenemen, Cephalosporinen der dritten und vierten Generation sowie Kombinationen von Penicillinen mit Beta-Lactamase-Inhibitoren sprechen dafür, dass diese Substanzen in den von uns untersuchten Shrimps-Aquakulturen nicht eingesetzt wurden. Begründet ist dies vermutlich darin, dass die genannten Substanzen im Vergleich zu häufig eingesetzten Antibiotika wie Aminopenicillinen oder Tetracyclin, deutlich teurer sind (Vandijck *et al.* 2008; Statista 2015). Die Kosten sind bei der Wahl der Therapie in Aquakulturen ein sehr bedeutender Faktor (Poupard 1978).

Aminoglykoside, für die wir ebenfalls resistente und vor allem intermediäre Isolate feststellten, zählen zu den meist verwendeten Antibiotika in der Veterinärmedizin (Berrada *et al.* 2010). Verantwortlich für den häufigen Einsatz ist das weite Wirkspektrum, die Verfügbarkeit in verschiedenen Formulierungen und der niedrige Preis (Berrada *et al.* 2010). Für Shrimps-Aquakulturen wurde die Verwendung von Gentamicin beschrieben (Holmstrom *et al.* 2003; Banerjee *et al.* 2007). Resistenzen in *Vibrio* spp., die aus Meeresfrüchten oder Aquakulturen stammten, gegenüber verschiedenen Aminoglykosiden (Amikacin, Gentamicin, Streptomycin) wurden beschrieben (Manjusha *et al.* 2005; Jun *et al.* 2012). Der wichtigste Resistenzmechanismus bei Aminoglykosiden ist, Werckenthin und Schwarz (2003) zufolge, die enzymatische Inaktivierung, die durch verschiedene Enzyme (N-Acetyl-, O-Adenyl- oder O-Phosphotransferasen) mit einem jeweils spezifischen Substratspektrum vermittelt wird. Kreuzresistenzen innerhalb der Aminoglykoside sind möglich, jedoch ist es aufgrund der Vielzahl an Enzymen und dem sehr spezifischen Substratspektrum nicht möglich, durch Resistenzen gegenüber einer Substanz Rückschlüsse auf weitere Resistenzen zu ziehen (Werckenthin und Schwarz 2003). Die von uns detektierten Resistenzen könnten daher durch den Einsatz eines oder mehrerer Aminoglykosid-Antibiotika verursacht worden sein.

Aus der Stoffgruppe der Tetracycline ist Oxytetracyclin das am häufigsten in Aquakulturen eingesetzte Antibiotikum (Romero *et al.* 2012). Resistenzen in Aquakulturen wurden vielfach beschrieben (Rhodes *et al.* 2000; Miranda und Zemelman 2002; Kim *et al.* 2004). Der weitverbreitete Einsatz ist auf die leichte Verfügbarkeit und die geringen Kosten, im Vergleich zu anderen Breitspektrumantibiotika, zurückzuführen (Park *et al.* 2012). Die von uns detektierte Resistenz gegenüber Tetracyclin (42,4 %) könnte demnach mit dem Einsatz von Oxytetracyclin in Zusammenhang stehen, da für

Tetracycline und Tetracyclinderivate, wie Oxytetracyclin, Kreuzresistenzen beschrieben wurden (Werckenthin und Schwarz 2003). Neben Oxytetracyclin waren für Aquakulturen in Ecuador zur Zeit der Probennahme noch Florfenicol und Enrofloxacin zugelassen (INP 2013). Eine hohe Resistenzbildung gegenüber Enrofloxacin würde sich in den Resistenzprofilen der von uns getesteten Chinolone widerspiegeln (Werckenthin und Schwarz 2003). Die ermittelten Resistenzen gegenüber Ciprofloxacin (11 %), Levofloxacin (3,7 %) und Ofloxacin (3,7 %) befanden sich jedoch in einem niedrigen Bereich. Gegenüber Ciprofloxacin zeigte sich allerdings ein großer Anteil (48,2 %) an intermediären Isolaten, was ein Hinweis auf den Einsatz von Enrofloxacin sein könnte. Durch die Untersuchung von Chloramphenicol können nur eingeschränkt Rückschlüsse auf die Resistenz gegenüber Florfenicol gezogen werden (Werckenthin und Schwarz 2003). Die untersuchten Isolate zeigten sich jedoch zu 97,6 % sensibel gegenüber Chloramphenicol, was auch ein Hinweis auf eine hohe Sensibilität gegenüber Florfenicol ist (Werckenthin und Schwarz 2003; Schwarz *et al.* 2004).

Ob in den von uns beprobten Aquakulturen Antibiotika häufiger zum Einsatz kamen als angegeben wurde (36,8 %) und ob der Einsatz anderer als der zugelassenen Antibiotika (Oxytetracyclin, Florfenicol, Enrofloxacin) erfolgte, kann nicht abschließend geklärt werden. Die Nutzung weiterer Antibiotika kann jedoch vermutet werden, da entsprechende Resistenzen detektiert wurden. Der Zusammenhang des Antibiotikaeinsatzes in Aquakulturen und der Häufigkeit von Antibiotikaresistenzen in Mikroorganismen wurde vielfach beschrieben (Cabello 2006). Das Vorkommen von Resistenzen ist laut FAO *et al.* (2006) jedoch trotz einer weiten Verbreitung von Resistenzen in fischpathogenen Bakterien häufiger, wenn der Antibiotikaeinsatz hoch ist (FAO *et al.* 2006). Für den Einsatz von Antibiotika, in den von uns untersuchten Aquakulturen, sprechen auch die Ergebnisse einer in Ecuador durchgeführten Studie von Mohny *et al.* (1994). Während des Studienzeitraumes (1987-1990) war in Ecuador die Verwendung von Oxytetracyclin, Oxolinsäure, Ormetoprim-Sulfadimethoxin, Chloramphenicol und Nitrofurantoin üblich (Mohny *et al.* 1994). *Vibrio*-Isolate, die zwischen 1987 und 1989 (n = 17) sowie 1990 (n = 9) aus ecuadorianischen Larvenzuchten isoliert wurden, zeigten entsprechend zu 29 % und 22 % Resistenzen gegenüber Oxytetracyclin. In der vorliegenden Arbeit betrug der Anteil Tetracyclin resistenter *Vibrio*-Isolate 42,4 %. In beiden Fällen könnten die detektierten Resistenzen auf den Einsatz von Oxytetracyclin zurückzuführen sein (Werckenthin und Schwarz 2003). Weiterhin zeigten die zwischen 1987 und 1989 sowie 1990 aus Larvenzuchten isolierten *Vibrio*-Isolate, entsprechend zu 76 % und 33 %, Resistenzen gegenüber Chloramphenicol (Mohny *et al.* 1994). In der vorliegenden Arbeit war der überwiegende Teil der untersuchten *Vibrio* spp. Chloramphenicol gegenüber sensibel (97,6 %) und spiegelte vermutlich das heutige Verbot des Einsatzes von Chloramphenicol in Ecuador (Resolución 034 Registro Oficial N°420, 19. Dezember 2006) wider. Weiterhin zeigten die zwischen 1987 und 1989 von Mohny *et al.* (1994) aus ecuadorianischen Larvenzuchten isolierten *Vibrio*-Isolate Resistenzen gegenüber Ormetoprim-Sulfadimethoxin (12 %) und Nitrofurantoin (6 %). Aus dem gleichen Zeitraum (1990) stammende *Vibrio*-Isolate (n = 19) von Aquakulturen zeigten keine Resistenzen, was darauf zurückzuführen war, dass der Antibiotikaeinsatz bis 1990 auf Larvenzuchten beschränkt war und nicht in Shrimps-Aquakulturen erfolgte (Mohny *et al.* 1994). Das Fehlen von Resistenzen in *Vibrio* spp. aus Shrimps-Aquakulturen in Ecuador zu einem Zeitpunkt, als noch keine Antibiotika eingesetzt wurden, erhärtet unsere Vermutung, dass die von uns detektierten Resistenzen mit dem Einsatz von Antibiotika assoziiert waren.

Der insgesamt hohe Grad an Resistenzen (95,9 %) und Multiresistenzen (75,9 %), die sich auf alle getesteten Antibiotika verteilten sowie eine besondere Häufung an Resistenzen bei vier der getesteten Substanzen (Ampicillin, Piperacillin, Amikacin, Tetracyclin) (Abb. 9, Abb. 10) könnte darauf hinweisen, dass neben Tetracyclinen auch Beta-Lactam Antibiotika und Aminoglykoside eingesetzt wurden. Die 49 Isolate mit einfacher Resistenz verteilten sich ausschließlich auf Ampicillin, Piperacillin, Amikacin und Tetracyclin (APAT). Resistenzen gegenüber diesen vier Antibiotika zeigten sich in allen Bezirken der Probennahme und in mindestens 17 der untersuchten Aquakulturen (Tab. 50, Tab. 51). Darüber hinaus zeigten auch alle multiresistenten Isolate, die zwischen zehn und 18 Resistenzen aufwiesen, Resistenzen gegenüber APAT. Die Tatsache, dass insgesamt für alle getesteten Substanzen mindestens ein resistentes Isolat detektiert wurde, könnte dadurch bedingt sein, dass ein einzelnes Antibiotikum das Potential zur Co-Selektion für eine Vielzahl an Resistenzgenen bewirkte (Gullberg *et al.* 2014).

Für die Entstehung von Resistenzen, insbesondere gegenüber Ampicillin, werden in der Literatur neben dem Antibiotikaeinsatz in Aquakulturen aber noch andere Ursachen diskutiert. Roque *et al.* (2001) stellten bei allen *Vibrio*-Isolaten (n=11), die aus Meerwasser isoliert wurden, eine Resistenz gegenüber Ampicillin fest (Roque *et al.* 2001). Als Ursache wurde die Selektion von Beta-Lactamase-codierenden Resistenzgenen diskutiert, die als Konsequenz von Antibiotika produzierenden Mikroorganismen in der marinen Umwelt entstanden sein könnten (Teo *et al.* 2000). Banerjee *et al.* (2012) vermuteten, dass die von ihnen für verschiedene *Vibrio* spp. beobachteten Resistenzen gegenüber Ampicillin außerhalb der Shrimps-Aquakulturen erworben wurden. Die Resistenzen könnten durch den Einsatz von Antibiotika in den Zuchtanlagen der Larven entstanden sein (Banerjee *et al.* 2012). Die Darmflora könnte so erworbene Resistenzen in die Shrimps-Aquakulturen überführt haben (Tendencia und de la Pena 2001). Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen von Srinivasan und Ramasamy (2009). Sie fanden in den *Vibrio*-Isolaten aus Larvenzuchtanlagen höhere Raten an Antibiotikaresistenz als in den aus Shrimps-Aquakulturen stammenden Isolaten. Begründet wurde dies durch den höheren Einsatz und der Verwendung neuerer Antibiotika in Larvenzuchten, verglichen mit der Situation in Shrimps-Aquakulturen (Srinivasan und Ramasamy 2009).

Weiterhin erwähnten Banerjee *et al.* (2012) die Möglichkeit, dass das Vorkommen von antibiotikaresistenten Bakterien durch den Einsatz von Probiotika verursacht werden könnte. Mathur und Singh (2005) zufolge wird vermutet, dass Kommensale, Milchsäurebakterien eingeschlossen, möglicherweise als Reservoir für Resistenzgene fungieren. Eine Übertragung dieser Resistenzgene auf pathogene Erreger stellt eine große Gefahr dar (Mathur und Singh 2005). Munoz-Atienza *et al.* (2013) detektierten in Milchsäurebakterien, die sie als potentielle Probiotika identifizierten, einen hohen Grad an Antibiotikaresistenzen. Der Anteil an Resistenzen lag bei den Genera *Weissella*, *Pediococcus*, *Lactobacillus* und *Enterococcus* entsprechend bei 60 %, 44 %, 33 % und 11 % (Munoz-Atienza *et al.* 2013). Der Einsatz von Probiotika in den von uns untersuchten Aquakulturen könnte so möglicherweise für die Selektion multiresistenter Bakterien verantwortlich gewesen sein. Es gaben 17 der 18 befragten Aquakulturbetreiber (94,4 %) an, Probiotika einzusetzen. Die Verwendung von Antibiotika wurde nur für sechs Aquakulturen (33,3 %) angegeben. Der Anteil an resistenten Isolaten von Aquakulturen mit Antibiotikaeinsatz (91,1 %) war im Verhältnis zu Isolaten von Aquakulturen, die der Datenerhebung entsprechend keine Antibiotika einsetzten (97,3 %), sogar niedriger. Um Probiotika als mögliche Ursache zu

bestätigen oder auszuschließen wäre eine Untersuchung der in Ecuador verwendeten Produkte notwendig.

Weiterhin wurden in der Literatur Futtermittel, die multiresistente bakterielle Stämme enthielten (Miranda und Zemelman 2002) oder möglicherweise mit Antibiotika kontaminiert waren (Hassan *et al.* 2013), als Quelle von Multiresistenzdeterminanten bzw. als Ursache von Antibiotikarückständen in Shrimps diskutiert. Miranda und Zemelman (2002) wiesen in pelletiertem Futtermittel aus chilenischen Lachs-Aquakulturen *Acinetobacter*-Isolate mit Resistenzen gegenüber vier bis sechs Antibiotika nach. Hassan *et al.* (2013) detektierten in *Macrobrachium (M.) rosenbergii* aus Bangladesch, die aus Aquakulturen mit der Verwendung eines kommerziellen Futtermittels stammten, eine höhere Kontamination mit Nitrofurantoin und Chloramphenicol als in *M. rosenbergii* aus Aquakulturen, die ein selbst hergestelltes Futtermittel mit organischem und anorganischem Dünger verwendeten (Hassan *et al.* 2013). Alle Shrimps-Aquakulturen, die in unsere Studie einbezogen waren, gaben an, kommerzielle Futtermittel zu verwenden. Dies könnte als Hinweis auf einen möglichen Zusammenhang mit der Entstehung von Resistenzen gegenüber Ampicillin, Piperacillin, Tetracyclin, Amikacin und Gentamicin gewertet werden, die wir in mindestens 17 Aquakulturen detektierten (Tab. 50).

Einen weiteren wichtigen Faktor bei der Entstehung von Antibiotikaresistenzen stellt die Co-Induktion durch Desinfektionsmittel dar (Sidhu *et al.* 2001; Capita *et al.* 2014). Desinfektionsmittelresistenzen werden ebenso wie Antibiotikaresistenzen häufig auf mobilen genetischen Elementen wie Plasmiden oder Transposons codiert und eine genetische Verbindung und gemeinsame Weitergabe wurde beschrieben (Sidhu *et al.* 2002). Der Einsatz von Desinfektionsmitteln könnte somit auch zur Selektion antibiotikaresistenter Mikroorganismen führen (Alonso *et al.* 2001). Da der Einsatz von Desinfektionsmitteln in Aquakulturen ein wesentlicher Bestandteil der Infektionskontrolle ist (Torgersen und Hastein 1995; OIE 2009), könnte man einen Zusammenhang mit der Entstehung der von uns detektierten Antibiotikaresistenzen vermuten. Unter den verwendeten Desinfektionsmitteln in Aquakulturen sind auch quartäre Ammoniumverbindungen wie Benzalkoniumchlorid (Torgersen und Hastein 1995; Shamsuzzaman und Biswas 2012; Rico *et al.* 2013), die im Besonderen für die Entstehung von Antibiotikaresistenzen verantwortlich gemacht werden (Buffet-Bataillon *et al.* 2012; Jennings *et al.* 2015). Unsere Datenerhebung zu Produktions- und Managementfaktoren erfasste keine Informationen zum Desinfektionsmitteleinsatz. Aus anderen Publikationen ist jedoch bekannt, dass Desinfektionsmittel in Aquakulturen, insbesondere in Shrimps-Aquakulturen, in großen Mengen eingesetzt wurden und dieser Anteil den von Antibiotika deutlich überstieg (Rico *et al.* 2013).

Dass das Auftreten von antibiotikaresistenten Bakterien im marinen Milieu auch Ursachen außerhalb von Aquakulturanlagen haben könnte, zeigten Beobachtungen von Manjusha *et al.* (2005). Sie detektierten, dass das Niveau von Antibiotikaresistenzen in Wasserproben aus Aquakulturen verhältnismäßig niedriger war verglichen mit dem in Meerwasserproben. Der hohe Grad an Resistenzen und Multiresistenzen der *Vibrio*-Isolate, die aus Küstengewässern stammten, ließen die Vermutung zu, dass die Mehrheit der *Vibrio* spp. in küstennahen Gewässern Resistenzen gegen Antibiotika entwickeln (Manjusha *et al.* 2005). Als Ursache diskutierten Manjusha *et al.* (2005) die Einleitung antibiotikaresistenter Bakterien durch Abwässer, unter anderem aus Krankenhäusern, oder den Eintrag von terrestrischen Bakterien mit Resistenz-codierenden Plasmiden, die durch Regenwasser und Gezeiten vom Land ins Meer gelangten (Chandrasekaran *et al.* 1998). Ob die Weitergabe von Resistenz-codierenden Plasmiden, mittels horizontalem Gentransfer, zwischen terrestrischen und marinen Mikroorganismen möglich ist, wird

kontrovers diskutiert (Orruño *et al.* 2013). Chandrasekaran *et al.* (1998) demonstrierten jedoch für *Pseudomonas fluorescens*, dass auch nach Eintritt in den VBNC-Zustand und unter Nährstoffentzug, ein konjugativer Plasmidtransfer möglich war. Sie folgerten daraus, dass terrestrische, antibiotikaresistente Bakterien für die Prävalenz von Resistenzgenen in der marinen Umwelt verantwortlich sein könnten (Chandrasekaran *et al.* 1998). Durch die Verwendung von Brackwasser in Aquakulturanlagen könnte eine weitere Übertragung der Resistenz-codierenden Plasmide auch innerhalb mariner Bakterienspezies erfolgen (Defoirdt *et al.* 2011) und so für die von uns detektierten Resistenzen in *Vibrio* spp. verantwortlich sein.

Weiterhin vermuteten Srinivasan und Ramasamy (2009), dass der antimikrobielle Selektionsdruck, der zu Resistenzen in *Vibrio* spp. führte, zusätzlich zum Einsatz von Antibiotika in Aquakulturen auch durch die Verunreinigung mit Antibiotika zusammenhing, die zur Behandlung von Menschen und Tieren eingesetzt wurden (Srinivasan und Ramasamy 2009). Die Tatsache, dass es keine Antibiotika gibt, die speziell für den Einsatz in Aquakulturen entwickelt wurden, und auch offiziell zugelassene Substanzen immer ursprünglich für andere veterinärmedizinische Bereiche entworfen wurden (FAO 2005b), macht eine Abgrenzung schwierig. Ebenso werden für Lebensmittel-liefernde Tiere und Menschen größtenteils die gleichen Klassen an Antibiotika eingesetzt (WHO 2014).

Unabhängig von der Ursache stellt die Präsenz von antibiotikaresistenten Bakterien in Lebensmitteln tierischen Ursprungs ein Risiko für die öffentliche Gesundheit dar (FAO *et al.* 2003). Der Antibiotikaeinsatz in Aquakulturen in Ecuador sollte weiterhin streng limitiert werden, um die bestehende Resistenzlage von Vibrionen und möglicherweise auch anderer Bakterienspezies nicht weiter auszuweiten. Desinfektionsmittel, wie quartäre Ammoniumverbindungen, die mit einer starken Resistenzentwicklung und Co-Selektion von Antibiotikaresistenzen verbunden sind (Jennings *et al.* 2015), könnten durch Desinfektionsmaßnahmen mithilfe von Ozon, Ultraviolettstrahlung (Summerfelt 2003), Wasserstoffperoxid (Schmidt *et al.* 2006; Pedersen und Pedersen 2012) oder elektrolytischer Desinfektion (Jorquera *et al.* 2002; Rasco und Ovissipour 2015) ersetzt werden. Weiterhin befinden sich zahlreiche alternative Methoden zur Kontrolle bakterieller Erkrankungen in der Entwicklung (u. a. Phagentherapie, Unterbrechung des bakteriellen Quorum Sensing, Wachstumsinhibition mithilfe kurzkettiger Fettsäuren) (Defoirdt *et al.* 2007; Defoirdt *et al.* 2011). Der Einsatz von Bakteriophagen (Siphoviridae) zur Bekämpfung einer pathogenen *Vibrio* sp. (*V. harveyi*), wurde bereits erfolgreich in Larvenzuchten von *P. monodon* getestet (Vinod *et al.* 2006; Karunasagar *et al.* 2007).

Die von uns detektierten Antibiotikaresistenzen könnten aufgrund des zoonotischen Potentials einiger *Vibrio* spp. (Baker-Austin 2010) für die Behandlung von Infektionen des Menschen oder auch von Shrimps in Aquakulturen relevant sein. Einer Klassifizierung der WHO entsprechend wurden die Stoffgruppen aller getesteten Antibiotika für die Behandlung von Krankheiten des Menschen als kritisch wichtig oder sehr wichtig eingestuft (FAO *et al.* 2008). Für die Veterinärmedizin waren die getesteten Stoffgruppen, ausgenommen die der Carbapeneme und Cephamycine, als kritisch wichtig kategorisiert (FAO *et al.* 2008). Welche Rolle Antibiotika bei der Behandlung von *Vibrio*-Infektionen des Menschen spielen, ist noch nicht definiert (Zanetti *et al.* 2001). Das Vorkommen von Resistenzen könnte eine Therapie jedoch stark einschränken (Zanetti *et al.* 2001) und zu einer Gesundheitsgefährdung führen, da bei schweren *V. vulnificus*- (Chuang *et al.* 1992), *V. parahaemolyticus*- (Ahmad *et al.* 2013), *V. alginolyticus*- (Reilly *et al.* 2011) und *V. cholerae*-Infektionen (Khan *et al.* 2013) eine antimikrobielle Therapie indiziert sein kann. Dies gilt insbesondere bei Patienten mit

eingeschränkter Immunkompetenz oder Grunderkrankungen wie Diabetes mellitus oder Hepatopathien (Velazquez-Roman *et al.* 2013).

Die größte Gefahr besteht in einer Übertragung der Multiresistenzen auf pathogene *V. cholerae*- und *V. parahaemolyticus*-Stämme oder andere humanpathogene Erreger, wie dies vermutlich bei der Cholera-Epidemie, die 1991 in Lateinamerika begann, erfolgte (Weber *et al.* 1994). Weber *et al.* (1994) nahmen an, dass der epidemische *V. cholerae*-O1-Stamm, der zu Beginn der Epidemie antibiotikasensibel war, durch die Übertragung eines Plasmids Multiresistenz erlangte. Ein Zusammenhang mit dem Einsatz von Antibiotika in Shrimps-Larvenzuchten Ecuadors und der Entstehung des multiresistenten Cholera-Stammes wurde vermutet (Weber *et al.* 1994). Das Auftreten von multiresistenten Cholera-Erregern wurde auch aus verschiedenen Ländern in Afrika und Asien berichtet (Glass *et al.* 1983; Mwansa *et al.* 2007; Marin *et al.* 2013). Die in vielen Fällen beobachteten schnellen Veränderungen der Resistenzprofile von *V. cholerae*-Isolaten, lassen auf eine hohe Mobilität der für die Resistenzen verantwortlichen Gene schließen (Faruque *et al.* 1998). Um die Wahrscheinlichkeit einer Weitergabe der von uns detektierten Resistenzen einzuschätzen, sind weiterführende Untersuchungen notwendig.

7 Schlussfolgerung und Ausblick

Vibrio spp. konnten bei dem überwiegenden Teil der untersuchten Shrimps aus Ecuador nachgewiesen werden. Pandemische Serogruppen oder Virulenzgene isolierter *V. cholerae*- und *V. parahaemolyticus*-Stämme wurden nicht detektiert. Ein potentielles Infektionsrisiko durch die Handhabung oder den Verzehr roher oder unzureichend erhitzter Shrimps besteht dennoch. Die untersuchten *Vibrio* spp. wiesen Antibiotikaresistenzen gegenüber sechs Stoffgruppen mit einem hohen Anteil multiresistenter Isolate auf. Möglicherweise fungieren Shrimps-Aquakulturen in Ecuador als Reservoir für Multiresistenzdeterminanten von Antibiotika mit der Möglichkeit des horizontalen Transfers von Resistenzgenen auf humanpathogene oder fischpathogene Erreger. Zur Einschätzung dieses Risikos bedarf es weiterführender Untersuchungen. Diese müssen Aufschluss über die genetische Grundlage der Antibiotikaresistenzdeterminanten und über die Wahrscheinlichkeit ihrer Weitergabe mittels horizontalem Gentransfer geben. Die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Resultate dienen als Grundlagendaten für die Prävalenz und Antibiotikaresistenz von *Vibrio* spp. in Shrimps aus Ecuador. Sie können zukünftigen Studien als Vergleichswerte für die Evaluierung der Antibiotikasensibilität von *Vibrio* spp. aus Shrimps-Aquakulturen in Ecuador dienen.

8 Zusammenfassung

Prävalenz und Charakterisierung der Antibiotikaresistenz von *Vibrio* spp. in Shrimps aus dem Einzelhandel und Aquakulturen Ecuadors

Bakterien der Familie *Vibrionaceae* sind in aquatischen Habitaten ubiquitär verbreitet. Das Genus *Vibrio* beinhaltet Spezies mit humanpathogenem oder fischpathogenem Potential. Eine Zunahme von Infektionen, die zum Teil mit dem Auftreten neuer pandemischer Stämme assoziiert ist, kann bei humanpathogenen und fischpathogenen Erregern beobachtet werden. Infektionen durch humanpathogene Erreger stehen häufig mit dem Konsum von Meeresfrüchten in Zusammenhang. Aktuelle Untersuchungen zum Vorkommen verschiedener humanpathogener *Vibrio* spp. in Meeresfrüchten sowie zu Antibiotikaresistenzen von *Vibrio* spp. aus Ecuador fehlen. Ziel dieser Arbeit war es, über Probennahmen aus Aquakulturen und dem Einzelhandel in Ecuador die Verbreitung von fünf humanpathogenen *Vibrio* spp. (*V. alginolyticus*, *V. cholerae*, *V. mimicus*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*) in Shrimps (*Litopenaeus vannamei*) zu untersuchen. In 95,6 % der Proben konnte das Vorkommen mindestens einer *Vibrio* sp. nachgewiesen werden. Die am häufigsten nachgewiesene Spezies war *V. parahaemolyticus* mit einem Anteil von 80,8 %. *V. alginolyticus* (50,2 %) wurde ebenfalls in einem großen Teil der Proben detektiert. *V. cholerae* (11,4 %) und *V. vulnificus* (3,5 %) zeigten hingegen ein geringeres Vorkommen. Multiple *Vibrio* spp. fanden sich in 45,9 % der Proben. Für *V. cholerae* und *V. parahaemolyticus*, die beiden Spezies, für die pandemische Ausbrüche beschrieben wurden, konnten keine Serogruppen oder Virulenzfaktoren nachgewiesen werden, die mit pathogenen Stämmen assoziiert sind. Alle *V. cholerae*-Isolate wurden den Serogruppen non-O1/non-O139 zugeordnet. Wie für Umwelt-Isolate der Serogruppen non-O1/non-O139 typisch war keines der Isolate Träger von Cholera-toxin-codierenden Genen. Die untersuchten *V. parahaemolyticus*-Isolate wurden zu 39,9 % der Serogruppe O11 zugeordnet. Die übrigen Isolate gehörten den Serogruppen O1 bis O10 an. Die Hämolysin-Gene *tdh* und *trh* wurden in keinem der *V. parahaemolyticus*-Stämme detektiert. Des Weiteren wurden ausgewählte *V. parahaemolyticus*-Isolate auf das Vorkommen von Toxin-codierenden Genen hin untersucht, die für das Auslösen einer neuartigen Erkrankung von Shrimps verantwortlich gemacht werden. Diese als Akutes Hepatopankreatisches Nekrose-Syndrom (AHPNS) oder auch Early Mortality Syndrome (EMS) bekannte Erkrankung von *Litopenaeus vannamei* und *Penaeus monodon* hat zu massiven Verlusten in Shrimps-Aquakulturen in Mexiko und verschiedenen südostasiatischen Ländern geführt. Die Analyse der erhaltenen Isolate zeigte eine Abwesenheit des mit AHPNS assoziierten Plasmids. Die Untersuchungen zur Sensibilität gegenüber 22 Antibiotika aus sechs Stoffgruppen zeigten ein hohes Maß an resistenten Isolaten (95,9 %). Resistenzen gegenüber zwei oder mehr der untersuchten Antibiotika wurden bei 75,9 % der untersuchten Isolate detektiert, darunter fand sich ein Isolat, das Resistenzen gegenüber 18 der 22 getesteten Antibiotika aufwies. Für alle getesteten Substanzen wurde mindestens ein resistentes Isolat detektiert. Gegenüber Ampicillin (87,3 %) wurden die meisten Resistenzen detektiert, gefolgt von Tetracyclin (42,4 %), Piperacillin (33,1 %) und Amikacin (22,9 %). Unter den untersuchten *Vibrio* spp. zeigte *V. parahaemolyticus* (98,7 %) den größten Anteil resistenter Isolate. *V. alginolyticus* (83,6 %) wies einen hohen Anteil multiresistenter Isolate auf. *V. cholerae* (75 %) und *V. vulnificus* (87,5 %) zeigten ebenfalls zu einem großen Anteil Resistenzen, jedoch wies kein Isolat Resistenzen gegenüber mehr als drei der untersuchten Antibiotika auf.

9 Summary

Prevalence and characterization of antibiotic resistance of *Vibrio* spp. in retail and aquaculture Shrimps in Ecuador

Bacteria of the family *Vibrionaceae* are ubiquitous in aquatic habitats. The genus *Vibrio* includes species that are pathogenic for humans or fish. The incidence of human infections and in aquaculture has been increased and is, to some extent, associated with the emergence of new pandemic strains. Human infections are often associated with the consumption of seafood. Recent studies on the occurrence of human pathogenic *Vibrio* spp. in seafood from Ecuador and their antibiotic resistance patterns are missing. The primary objective of this study was to investigate the occurrence of five human pathogenic *Vibrio* spp. (*V. alginolyticus*, *V. cholerae*, *V. mimicus*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*) in shrimp (*Litopenaeus vannamei*) from Ecuadorian aquaculture and from retail. The presence of at least one *Vibrio* sp. was found in 95,6 % of the samples. *V. parahaemolyticus* (80,8 %) was the most frequently detected species, followed by *V. alginolyticus* (50,2 %), *V. cholerae* (11,4 %) and *V. vulnificus* (3,5 %). Of the samples investigated 45,9 % contained multiple *Vibrio* spp. Further analyses of *V. cholerae* and *V. parahaemolyticus* isolates, which both have been involved in pandemic outbreaks, did not detect pandemic serogroups or virulence factors. All isolates of *V. cholerae* belonged to non-O1/non-O139 serogroups and like most non-O1/non-O139 environmental strains, the isolates analyzed were negative for the cholera toxin gene. Approximately 40 % of the *V. parahaemolyticus* isolates analyzed belonged to serogroup O11. The remaining isolates belonged to the serogroups O1 to O10. None of the *V. parahaemolyticus* strains examined possessed the hemolysin genes *tdh* or *trh*. For selected *V. parahaemolyticus* isolates, further analysis were conducted to detect toxin-encoding genes, which seem to be responsible to cause a newly emergent penaeid shrimp disease, called acute hepatopancreatic necrosis syndrome (AHPNS) or early mortality syndrome (EMS). AHPNS has caused serious economic losses in shrimp farms in Mexico and several Southeast Asian countries. In the investigated strains, the absence of the plasmid associated with AHPNS was confirmed.

Antimicrobial susceptibility testing to twenty-two antibiotics of six different classes showed a high level of resistance (95,9 %). Multi-drug resistance was found in 75,9 % of the isolates tested, including one strain with resistances to 18 of the 22 antimicrobial agents tested. For all substances at least one resistant isolate was detected. Most isolates were resistant to Ampicillin (87,3 %), followed by Tetracycline (42,4 %), Piperacillin (33,1 %) and Amikacin (22,9 %). Of the *Vibrio* spp. studied, *V. parahaemolyticus* isolates showed the highest level of resistance (98,7 %). *V. alginolyticus* accounted for the highest number of multi-drug resistant isolates (83,6 %). For *V. cholerae* (75 %) and *V. vulnificus* (87,5 %) a significant fraction of isolates showed resistance but with a lower number of multi-drug resistances.

10 Literaturverzeichnis

- Abbott, S. L.; C. Powers; C. A. Kaysner; Y. Takeda; M. Ishibashi; S. W. Joseph und J. M. Janda (1989). Emergence of a restricted bioserovar of *Vibrio parahaemolyticus* as the predominant cause of *Vibrio*-associated gastroenteritis on the West Coast of the United States and Mexico. *J Clin Microbiol.* **27**(12): 2891-2893.
- Ackermann, H.; G. Becker; E. Herrmann; P. Hucklenbroich und E. Jacobi (2013). Epidemiologische Maßzahlen. In: Endspurt Klinik Skript 20: Querschnittsfächer. Georg Thieme Verlag KG.
- Agrocalidad (2012). Productos de uso veterinario registrados en Agrocalidad. http://www.agrocalidad.gob.ec/ProductosVeterinarios/regino_producto_veterinario.php?page=1 Abgerufen am: 20.01.2014
- Aguirre-Guzman, G.; H. M. Ruiz und F. Ascencio (2004). A review of extracellular virulence product of *Vibrio* species important in diseases of cultivated shrimp. *Aquac. Res.* **35**(15): 1395-1404.
- Aguirre-Guzman, G.; R. Vazquez-Juarez und F. Ascencio (2001). Differences in the susceptibility of American white shrimp larval substages (*Litopenaeus vannamei*) to four *Vibrio* species. *J Invertebr Pathol.* **78**(4): 215-219.
- Ahmad, A.; L. Brumble und M. Maniaci (2013). *Vibrio parahaemolyticus* induced necrotizing fasciitis: an atypical organism causing an unusual presentation. *Case Rep Infect Dis.* **2013**: 1-4.
- Alam, M.; W. B. Chowdhury; N. A. Bhuiyan; A. Islam; N. A. Hasan; G. B. Nair; H. Watanabe; A. K. Siddique; A. Huq; R. B. Sack; M. Z. Akhter; C. J. Grim; K. M. Kam; C. K. Luey; H. P. Endtz; A. Cravioto und R. R. Colwell (2009). Serogroup, virulence, and genetic traits of *Vibrio parahaemolyticus* in the estuarine ecosystem of Bangladesh. *Appl Environ Microbiol.* **75**(19): 6268-6274.
- Alam, M.; M. Sultana; G. B. Nair; R. B. Sack; D. A. Sack; A. K. Siddique; A. Ali; A. Huq und R. R. Colwell (2006). Toxigenic *Vibrio cholerae* in the aquatic environment of Mathbaria, Bangladesh. *Appl Environ Microbiol.* **72**(4): 2849-2855.
- Albert, M. J.; A. K. Siddique; M. S. Islam; A. S. Faruque; M. Ansaruzzaman; S. M. Faruque und R. B. Sack (1993). Large outbreak of clinical cholera due to *Vibrio cholerae* non-O1 in Bangladesh. *Lancet.* **341**(8846): 704.
- Alday de Graindorge, V. (2000). Disease management protocols and semi-intensive shrimp farming in Ecuador. *Global aquaculture advocate.* **3**(2): 17-19.
- Alday, V.; B. Guichard; P. Smith und C. Uhland (2006). Draft paper on animal health issues-Towards a risk analysis of antimicrobial use in aquaculture. Joint FAO/WHO/OIE expert consultation on antimicrobial use in aquaculture and antimicrobial resistance. Seoul, South Korea.
- Aldighieri, S.; E. Vela und C. Pesantes (1997). The status of antibiotic sensitivity of *Vibrio cholerae* O1 in Ecuador. *Med Trop (Mars).* **57**(1): 98.
- Ali, M.; A. R. Nelson; A. L. Lopez und D. A. Sack (2015). Updated global burden of cholera in endemic countries. *PLoS Negl Trop Dis.* **9**(6): e0003832.
- Alonso, A.; P. Sanchez und J. L. Martinez (2001). Environmental selection of antibiotic resistance genes. *Environ Microbiol.* **3**(1): 1-9.

- Alter, T. (2012). Taxonomie und allgemeine Charakteristika. In: Pathogene Mikroorganismen - *Vibrio*. Behr's Verlag.
- Amaro, C. und E. G. Biosca (1996). *Vibrio vulnificus* biotype 2, pathogenic for eels, is also an opportunistic pathogen for humans. *Appl Environ Microbiol.* **62**(4): 1454-1457.
- Anderson, J. L.; J. Martinez-Garmendia und J. R. King (2003). Trade by major seafood group. In: The international seafood trade. Woodhead Publishing Limited.
- Anderson, J. L. und D. Valderrama (2013). Shrimp production review. The World Bank, Washington, DC, USA.
- Anderson, J. L.; D. Valderrama und D. Jory (2014). Global shrimp production review. *Global aquaculture advocate.* **17**(6): 10-11.
- Andersson, Y. und K. Ekdahl (2006). Wound infections due to *Vibrio cholerae* in Sweden after swimming in the Baltic Sea, summer 2006. *Euro Surveill.* **11**(8): E060803 2.
- Angulo, F. J. (2000). Antimicrobial agents in aquaculture: potential impact on public health. *APUA Newsletter.* **18**(1): 1,4.
- Anonym (2014). La productividad del camarón avanza en corrientes distintas. <http://www.eluniverso.com/noticias/2014/07/12/nota/3219216/productividad-camaron-avanza-corrientes-distintas> Abgerufen am: 03.05.2016
- Anonym (2015a). List of prokaryotic names with standing in nomenclature (LPSN). <http://www.bacterio.net> Abgerufen am: 03.05.2015
- Anonym (2015b). Weißfuß-Garnele (*Litopenaeus vannamei*). <http://www.aquakulturinfo.de/index.php/garnele/articles/Garnele.html> Abgerufen am: 23.11.2015
- Aquacop (1984). Review of ten years of experimental penaeid shrimp culture in Tahiti and New Caledonia (South Pacific). *J. World Maricult. Soc.* **15**(1-4): 73-91.
- ASC (2014). ASC congratulates first ASC certified shrimp farm in the world. <http://www.asc-aqua.org/index.cfm?act=update.detail&uid=242&lng=1> Abgerufen am: 29.06.2016
- Asche, F. und T. Bjørndal (2011). Lessons of other farmed species. In: The economics of salmon aquaculture. John Wiley & Sons.
- Austin, B. und D. A. Austin (2012). Bacterial fish pathogens: disease of farmed and wild fish. 5. Springer Science & Business Media Dordrecht.
- Austin, B. und X. H. Zhang (2006). *Vibrio harveyi*: a significant pathogen of marine vertebrates and invertebrates. *Lett Appl Microbiol.* **43**(2): 119-124.
- Aznar, R.; W. Ludwig; R. I. Amann und K. H. Schleifer (1994). Sequence determination of rRNA genes of pathogenic *Vibrio* species and whole-cell identification of *Vibrio vulnificus* with rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Int J Syst Bacteriol.* **44**(2): 330-337.
- Baffone, W.; A. Pianetti; F. Bruscolini; E. Barbieri und B. Citterio (2000). Occurrence and expression of virulence-related properties of *Vibrio* species isolated from widely consumed seafood products. *Int J Food Microbiol.* **54**(1-2): 9-18.
- Baker-Austin, C. (2010). Vibrios as causal agents of zoonoses. *Vet Microbiol.* **140**: 310-317.
- Baker-Austin, C.; E. Lemm; R. Hartnell; J. Lowther; R. Onley; C. Amaro; J. D. Oliver und D. Lees (2012a). pilF polymorphism-based real-time PCR to distinguish *Vibrio vulnificus* strains of human health relevance. *Food Microbiol.* **30**(1): 17-23.

- Baker-Austin, C.; J. V. McArthur; R. C. Tuckfield; M. Najarro; A. H. Lindell; J. Gooch und R. Stepanauskas (2008). Antibiotic resistance in the shellfish pathogen *Vibrio parahaemolyticus* isolated from the coastal water and sediment of Georgia and South Carolina, USA. *J Food Prot.* **71**(12): 2552-2558.
- Baker-Austin, C.; L. Stockley; R. Rangdale und J. Martinez-Urtaza (2010). Environmental occurrence and clinical impact of *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus*: A European perspective. *Env Microbiol Rep.* **2**(1): 7-18.
- Baker-Austin, C.; J. Trinanes; N. G. H. Taylor; R. Hartnell; A. Siitonen und J. Martinez-Urtaza (2012b). Emerging *Vibrio* risk at high latitudes in response to ocean warming. *Nat Clim Chang.* **3**: 73-77.
- Balcazar, J. L. (2003). Evaluation of probiotic bacterial strains in *Litopenaeus vannamei*. National center for marine and aquaculture research, Guayaquil, Ecuador.
- Balcazar, J. L.; I. de Blas; I. Ruiz-Zarzuela; D. Cunningham; D. Vendrell und J. L. Muzquiz (2006). The role of probiotics in aquaculture. *Vet Microbiol.* **114**(3-4): 173-186.
- Balcazar, J. L.; J. Subirats und C. M. Borrego (2015). The role of biofilms as environmental reservoirs of antibiotic resistance. *Front Microbiol.* **6**: 1-9.
- Banerjee, S.; T. N. Devaraja; M. Shariff und F. M. Yusoff (2007). Comparison of four antibiotics with indigenous marine *Bacillus* spp. in controlling pathogenic bacteria from shrimp and Artemia. *J Fish Dis.* **30**(7): 383-389.
- Banerjee, S.; M. C. Ooi; M. Shariff und H. Khatoun (2012). Antibiotic resistant *Salmonella* and *Vibrio* associated with farmed *Litopenaeus vannamei*. *ScientificWorldJournal.* **2012**: 1-6.
- Baquero, F.; J. L. Martinez und R. Canton (2008). Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Curr Opin Biotechnol.* **19**(3): 260-265.
- Barker, W. H., Jr. (1974). *Vibrio parahaemolyticus* outbreaks in the United States. *Lancet.* **1**(7857): 551-554.
- Baticados, M. C. L.; C. R. Lavilla-Pitogo; E. R. Cruz-Lacierda; L. D. De La Peña und N. A. Sunaz (1990). Studies on the chemical control of luminous bacteria *Vibrio harveyi* and *V. splendidus* isolated from diseased *Penaeus monodon* larvae and rearing water. *Dis Aquat Organ.* **9**(2): 133-139.
- Bauer, A. und L. M. Rorvik (2007). A novel multiplex PCR for the identification of *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae* and *Vibrio vulnificus*. *Lett Appl Microbiol.* **45**(4): 371-375.
- Baumann, P.; A. L. Furniss und J. V. Lee (1984). Genus I *Vibrio*. In: *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Williams & Wilkins Co.
- Bell, T. A. und D. V. Lightner (1992). Chemotherapy in aquaculture today—current practices in shrimp culture: available treatments and their efficacy. *Chemotherapy In aquaculture: from theory to reality: proceedings of the symposium, march 1991*. Paris, France: OIE.
- Berche, P.; C. Poyart; E. Abachin; H. Lelievre; J. Vandepitte; A. Dodin und J. M. Fournier (1994). The novel epidemic strain O139 is closely related to the pandemic strain O1 of *Vibrio cholerae*. *J Infect Dis.* **170**(3): 701-704.
- Berrada, H.; J. C. Molto; J. Manes und G. Font (2010). Determination of aminoglycoside and macrolide antibiotics in meat by pressurized liquid extraction and LC-ESI-MS. *J Sep Sci.* **33**(4-5): 522-529.

- Berry, T. M.; D. L. Park und D. V. Lightner (1994). Comparison of the microbial quality of raw shrimp from China, Ecuador or Mexico at both wholesale and retail levels. *J Food Prot.* **57**(2): 150-153.
- Bhaskar, N.; T. M. R. Setty; S. Mondal; M. A. Joseph; C. V. Raju; B. S. Raghunath und C. S. Anantha (1998). Prevalence of bacteria of public health significance in the cultured shrimp (*Penaeus monodon*). *Food Microbiol.* **15**(5): 511-519.
- Bi, K.; S. I. Miyoshi; K. I. Tomochika und S. Shinoda (2001). Detection of virulence associated genes in clinical strains of *Vibrio mimicus*. *Microbiol Immunol.* **45**(8): 613-616.
- Bik, E. M.; A. E. Bunschoten; R. D. Gouw und F. R. Mooi (1995). Genesis of the novel epidemic *Vibrio cholerae* O139 strain: evidence for horizontal transfer of genes involved in polysaccharide synthesis. *EMBO J.* **14**(2): 209-216.
- Biosca, E. G.; C. Amaro; C. Esteve; E. Alcaide und E. Garay (1991). First record of *Vibrio vulnificus* biotype 2 from diseased European eel, *Anguilla anguilla* L. *J Fish Dis.* **14**(1): 103-109.
- Bisha, B.; J. Simonson; M. Janes; K. Bauman und L. D. Goodridge (2012). A review of the current status of cultural and rapid detection of *Vibrio parahaemolyticus*. *Int J Food Sci Technol.* **47**(5): 885-899.
- Bisharat, N.; V. Agmon; R. Finkelstein; R. Raz; G. Ben-Dror; L. Lerner; S. Soboh; R. Colodner; D. N. Cameron; D. L. Wykstra; D. L. Swerdlow und J. J. Farmer, 3rd (1999). Clinical, epidemiological, and microbiological features of *Vibrio vulnificus* biogroup 3 causing outbreaks of wound infection and bacteraemia in Israel. *Israel Vibrio Study Group. Lancet.* **354**(9188): 1421-1424.
- Bisharat, N.; C. Amaro; B. Fouz; A. Llorens und D. I. Cohen (2007). Serological and molecular characteristics of *Vibrio vulnificus* biotype 3: evidence for high clonality. *Microbiology.* **2007**(153): 847-856.
- Bisharat, N.; A. Bialik; E. Paz; C. Amaro und D. I. Cohen (2011). Serum antibodies to *Vibrio vulnificus* biotype 3 lipopolysaccharide and susceptibility to disease caused by the homologous *V. vulnificus* biotype. *Epidemiol Infect.* **139**(3): 472-481.
- Bisharat, N.; D. I. Cohen; R. M. Harding; D. Falush; D. W. Crook; T. Peto und M. C. Maiden (2005). Hybrid *Vibrio vulnificus*. *Emerg Infect Dis.* **11**(1): 30-35.
- Blake, P. A.; R. E. Weaver und D. G. Hollis (1980). Diseases of humans (other than cholera) caused by Vibrios. *Annu Rev Microbiol.* **1980**(34): 341-367.
- Bock, T.; N. Christensen; N. H. Eriksen; S. Winter; H. Rygaard und F. Jorgensen (1994). The first fatal case of *Vibrio vulnificus* infection in Denmark. *APMIS.* **102**(11): 874-876.
- Bockemuhl, J.; A. Amedome und A. Triemer (1975). *Vibrio parahaemolyticus* gastroenteritis during, the El Tor cholera epidemic in Togo (West Africa). *Am J Trop Med Hyg.* **24**(1): 101-104.
- Bondad-Reantaso, M. G.; R. P. Subasinghe; H. Josupeit; J. Cai und X. Zhou (2012). The role of crustacean fisheries and aquaculture in global food security: past, present and future. *J Invertebr Pathol.* **110**(2): 158-165.
- Boonyawantang, A.; W. Mahakarnchanakul; C. Rachtanapun und W. Boonsupthip (2012). Behavior of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in prawn in response to temperature in laboratory and factory. *Food Control.* **26**(2): 479-485.
- Brock, T. D. (1999). Robert Koch a life in medicine and bacteriology. American Society for Microbiology, Washington, D. C.

- Bross, M. H.; K. Soch; R. Morales und R. B. Mitchell (2007). *Vibrio vulnificus* infection: diagnosis and treatment. *Am Fam Physician*. **76**(4): 539-544.
- Buck, J. D. (1991). Recovery of *Vibrio metschnikovii* from market seafood. *J Food Saf*. **12**(1): 73-78.
- Buffet-Bataillon, S.; A. Le Jeune; S. Le Gall-David; M. Bonnaure-Mallet und A. Jolivet-Gougeon (2012). Molecular mechanisms of higher MICs of antibiotics and quaternary ammonium compounds for *Escherichia coli* isolated from bacteraemia. *J Antimicrob Chemother*. **67**(12): 2837-2842.
- Butt, A. A.; K. E. Aldridge und C. V. Sanders (2004). Infections related to the ingestion of seafood Part I: viral and bacterial infections. *Lancet Infect Dis*. **4**(4): 201-212.
- Cabanillas-Beltran, H.; L. L.-M. E.; R. Romero; A. Espinoza; A. Garcia-Gasca; M. Nishibuchi; M. Ishibashi und B. Gomez-Gil (2006). Outbreak of gastroenteritis caused by the pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 in Mexico. *FEMS Microbiol Lett*. **265**(1): 76-80.
- Cabello, F. C. (2006). Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. *Environ Microbiol*. **8**(7): 1137-1144.
- Cabrera-Garcia, M. E.; C. Vazquez-Salinas und E. I. Quinones-Ramirez (2004). Serologic and molecular characterization of *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated from seawater and fish products of the Gulf of Mexico. *Appl Environ Microbiol*. **70**(11): 6401-6406.
- Caburlotto, G.; F. Bianchi; M. Gennari; V. Ghidini; G. Socal; F. B. Aubry; M. Bastianini; M. Tafi und M. M. Lleo (2012). Integrated evaluation of environmental parameters influencing *Vibrio* occurrence in the coastal Northern Adriatic Sea (Italy) facing the venetian lagoon. *Microb Ecol*. **63**(1): 20-31.
- Calderón, J. (2002). Análisis de una traumática experiencia: el WSSV en Ecuador. *El Mundo Acuicola*. **8**(1): 20-24.
- Campos, E.; H. Bolanos; M. T. Acuna; G. Diaz; M. C. Matamoros; H. Raventos; L. M. Sanchez; O. Sanchez und C. Barquero (1996). *Vibrio mimicus* diarrhea following ingestion of raw turtle eggs. *Appl Environ Microbiol*. **62**(4): 1141-1144.
- Campos, L. C.; V. Zahner; K. E. Avelar; R. M. Alves; D. S. Pereira; B. J. Vital; F. S. Freitas; C. A. Salles und D. K. Karaolis (2004). Genetic diversity and antibiotic resistance of clinical and environmental *Vibrio cholerae* suggests that many serogroups are reservoirs of resistance. *Epidemiol Infect*. **132**(5): 985-992.
- Capita, R.; F. Riesco-Pelaez; A. Alonso-Hernando und C. Alonso-Calleja (2014). Exposure of *Escherichia coli* ATCC 12806 to sublethal concentrations of food-grade biocides influences its ability to form biofilm, resistance to antimicrobials, and ultrastructure. *Appl Environ Microbiol*. **80**(4): 1268-1280.
- Carattoli, A. (2013). Plasmids and the spread of resistance. *Int J Med Microbiol*. **303**(6-7): 298-304.
- Castañeda Chávez, M. R.; V. Pardo Seda; E. Orrantia Borunda und F. Lango Reynoso (2005). Influence of water temperature and salinity on seasonal occurrences of *Vibrio cholerae* and enteric bacteria in oyster-producing areas of Veracruz, Mexico. *Mar Pollut Bull*. **50**(12): 1641-1648.
- Castillo, D.; P. D'Alvise; P. G. Kalatzis; C. Kokkari; M. Middelboe; L. Gram; S. Liu und P. Katharios (2015). Draft genome sequences of *Vibrio alginolyticus* strains V1 and V2, opportunistic marine pathogens. *Genome Announc*. **3**(4): 1-2.

- CDC (1993). Imported cholera associated with a newly described toxigenic *Vibrio cholerae* O139 strain—California, 1993. *Morbidity and Mortality Weekly Report*. **42**: 501-503.
- CDC (2010). Preliminary FoodNet data on the incidence of infection with pathogens transmitted commonly through food - 10 states, 2009. *MMWR Morbidity and Mortality Weekly Report*. **59**(14): 418-422.
- CDC (2014). Incidence and trends of infection with pathogens transmitted commonly through food - foodborne diseases active surveillance network, 10 U.S. sites, 2006-2013. *MMWR Morbidity and Mortality Weekly Report*. **63**(15): 328-332.
- Ceccarelli, D.; A. Chen; N. A. Hasan; S. M. Rashed; A. Huq und R. R. Colwell (2015). Non-O1/non-O139 *Vibrio cholerae* carrying multiple virulence factors and *V. cholerae* O1 in the Chesapeake Bay, Maryland. *Applied and Environmental Microbiology*. **81**(6): 1909-1918.
- Ceccarelli, D.; N. A. Hasan; A. Huq und R. R. Colwell (2013). Distribution and dynamics of epidemic and pandemic *Vibrio parahaemolyticus* virulence factors. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. **3**(97): 1-9.
- Chakraborty, S.; G. B. Nair und S. Shinoda (1997). Pathogenic Vibrios in the natural aquatic environment. *Review of Environmental Health*. **12**(2): 63-80.
- Chandrasekaran, S.; B. Venkatesh und D. Lalithakumari (1998). Transfer and expression of a multiple antibiotic resistance plasmid in marine bacteria. *Current Microbiology*. **37**(5): 347-351.
- Chatterjee, B. D.; K. N. Neogy und S. L. Gorbach (1970). Study of *Vibrio parahaemolyticus* from cases of diarrhoea in Calcutta. *Indian Journal of Medical Research*. **58**(2): 234-238.
- Chatterjee, S.; K. Ghosh; A. Raychoudhuri; G. Chowdhury; M. K. Bhattacharya; A. K. Mukhopadhyay; T. Ramamurthy; S. K. Bhattacharya; K. E. Klose und R. K. Nandy (2009). Incidence, virulence factors, and clonality among clinical strains of non-O1, non-O139 *Vibrio cholerae* isolates from hospitalized diarrheal patients in Kolkata, India. *Journal of Clinical Microbiology*. **47**(4): 1087-1095.
- Chatterjee, S. und S. Haldar (2012). *Vibrio* related diseases in aquaculture and development of rapid and accurate identification methods. *Journal of Marine Science Research Development*. **51**(2): 1-7.
- Cheasty, T.; B. Rowe; B. Said und J. Frost (1993). *Vibrio cholerae* serogroup O139 in England and Wales. *British Medical Journal*. **307**(6910): 1007.
- Chen, M.; D. Guo; H. C. Wong; X. Zhang; F. Liu; H. Chen; B. Liu; L. Wang; F. Wu und L. Feng (2012). Development of O-serogroup specific PCR assay for detection and identification of *Vibrio parahaemolyticus*. *International Journal of Food Microbiology*. **159**(2): 122-129.
- Cheng, S. H.; D. P. Rich; J. Marshall; R. J. Gregory; M. J. Welsh und A. E. Smith (1991). Phosphorylation of the R domain by cAMP-dependent protein kinase regulates the CFTR chloride channel. *Cell*. **66**(5): 1027-1036.
- Chicheff Pérez, C. A.; J. C. Bagattini Mari; R. J. Gnazzo Marengo; M. Piñeyrúa; E. Amigo Barcos und G. Vanerio Balbela (2001). *Vibrio vulnificus*: un veraneante letal en las aguas oceánicas de Uruguay. Comunicación del primer caso nacional. *Paciente crítico (Uruguay)*. **14**(3): 168-174.
- Chikwendu, C. I.; S. N. Ibe und G. C. Okpokwasili (2014). Multiple antimicrobial resistance in *Vibrio* spp. isolated from river and aquaculture water sources in Imo State, Nigeria. *Brazilian Journal of Microbiology*. **4**(5): 560-569.
- Chin, C. S.; J. Sorenson; J. B. Harris; W. P. Robins; R. C. Charles; R. R. Jean-Charles; J. Bullard; D. R. Webster; A. Kasarskis; P. Peluso; E. E. Paxinos; Y. Yamaichi; S. B.

- Calderwood; J. J. Mekalanos; E. E. Schadt und M. K. Waldor (2011). The origin of the Haitian cholera outbreak strain. *N Engl J Med.* **364**(1): 33-42.
- Chiou, C. S.; S. Y. Hsu; S. I. Chiu; T. K. Wang und C. S. Chao (2000). *Vibrio parahaemolyticus* serovar O3:K6 as cause of unusually high incidence of food-borne disease outbreaks in Taiwan from 1996 to 1999. *J Clin Microbiol.* **38**(12): 4621-4625.
- Chitov, T.; P. Kirikaew; P. Yungyune; N. Ruengprapan und K. Sontikun (2009a). An incidence of large foodborne outbreak associated with *Vibrio mimicus*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* **28**(4): 421-424.
- Chitov, T.; S. Wongdao; W. Thatum; T. Puprae und P. Sisuwan (2009b). Occurrence of potentially pathogenic *Vibrio* species in raw, processed, and ready-to-eat seafood and seafood products. *Maejo Int J Sci Tech.* **3**(1): 88-98.
- Cho, Y. J.; H. Yi; J. H. Lee; D. W. Kim und J. Chun (2010). Genomic evolution of *Vibrio cholerae*. *Curr Opin Microbiol.* **13**(5): 646-651.
- Chuang, Y. C.; C. Y. Yuan; C. Y. Liu; C. K. Lan und A. H. M. Huang (1992). *Vibrio vulnificus* infection in Taiwan - report of 28 cases and review of clinical manifestations and treatment. *Clin. Infect. Dis.* **15**(2): 271-276.
- Citil, B. E.; S. Derin; F. Sankur; M. Sahan und M. U. Citil (2015). *Vibrio alginolyticus* associated chronic myringitis acquired in Mediterranean waters of Turkey. *Case Rep Infect Dis.* **2015**: 1-3.
- CLSI 2005. Methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria; proposed guideline. M45-P.
- CLSI 2006. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; approved standard-ninth edition. M2-A9
- CLSI 2007. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; seventeenth informational supplement. M100-S17.
- CNA (2015). Tres camaroneras de Centroamérica dan positivo al EMS. <http://www.cna-ecuador.com/prensa/1661-28-05-2015-tres-camaroneras-de-centroamerica-dan-positivo-al-ems> Abgerufen am: 03.06.2015
- Constantin de Magny, G. und R. R. Colwell (2009). Cholera and climate: a demonstrated relationship. *Trans Am Clin Climatol Assoc.* **120**: 119-128.
- Cornelis, G. R. (2006). The type III secretion injectisome. *Nat Rev Microbiol.* **4**(11): 811-825.
- Costa, R. A.; R. L. Araujo; O. V. Souza und R. Vieira (2015). Antibiotic-resistant Vibrios in farmed shrimp. *Biomed Res Int.* **2015**: 1-5.
- Cvjetanovic, B. und D. Barua (1972). The seventh pandemic of cholera. *Nature.* **239**(5368): 137-138.
- Dadisman, T. A., Jr.; R. Nelson; J. R. Molenda und H. J. Garber (1972). *Vibrio parahaemolyticus* gastroenteritis in Maryland. I. clinical and epidemiologic aspects. *Am J Epidemiol.* **96**(6): 414-426.
- Dalsgaard, A.; M. J. Albert; D. N. Taylor; T. Shimada; R. Meza; O. Serichantalergs und P. Echeverria (1995a). Characterization of *Vibrio cholerae* non-O1 serogroups obtained from an outbreak of diarrhea in Lima, Peru. *J Clin Microbiol.* **33**(10): 2715-2722.
- Dalsgaard, A.; A. Forslund; L. Bodhidatta; O. Serichantalergs; C. Pitarangsi; L. Pang; T. Shimada und P. Echeverria (1999). A high proportion of *Vibrio cholerae* strains isolated from children with diarrhoea in Bangkok, Thailand are multiple antibiotic resistant and

- belong to heterogenous non-O1, non-O139 O-serotypes. *Epidemiol Infect.* **122**(2): 217-226.
- Dalsgaard, A.; H. H. Huss; A. H-Kittikun und J. L. Larsen (1995b). Prevalence of *Vibrio cholerae* and *Salmonella* in a major shrimp production area in Thailand. *Int J Food Microbiol.* **28**(1): 101-113.
- Daniels, N. A.; B. Ray; A. Easton; N. Marano; E. Kahn; A. L. McShan, 2nd; L. Del Rosario; T. Baldwin; M. A. Kingsley; N. D. Puhr; J. G. Wells und F. J. Angulo (2000). Emergence of a new *Vibrio parahaemolyticus* serotype in raw oysters: A prevention quandary. *JAMA.* **284**(12): 1541-1545.
- Daniels, N. A. und A. Shafaie (2000). A review of pathogenic *Vibrio* infections for clinicians. *Infect Med.* **17**(10): 665-685.
- Davis, B. R.; G. R. Fanning; J. M. Madden; A. G. Steigerwalt; H. B. Bradford, Jr.; H. L. Smith, Jr. und D. J. Brenner (1981). Characterization of biochemically atypical *Vibrio cholerae* strains and designation of a new pathogenic species, *Vibrio mimicus*. *J Clin Microbiol.* **14**(6): 631-639.
- De Schryver, P.; T. Defoirdt und P. Sorgeloos (2014). Early mortality syndrome outbreaks: a microbial management issue in shrimp farming? *PLoS Pathog.* **10**(4): e1003919.
- Decamp, O.; D. J. W. Moriarty und P. Lavens (2008). Probiotics for shrimp larviculture: review of field data from Asia and Latin America. *Aquac. Res.* **39**(4): 334-338.
- Defoirdt, T.; N. Boon; P. Sorgeloos; W. Verstraete und P. Bossier (2007). Alternatives to antibiotics to control bacterial infections: luminescent Vibriosis in aquaculture as an example. *Trends Biotechnol.* **25**(10): 472-479.
- Defoirdt, T.; P. Sorgeloos und P. Bossier (2011). Alternatives to antibiotics for the control of bacterial disease in aquaculture. *Curr Opin Microbiol.* **14**(3): 251-258.
- DePaola, A.; L. H. Hopkins; J. T. Peeler; B. Wentz und R. M. McPhearson (1990). Incidence of *Vibrio parahaemolyticus* in U.S. coastal waters and oysters. *Appl Environ Microbiol.* **56**(8): 2299-2302.
- DePaola, A.; C. A. Kaysner; J. Bowers und D. W. Cook (2000). Environmental investigations of *Vibrio parahaemolyticus* in oysters after outbreaks in Washington, Texas, and New York (1997 and 1998). *Appl Environ Microbiol.* **66**(11): 4649-4654.
- Di Pinto, A.; G. Ciccarese; G. Tantillo; D. Catalano und V. T. Forte (2005). A collagenase-targeted multiplex PCR assay for identification of *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio cholerae* and *Vibrio parahaemolyticus*. *J Food Prot.* **68**(1): 150-153.
- Di Pinto, A.; G. Clecarese; R. De Corato; L. Novello und V. Terio (2008). Detection of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in southern Italian shellfish. *Food Control.* **19**(11): 1037-1041.
- Direkbusarakom, S.; M. Yoshimizu; Y. Ezura; L. Ruangpan und Y. Danayadol (1998). *Vibrio* spp. the dominant flora in shrimp hatchery against some fish pathogenic viruses. *J Mar Biotechnol.* **6**(4): 266-267.
- DiRita, V. J.; C. Parsot; G. Jander und J. J. Mekalanos (1991). Regulatory cascade controls virulence in *Vibrio cholerae*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **88**(12): 5403-5407.
- Donlan, R. M. und J. W. Costerton (2002). Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev.* **15**(2): 167-193.

- Drake, S. L.; A. DePaola und L.-A. Jaykus (2007). An overview of *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus*. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* **6**(4): 120-144.
- Dutta, D.; G. Chowdhury; G. P. Pazhani; S. Guin; S. Dutta; S. Ghosh; K. Rajendran; R. K. Nandy; A. K. Mukhopadhyay; M. K. Bhattacharya; U. Mitra; Y. Takeda; G. B. Nair und T. Ramamurthy (2013). *Vibrio cholerae* non-O1, non-O139 serogroups and cholera-like diarrhea, Kolkata, India. *Emerg Infect Dis.* **19**(3): 464-467.
- Elhadi, N.; S. Radu; C. H. Chen und M. Nishibuchi (2004). Prevalence of potentially pathogenic *Vibrio* species in the seafood marketed in Malaysia. *J Food Prot.* **67**(7): 1469-1475.
- EUMOFA (2014). Der EU-Fischmarkt. Europäische Kommission, Generaldirektion für Maritime Angelegenheiten und Fischerei, Generaldirektor. Europäische Union, 2014.
- Evins, G. M.; D. N. Cameron; J. G. Wells; K. D. Greene; T. Popovic; S. Giono-Cerezo; I. K. Wachsmuth und R. V. Tauxe (1995). The emerging diversity of the electrophoretic types of *Vibrio cholerae* in the Western Hemisphere. *J Infect Dis.* **172**(1): 173-179.
- FAO (2004). Introductions and movement of *Penaeus vannamei* and *Penaeus stylirostris* in Asia and the Pacific. FAO. RAP Publication.
- FAO (2005a). Causes of detentions and rejections in international fish trade. <http://www.fao.org/docrep/008/y5924e/y5924e00.htm> Abgerufen am: 29.02.2016
- FAO (2005b). Responsible use of antibiotics in aquaculture. FAO. Fisheries technical paper 469.
- FAO (2005-2014). National aquaculture sector overview Ecuador http://www.fao.org/fishery/countrysector/naso_ecuador/en. Abgerufen am: 21.03.2014
- FAO (2006-2014). Cultured aquatic species information programme. *Penaeus vannamei*. http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Litopenaeus_vannamei/en - tcNA0064. Abgerufen am: 21.03.2014
- FAO (2008a). Global study of shrimp fisheries. FAO. Fisheries technical paper 475.
- FAO (2008b). Yearbook of fishery statistics - commodities 2006 - summary tables world fishery production: estimated value by groups of species. <http://www.fao.org/fishery/publications/yearbooks/en>. Abgerufen am: 13.03.2015
- FAO (2010). The state of world fisheries and aquaculture 2010. FAO.
- FAO (2011). FishStatJ: Universal software for fishery statistical time series. Fisheries and aquaculture department, statistics and information service.
- FAO (2011-2014). Perfiles sobre la pesca y la acuicultura por países: la República del Ecuador <http://www.fao.org/fishery/facp/ECU/es>. Abgerufen am: 27.03.2014
- FAO (2012). The state of world fisheries and aquaculture 2012. FAO.
- FAO (2013a). Technical workshop on Early Mortality Syndrome (EMS) or Acute Hepatopancreatic Necrosis Syndrome (AHPNS) of cultured shrimp (under TCP/VIE/3304). Hanoi, Viet Nam: FAO.
- FAO (2013b). Yearbook of fishery statistics - Food balance sheets 2013 - World apparent consumption by continent <ftp://ftp.fao.org/FI/STAT/summary/default.htm>. Abgerufen am: 14.03.2017
- FAO (2014a). Globefish - market reports-shrimp. <http://www.fao.org/in-action/globefish/market-reports/resource-detail/en/c/338031/>. Abgerufen am: 14.03.2015

- FAO (2014b). Recent developments in fish trade. Sub-committee on fish trade. Bergen, Norway: FAO.
- FAO (2014c). Shrimp. Globefish(2/2014): 3-10.
- FAO (2014d). Yearbook of fishery statistics - commodities 2012 - summary tables world fishery production: estimated value by groups of species.
<ftp://ftp.fao.org/FI/STAT/summary/default.htm>. Abgerufen am: 13.03.2015
- FAO (2015a). Fishery commodities and trade (online query).
<http://www.fao.org/fishery/statistics/global-commodities-production/en>. Abgerufen am: 25.03.2015
- FAO (2015b). Global aquaculture production (online query).
<http://www.fao.org/fishery/statistics/global-aquaculture-production/en>. Abgerufen am: 26.03.2015
- FAO (2015c). Global capture production (online query).
<http://www.fao.org/fishery/statistics/global-capture-production/en>. Abgerufen am: 26.03.2015
- FAO (2015d). Globefish - market reports-shrimp. <http://www.globefish.org/shrimp-may-2015.html>. Abgerufen am: 09.06.2015
- FAO; WHO und OIE (2003). Joint FAO/OIE/WHO expert workshop on non-human antimicrobial usage and antimicrobial resistance: scientific assessment. Geneva, Switzerland: FAO, OIE, WHO.
- FAO; WHO und OIE (2006). Antimicrobial use in aquaculture and antimicrobial resistance. Report of a joint FAO/OIE/WHO expert consultation on antimicrobial use in aquaculture and antimicrobial resistance. Seoul, South Korea: WHO.
- FAO; WHO und OIE (2008). Joint FAO/WHO/OIE expert meeting on critically important antimicrobials. Rome, Italy: FAO.
- Farmer III, J. J. und J. M. Janda (2004). Family I. *Vibrionaceae*. In: Bergey's manual of systematic bacteriology. Springer.
- Faruque, S. M.; M. J. Albert und J. J. Mekalanos (1998). Epidemiology, genetics, and ecology of toxigenic *Vibrio cholerae*. *Microbiol Mol Biol Rev.* **62**(4): 1301-1314.
- Faruque, S. M. und J. J. Mekalanos (2003). Pathogenicity islands and phages in *Vibrio cholerae* evolution. *Trends Microbiol.* **11**(11): 505-510.
- Feldhusen, F. (2000). The role of seafood in bacterial foodborne diseases. *Microbes Infect.* **2**(13): 1651-1660.
- Flegel, T. W. (2013). Update on top disease threats including EMS/AHPNS for shrimps cultured in Asia. Twelfth meeting of the Asia regional advisory group on aquatic animal health. Bangkok, Thailand: NACA.
- Flegel, T. W. (2014). AHPND detection discussion group.
<https://groups.google.com/forum/#!forum/ahpnd> Abgerufen am: 16.06.2014
- Flegel, T. W. und C.-F. Lo (2014). "Free release of primers for specific detection of bacterial isolates that cause acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND)."
http://www.enaca.org/modules/news/article.php?article_id=2015&title=primers-for-detection-of-bacterial-isolates-that-cause-ahpnd.
- Florescu, D. P.; N. Nacescu und C. Ciufecu (1981). *Vibrio cholerae* non group O:1 associated with middle ear infection. *Arch Roum Pathol Exp Microbiol.* **40**(4): 369-372.

- Franca, J. C.; S. M. Raboni; E. Sanfelice; D. Polido; A. Gentili und F. Marques (2013). *Vibrio vulnificus* infection in Southern Brazil - case report. *An Bras Dermatol.* **88**(3): 424-426.
- French, G. L.; M. L. Woo; Y. W. Hui und K. Y. Chan (1989). Antimicrobial susceptibilities of halophilic Vibrios. *J Antimicrob Chemother.* **24**(2): 183-194.
- From, C.; R. Pukall; P. Schumann; V. Hormazabal und P. E. Granum (2005). Toxin-producing ability among *Bacillus* spp. outside the *Bacillus cereus* group. *Appl Environ Microbiol.* **71**(3): 1178-1183.
- Fullner, K. J.; J. C. Boucher; M. A. Hanes; G. K. Haines, 3rd; B. M. Meehan; C. Walchle; P. J. Sansonetti und J. J. Mekalanos (2002). The contribution of accessory toxins of *Vibrio cholerae* O1 El Tor to the proinflammatory response in a murine pulmonary cholera model. *J Exp Med.* **195**(11): 1455-1462.
- Gabastou, J. M.; C. Pesantes; S. Escalante; Y. Narvaez; E. Vela; L. Garcia; D. Zabala und Z. E. Yadon (2002). Characteristics of the cholera epidemic of 1998 in Ecuador during El Nino. *Rev Panam Salud Publica.* **12**(3): 157-164.
- Garriques, D. und G. Arevalo (1995). An evaluation of the production and use of a live bacterial isolate to manipulate the microbial flora in the commercial production of *Penaeus vannamei* postlarvae in Ecuador. In: Swimming through troubled water: proceedings of the special session on shrimp farming : papers presented at aquaculture '95, February 1-4, 1995, San Diego, California. World Aquaculture Society.
- Ghosh, S.; D. Sasmal und T. J. Abraham (2010). Microcosm evaluation of indigenous microflora of traditional shrimp farming system as bioremediators. *Indian J. Fish.* **57**(1): 97-101.
- Gil, A. I.; V. R. Louis; I. N. Rivera; E. Lipp; A. Huq; C. F. Lanata; D. N. Taylor; E. Russek-Cohen; N. Choopun; R. B. Sack und R. R. Colwell (2004). Occurrence and distribution of *Vibrio cholerae* in the coastal environment of Peru. *Environ Microbiol.* **6**(7): 699-706.
- Gil, A. I.; H. Miranda; C. F. Lanata; A. Prada; E. R. Hall; C. M. Barreno; S. Nusrin; N. A. Bhuiyan; D. A. Sack und G. B. Nair (2007). O3:K6 serotype of *Vibrio parahaemolyticus* identical to the global pandemic clone associated with diarrhea in Peru. *Int J Infect Dis.* **11**(4): 324-328.
- Glass, R. I.; M. I. Huq; J. V. Lee; E. J. Threlfall; M. R. Khan; A. R. Alim; B. Rowe und R. J. Gross (1983). Plasmid-borne multiple drug resistance in *Vibrio cholerae* serogroup O1, biotype El Tor: evidence for a point-source outbreak in Bangladesh. *J Infect Dis.* **147**(2): 204-209.
- Gomez, J. M.; R. Fajardo; J. F. Patino und C. A. Arias (2003). Necrotizing fasciitis due to *Vibrio alginolyticus* in an immunocompetent patient. *J Clin Microbiol.* **41**(7): 3427-3429.
- Goodgame, R. W. und W. B. Greenough (1975). Cholera in Africa: a message for the West. *Ann Intern Med.* **82**(1): 101-106.
- Gopal, S.; S. K. Otta; S. Kumar; I. Karunasagar; M. Nishibuchi und I. Karunasagar (2005). The occurrence of *Vibrio* species in tropical shrimp culture environments; implications for food safety. *Int J Food Microbiol.* **102**(2): 151-159.
- Gourmelon, M.; J. Cillard und M. Pommepuy (1994). Visible light damage to *Escherichia coli* in seawater: oxidative stress hypothesis. *J Appl Bacteriol.* **77**(1): 105-112.
- Guardiola-Avila, I.; E. Acedo-Felix; L. Noriega-Orozco; G. Yepiz-Plascencia; I. Sifuentes-Romero und B. Gomez-Gil (2013). Draft genome sequence of *Vibrio mimicus* strain CAIM 602T. *Genome Announc.* **1**(2): 1-2.

- Guardiola-Avila, I.; L. Noriega-Orozco; E. Acedo-Félix; A. E. Lara und M. Tapia-Olea (2014). Presence of the hemolysin gene of *Vibrio mimicus* in fish and seafood products in Sonora, México. *J Food Res.* **4**(1): 66-76.
- Gullberg, E.; L. M. Albrecht; C. Karlsson; L. Sandegren und D. I. Andersson (2014). Selection of a multidrug resistance plasmid by sublethal levels of antibiotics and heavy metals. *MBio.* **5**(5): 1-9.
- Gullian, M.; F. Thompson und J. Rodriguez (2004). Selection of probiotic bacteria and study of their immunostimulatory effect in *Penaeus vannamei*. *Aquaculture.* **233**(1-4): 1-14.
- Halscheidt, A. (2007). Das RpoS-Protein aus *Vibrio cholerae*: Funktionsanalyse und Charakterisierung der Proteolyse-Kaskade. Julius-Maximilians-Universität Würzburg. 158.
- Hara-Kudo, Y. und S. Kumagai (2014). Impact of seafood regulations for *Vibrio parahaemolyticus* infection and verification by analyses of seafood contamination and infection. *Epidemiol Infect.* **142**(11): 2237-2247.
- Hara-Kudo, Y.; K. Sugiyama; M. Nishibuchi; A. Chowdhury; J. Yatsuyanagi; Y. Ohtomo; A. Saito; H. Nagano; T. Nishina; H. Nakagawa; H. Konuma; M. Miyahara und S. Kumagai (2003). Prevalence of pandemic thermostable direct hemolysin-producing *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 in seafood and the coastal environment in Japan. *Appl Environ Microbiol.* **69**(7): 3883-3891.
- Harris, J. B.; R. C. LaRocque; F. Qadri; E. T. Ryan und S. B. Calderwood (2012). Cholera. *Lancet.* **379**(9835): 2466-2476.
- Hasan, N. A.; S. Y. Choi; M. Eppinger; P. W. Clark; A. Chen; M. Alam; B. J. Haley; E. Taviani; E. Hine; Q. Su; L. J. Tallon; J. B. Prosper; K. Furth; M. M. Hoq; H. Li; C. M. Fraser-Liggett; A. Cravioto; A. Huq; J. Ravel; T. A. Cebula und R. R. Colwell (2012). Genomic diversity of 2010 Haitian cholera outbreak strains. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **109**(29): 2010-2017.
- Hasan, N. A.; C. J. Grim; B. J. Haley; J. Chun; M. Alam; E. Taviani; M. M. Hoq; A. C. Munk; E. Saunders und T. S. Brettin (2010). Comparative genomics of clinical and environmental *Vibrio mimicus*. *PNAS.* **107**(49): 21134-21139.
- Hassan, M. N.; M. Rahman; M. B. Hossain; M. M. Hossain; R. Mendes und A. A. K. M. Nowsad (2013). Monitoring the presence of chloramphenicol and nitrofurantoin metabolites in cultured prawn, shrimp and feed in the Southwest coastal region of Bangladesh. *Egyptian Journal of Aquatic Research.* **39**(1): 51-58.
- Hasson, K. W.; D. V. Lightner; J. Mari; J. R. Bonami; B. T. Poulos; L. L. Mohny; R. M. Redman und J. A. Brock (1999). The geographic distribution of Taura Syndrome Virus (TSV) in the Americas: determination by histopathology and in situ hybridization using TSV-specific cDNA probes. *Aquaculture.* **171**(1-2): 13-26.
- Hasson, K. W.; D. V. Lightner; B. T. Poulos; R. M. Redman; B. L. White; J. A. Brock und J. R. Bonami (1995). Taura syndrome in *Penaeus vannamei*: Demonstration of a viral etiology. *Dis Aquat Organ.* **23**(2): 115-126.
- Heitmann, I.; L. Jofre; J. C. Hormazabal; A. Olea; C. Vallebuona und C. Valdes (2005). [Review and guidelines for treatment of diarrhea caused by *Vibrio parahaemolyticus*]. *Rev Chilena Infectol.* **22**(2): 131-140.
- Herrfurth, D. (2013). In vivo Studien zur Anreicherung, Lokalisation und Persistenz von *Vibrio* spp. in artifiziell kontaminierten *Mytilus edulis*. Mensch und Buch Verlag Berlin, Freie Universität Berlin. 141.

- Hirono, Y. und M. Leslie (1992). Shrimp culture industry Ecuador. In: Marine shrimp culture: principles and practices. Elsevier Science B.V.
- Hlady, W. G. und K. C. Klontz (1996). The epidemiology of *Vibrio* infections in Florida, 1981-1993. J Infect Dis. **173**(5): 1176-1183.
- Hodges, K. und R. Gill (2010). Infectious diarrhea: Cellular and molecular mechanisms. Gut Microbes. **1**(1): 4-21.
- Holmstrom, K.; S. Graslund; A. Wahlstrom; S. Pongshompoo; B. E. Bengtsson und N. Kautsky (2003). Antibiotic use in shrimp farming and implications for environmental impacts and human health. Int J Food Sci Tech. **38**(3): 255-266.
- Honda, T. und T. Iida (1993). The pathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus* and the role of the thermostable direct hemolysin and related haemolysins. Rev Med Microbiol. **4**(2): 106-113.
- Hooper, W. L.; G. I. Barrow und D. J. McNab (1974). *Vibrio parahaemolyticus* food-poisoning in Britain. Lancet. **1**(7866): 1100-1102.
- Horseman, M. A. und S. Surani (2011). A comprehensive review of *Vibrio vulnificus*: an important cause of severe sepsis and skin and soft-tissue infection. Int J Infect Dis. **15**(3): 157-166.
- Hossain, M. T.; E. Y. Kim; Y. R. Kim; D. G. Kim und I. S. Kong (2012). Application of *groEL* gene for the species-specific detection of *Vibrio parahaemolyticus* by PCR. Lett Appl Microbiol. **54**(1): 67-72.
- Hossain, M. T.; Y. O. Kim und I. S. Kong (2013). Multiplex PCR for the detection and differentiation of *Vibrio parahaemolyticus* strains using the *groEL*, *tdh* and *trh* genes. Mol Cell Probes. **2013**: 1-5.
- Howard, R. J.; M. E. Pessa; B. H. Brennaman und R. Ramphal (1985). Necrotizing soft-tissue infections caused by marine Vibrios. Surgery. **98**(1): 126-130.
- Hoyer, J.; E. Engelmann; R. M. Liehr; A. Distler; H. Hahn und T. Shimada (1995). Septic shock due to *Vibrio vulnificus* serogroup 04 wound infection acquired from the Baltic Sea. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. **14**(11): 1016-1018.
- Huehn, S. (2012). Epidemiologie und Erkrankung. In: Pathogene Mikroorganismen - *Vibrio*. Behr's Verlag.
- Hughes, J. M.; J. M. Boyce; A. R. Aleem; J. G. Wells; A. S. Rahman und G. T. Curlin (1978). *Vibrio parahaemolyticus* enterocolitis in Bangladesh: report of an outbreak. Am J Trop Med Hyg. **27**(1 Pt 1): 106-112.
- Huq, A.; R. B. Sack; A. Nizam; I. M. Longini; G. B. Nair; A. Ali; J. G. Morris, Jr.; M. N. Khan; A. K. Siddique; M. Yunus; M. J. Albert; D. A. Sack und R. R. Colwell (2005). Critical factors influencing the occurrence of *Vibrio cholerae* in the environment of Bangladesh. Appl Environ Microbiol. **71**(8): 4645-4654.
- Huq, A.; E. B. Small; P. A. West; M. I. Huq; R. Rahman und R. R. Colwell (1983). Ecological relationships between *Vibrio cholerae* and planktonic crustacean copepods. Appl Environ Microbiol. **45**(1): 275-283.
- Huq, A.; C. A. Whitehouse; C. J. Grim; M. Alam und R. R. Colwell (2008). Biofilms in water, its role and impact in human disease transmission. Curr Opin Biotechnol. **19**(3): 244-247.
- Huss, H. H.; A. Reilly und P. K. M. Embarek (2000). Prevention and control of hazards in seafood. Food Control. **11**(2): 149-156.

- Ibarra Trujillo, J.; A. Delgado und D. Alvarado (1999). Vibrios no epidemicos y *Vibrio cholerae* O1 asociados a enfermedad diarreica aguda. Evento climatológico "El Niño" - 1998. Hospital Nacional Dos de Mayo. Anales de la Facultad de Medicina. **60**(4): 251-256.
- INP (2013). Lista de productos acuícolas pesqueros con certificado de registro sanitario unificado (vigentes). Instituto Nacional de Pesca Ecuador.
- INP (2014). INP realizó charlas informativas para prevenir el Síndrome de Mortalidad Temprana en los camarones. <http://www.institutopesca.gob.ec/inp-realizo-charlas-informativas-para-prevenir-el-sindrome-de-mortalidad-temprana-en-los-camarones/> Abgerufen am: 13.11.2014
- Islam, M. S.; M. I. Jahid; M. M. Rahman; M. Z. Rahman; M. S. Islam; M. S. Kabir; D. A. Sack und G. K. Schoolnik (2007). Biofilm acts as a microenvironment for plankton-associated *Vibrio cholerae* in the aquatic environment of Bangladesh. *Microbiol Immunol.* **51**(4): 369-379.
- ISO 20776-1:2006 Labormedizinische Untersuchungen und In-vitro-Diagnostika-Systeme – Empfindlichkeitsprüfung von Infektionserregern und Evaluation von Geräten zur antimikrobiellen Empfindlichkeitsprüfung – Teil 1: Referenzmethode zur Testung der In-vitro-Aktivität von antimikrobiellen Substanzen gegen schnell wachsende aerobe Bakterien, die Infektionskrankheiten verursachen; Deutsche Fassung EN ISO 20776-1:2006
- ISO /TS 21872-1:2007 „Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection of potentially enteropathogenic *Vibrio* spp. – Part 1: Detection of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio cholerae*“.
- ISO /TS 21872-2:2007 „Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection of potentially enteropathogenic *Vibrio* spp. – Part 2: Detection of species other than *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio cholerae*“.
- Iwamoto, M.; T. Ayers; B. E. Mahon und D. L. Swerdlow (2010). Epidemiology of seafood-associated infections in the United States. *Clin Microbiol Rev.* **23**(2): 399-411.
- Janda, J. M.; C. Powers; R. G. Bryant und S. L. Abbott (1988). Current perspectives on the epidemiology and pathogenesis of clinically significant *Vibrio* spp. *Clin Microbiol Rev.* **1**(3): 245-267.
- Jayasree, L.; P. Janakiram und R. Madhavi (2006). Characterization of *Vibrio* spp. associated with diseased shrimp from culture ponds of Andhra Pradesh (India). *J World Aquac Soc.* **37**(4): 523-532.
- Jennings, M. C.; K. P. C. Minbiole und W. M. Wuest (2015). Quaternary ammonium compounds: an antimicrobial mainstay and platform for innovation to address bacterial resistance. *ACS Infect Dis.* **1**(7): 288-303.
- Jiang, S.; W. Chu und W. Fu (2003). Prevalence of cholera toxin genes (ctxA and zot) among non-O1/O139 *Vibrio cholerae* strains from Newport Bay, California. *Appl Environ Microbiol.* **69**(12): 7541-7544.
- Johnson, L. R. (2008). Microcolony and biofilm formation as a survival strategy for bacteria. *J Theor Biol.* **251**(1): 24-34.
- Johnston, M. D. und M. H. Brown (2002). An investigation into the changed physiological state of *Vibrio* bacteria as a survival mechanism in response to cold temperatures and studies on their sensitivity to heating and freezing. *J Appl Microbiol.* **92**(6): 1066-1077.

- Jones, J. L.; C. H. Ludeke; J. C. Bowers; N. Garrett; M. Fischer; M. B. Parsons; C. A. Bopp und A. DePaola (2012). Biochemical, serological, and virulence characterization of clinical and oyster *Vibrio parahaemolyticus* isolates. *J Clin Microbiol.* **50**(7): 2343-2352.
- Jones, M. K. und J. D. Oliver (2009). *Vibrio vulnificus*: disease and pathogenesis. *Infect Immun.* **77**(5): 1723-1733.
- Jorquera, M. A.; G. Valencia; M. Eguchi; M. Katayose und C. Riquelme (2002). Disinfection of seawater for hatchery aquaculture systems using electrolytic water treatment. *Aquaculture.* **207**(3-4): 213-224.
- Jun, J. W.; J. H. Kim; C. H. Choresca; S. P. Shin; J. E. Han; S. Y. Han; J. Y. Chai und S. C. Park (2012). Isolation, molecular characterization, and antibiotic susceptibility of *Vibrio parahaemolyticus* in Korean seafood. *Foodborne Pathog Dis.* **9**(3): 1-8.
- Kamei, Y.; M. Yoshimizu; Y. Ezura und T. Kimura (1988). Screening of bacteria with antiviral activity from fresh water salmonid hatcheries. *Microbiol Immunol.* **32**(1): 67-73.
- Kaneko, T. und R. R. Colwell (1973). Ecology of *Vibrio parahaemolyticus* in Chesapeake Bay. *J Bacteriol.* **113**(1): 24-32.
- Kaper, J.; H. Lockman; R. R. Colwell und S. W. Joseph (1979). Ecology, serology, and enterotoxin production of *Vibrio cholerae* in Chesapeake Bay. *Appl Environ Microbiol.* **37**(1): 91-103.
- Kaper, J. B.; J. G. Morris, Jr. und M. M. Levine (1995). Cholera. *Clin Microbiol Rev.* **8**(1): 48-86.
- Karaolis, D. K.; J. A. Johnson; C. C. Bailey; E. C. Boedeker; J. B. Kaper und P. R. Reeves (1998). A *Vibrio cholerae* pathogenicity island associated with epidemic and pandemic strains. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **95**(6): 3134-3139.
- Karunasagar, I. und L. Ababouch (2012). Shrimp viral diseases, import risk assessment and international trade. *Indian J Virol.* **23**(2): 141-148.
- Karunasagar, I.; B. K. Kumar und A. Rohit (2013). Noncholera Vibrios in human gastroenteritis. In: *Infections of the gastrointestinal system.* JP Medical Ltd.
- Karunasagar, I.; R. Pai und G. R. Malathi (1994). Mass mortality of *Penaeus monodon* larvae due to antibiotic-resistant *Vibrio harveyi* infection. *Aquaculture.* **128**(3-4): 203-209.
- Karunasagar, I.; M. M. Shivu; S. K. Girisha; G. Krohne und I. Karunasagar (2007). Biocontrol of pathogens in shrimp hatcheries using bacteriophages. *Aquaculture.* **268**(1-4): 288-292.
- Kautsky, N.; P. Ronnback; M. Tedengren und M. Troell (2000). Ecosystem perspectives on management of disease in shrimp pond farming. *Aquaculture.* **191**(1-3): 145-161.
- Keasler, S. P. und R. H. Hall (1993). Detecting and biotyping *Vibrio cholerae* O1 with multiplex polymerase chain reaction. *Lancet.* **341**(8861): 1661.
- Kelly, M. T. (1982). Effect of temperature and salinity on *Vibrio* (Benecke) *vulnificus* occurrence in a Gulf Coast environment. *Appl Environ Microbiol.* **44**(4): 820-824.
- Khan, S.; A. Kumar; D. Meparambu; S. Thomas; D. Harichandran und S. Karim (2013). Fatal non-O1/ non-O139 *Vibrio cholerae* septicaemia in a patient with chronic liver disease: a case report and review of the literature. *J Med Microbiol.* **62**(6): 917-921.

- Kim, S. R.; L. Nonaka und S. Suzuki (2004). Occurrence of tetracycline resistance genes *tet* (M) and *tet* (S) in bacteria from marine aquaculture sites. FEMS Microbiol Lett. **237**(1): 147-156.
- Kirkwood, G. P. (1993). Shrimp management report. Final report for the overseas development administration: MRAG Ltd.
- Kirn, T. J.; M. J. Lafferty; C. M. Sandoe und R. K. Taylor (2000). Delineation of pilin domains required for bacterial association into microcolonies and intestinal colonization by *Vibrio cholerae*. Mol Microbiol. **35**(4): 896-910.
- Kirschner, A. K.; S. Schauer; B. Steinberger; I. Wilhartitz; C. J. Grim; A. Huq; R. R. Colwell; A. Herzig und R. Sommer (2011). Interaction of *Vibrio cholerae* non-O1/non-O139 with copepods, cladocerans and competing bacteria in the large alkaline lake Neusiedler See, Austria. Microb Ecol. **61**(3): 496-506.
- Klontz, K. C.; S. Lieb; M. Schreiber; H. T. Janowski; L. M. Baldy und R. A. Gunn (1988). Syndromes of *Vibrio vulnificus* infections. Clinical and epidemiologic features in Florida cases, 1981-1987. Ann Intern Med. **109**(4): 318-323.
- Kobayashi, T.; S. Enomoto; R. Sakazaki und S. Kuwahara (1963). A new selective isolation medium for the *Vibrio* group; on a modified Nakanishi's medium (TCBS agar medium). Nihon Saikingaku Zasshi. **18**: 387-392.
- Koelle, K.; M. Pascual und M. Yunus (2005). Pathogen adaptation to seasonal forcing and climate change. Proc Biol Sci. **272**(1566): 971-977.
- Kongrueng, J.; M. Yingkajorn; S. Bunpa; N. Sermwittayawong; K. Singkhamanan und V. Vuddhakul (2014). Characterization of *Vibrio parahaemolyticus* causing acute hepatopancreatic necrosis disease in Southern Thailand. J Fish Dis. **38**(11): 957-966.
- Koralage, M. S.; T. Alter; D. Pichpol; E. Strauch; K. H. Zessin und S. Huehn (2012). Prevalence and molecular characteristics of *Vibrio* spp. isolated from preharvest shrimp of the North Western province of Sri Lanka. J Food Prot. **75**(10): 1846-1850.
- Kovach, M. E.; M. D. Shaffer und K. M. Peterson (1996). A putative integrase gene defines the distal end of a large cluster of ToxR-regulated colonization genes in *Vibrio cholerae*. Microbiology. **1996**(142): 2165-2174.
- Laffera, R. R.; R. Freib und A. F. Widmera (2000). Epidemiologie der Septikämien an einem Universitätsspital über 5 Jahre. Schweiz Med Wochenschr. **130**: 1471-1478.
- Lajnef, R.; M. Snoussi; J. L. Romalde; C. Nozha und A. Hassen (2012). Comparative study on the antibiotic susceptibility and plasmid profiles of *Vibrio alginolyticus* strains isolated from four Tunisian marine biotopes. World J Microbiol Biotechnol. **28**(12): 3345-3363.
- Lavilla-Pitogo, C. R. (1995). Bacterial diseases of penaeid shrimps: an Asian view. Diseases in Asian aquaculture II. proceedings of the second symposium on diseases in Asian aquaculture, 25-29 october 1993. Phuket, Thailand: Fish health section, Asian fisheries society.
- Lavilla-Pitogo, C. R.; M. C. L. Baticados; E. R. Cruz-Lacierda und L. D. De La Pena (1990). Occurrence of luminous bacterial disease of *Penaeus monodon* larvae in the Philippines. Aquaculture. **91**(1-2): 1-13.
- Lavilla-Pitogo, C. R.; G. D. Lio-Po; E. R. Cruz-Lacierda; E. V. Alapide-Tendencia und L. D. De la Peña (2000). Diseases of penaeid shrimps in the Philippines. Aquaculture department Southeast Asian fisheries development center Tigbauan, Iloilo, Philippines. Aquaculture extension manual no. 16.

- Lawrence, D. N.; P. A. Blake; J. C. Yashuk; J. G. Wells; W. B. Creech und J. H. Hughes (1979). *Vibrio parahaemolyticus* gastroenteritis outbreaks aboard 2 cruise ships. Am J Epidemiol. **109**(1): 71-80.
- Leal, N. C.; S. C. da Silva; V. O. Cavalcanti; A. C. Figueiroa; V. V. Nunes; I. S. Miralles und E. Hofer (2008). *Vibrio parahaemolyticus* serovar O3:K6 gastroenteritis in Northeast Brazil. J Appl Microbiol. **105**(3): 691-697.
- Lee, D. Y.; S. Y. Moon; S. O. Lee; H. Y. Yang; H. J. Lee und M. S. Lee (2008). Septic shock due to *Vibrio alginolyticus* in a cirrhotic patient: the first case in Korea. Yonsei Med J. **49**(2): 329-332.
- Lee, K. K.; S. R. Yu; F. R. Chen; T. I. Yang und P. C. Liu (1996). Virulence of *Vibrio alginolyticus* isolated from diseased tiger prawn, *Penaeus monodon*. Curr Microbiol. **32**(4): 229-231.
- Lem, A. (2006). An overview of global shrimp markets and trade. In: Shrimp culture: economics, market and trade. Blackwell Publishing.
- Lemoine, T.; P. Germanetto und P. Giraud (1999). Toxi-infection alimentaire collective à *Vibrio parahaemolyticus*. Bull. Épidémiol. Hebd. **10**: 37-38.
- Lester, L. J. (1992). Overview of shrimp farming in the western hemisphere. In: Marine shrimp culture: principles and practices. Elsevier Science B.V.
- Letchumanan, V.; K. G. Chan und L. H. Lee (2014). *Vibrio parahaemolyticus*: a review on the pathogenesis, prevalence, and advance molecular identification techniques. Front Microbiol. **5**: 1-13.
- Letchumanan, V.; W. F. Yin; L. H. Lee und K. G. Chan (2015). Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from retail shrimps in Malaysia. Front Microbiol. **6**: 1-11.
- Lightner, D. V. (1996). A handbook of shrimp pathology and diagnostic procedures for diseases of cultured penaeid shrimp. World Aquaculture Society.
- Lightner, D. V. (2011). Virus diseases of farmed shrimp in the Western Hemisphere (the Americas): a review. J Invertebr Pathol. **106**(1): 110-130.
- Lightner, D. V.; R. M. Redman; C. R. Pantoja; B. L. Noble und L. H. Tran (2012a). Early Mortality Syndrome affects shrimp in Asia. Glob Aquacult Advocate. **15**(1): 40.
- Lightner, D. V.; R. M. Redman; C. R. Pantoja; K. F. Tang; B. L. Noble; P. Schofield; L. L. Mohny; L. M. Nunan und S. A. Navarro (2012b). Historic emergence, impact and current status of shrimp pathogens in the Americas. J Invertebr Pathol. **110**(2): 174-183.
- Lightner, D. V.; R. M. Redman; B. T. Poulos; L. M. Nunan; J. L. Mari und K. W. Hasson (1997). Risk of spread of penaeid shrimp viruses in the Americas by the international movement of live and frozen shrimp. Rev Sci Tech. **16**(1): 146-160.
- Linkous, D. A. und J. D. Oliver (1999). Pathogenesis of *Vibrio vulnificus*. FEMS Microbiol Lett. **174**(2): 207-214.
- Liu, P. C.; K. K. Lee und S. N. Chen (1996). Pathogenicity of different isolates of *Vibrio harveyi* in tiger prawn, *Penaeus monodon*. Lett Appl Microbiol. **22**(6): 413-416.
- Liu, X.; Y. Chen; X. Wang und R. Ji (2004). [Foodborne disease outbreaks in China from 1992 to 2001 national foodborne disease surveillance system]. Wei Sheng Yan Jiu. **33**(6): 725-777.
- López-Torres, M. A. (2001). La importancia de conteos bacterianos en acuicultura. Panorama Acuícola. **6**(2): 34-35.

- Lozano-Leon, A.; J. Torres; C. R. Osorio und J. Martinez-Urtaza (2003). Identification of *tdh*-positive *Vibrio parahaemolyticus* from an outbreak associated with raw oyster consumption in Spain. *FEMS Microbiol Lett.* **226**(2): 281-284.
- Lu, B.; H. Zhou; D. Li; F. Li; F. Zhu; Y. Cui; L. Huang und D. Wang (2014). The first case of bacteraemia due to non-O1/non-O139 *Vibrio cholerae* in a type 2 diabetes mellitus patient in mainland China. *Int J Infect Dis.* **25**: 116-118.
- Lukinmaa, S.; K. Mattila; V. Lehtinen; M. Hakkinen; M. Koskela und A. Siitonen (2006). Territorial waters of the Baltic Sea as a source of infections caused by *Vibrio cholerae* non-O1, non-O139: report of 3 hospitalized cases. *Diagn Microbiol Infect Dis.* **54**(1): 1-6.
- Lundin, C. G. (1996). Global attempt to address shrimp disease. Marine/environmental paper No. 4.: The World Bank.
- Luo, Y.; J. Ye; D. Jin; G. Ding; Z. Zhang; L. Mei; S. Octavia und R. Lan (2013). Molecular analysis of non-O1/non-O139 *Vibrio cholerae* isolated from hospitalised patients in China. *BMC Microbiol.* **13**(52): 1-12.
- Lynch, T.; S. Livingstone; E. Buenaventura; E. Lutter; J. Fedwick; A. G. Buret; D. Graham und R. DeVinney (2005). *Vibrio parahaemolyticus* disruption of epithelial cell tight junctions occurs independently of toxin production. *Infect Immun.* **73**(3): 1275-1283.
- MAC (2013). Mitigation measures for management and control of EMS/AHPNS risk, strengthening of credibility for Thai shrimp industry. <http://www.fisheries.go.th/ems/index.php/2013-05-10-08-01-01> Abgerufen am: 08.12.2015
- Magalhaes, V.; R. A. Lima; S. Tateno und M. Magalhaes (1991). [Human gastroenteritis associated with *Vibrio parahaemolyticus* in Recife, Brazil]. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* **33**(1): 64-68.
- Makino, K.; K. Oshima; K. Kurokawa; K. Yokoyama; T. Uda; K. Tagomori; Y. Iijima; M. Najima; M. Nakano; A. Yamashita; Y. Kubota; S. Kimura; T. Yasunaga; T. Honda; H. Shinagawa; M. Hattori und T. Iida (2003). Genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus*: a pathogenic mechanism distinct from that of *V. cholerae*. *Lancet.* **361**(9359): 743-749.
- Mandal, S.; M. D. Mandal und N. K. Pal (2011). Cholera: a great global concern. *Asian Pac J Trop Med.* **4**(7): 573-580.
- Manjusha, S.; G. B. Sarita; K. K. Elyas und M. Chandrasekaran (2005). Multiple antibiotic resistances of *Vibrio* Isolates from coastal and brackish water areas. *Am J Biochem Biotechnol.* **1**(4): 193-198.
- Marin, M. A.; C. C. Thompson; F. S. Freitas; E. L. Fonseca; A. O. Aboderin; S. B. Zailani; N. K. Quartey; I. N. Okeke und A. C. Vicente (2013). Cholera outbreaks in Nigeria are associated with multidrug resistant atypical El Tor and non-O1/non-O139 *Vibrio cholerae*. *PLoS Negl Trop Dis.* **7**(2): 1-9.
- Martinez Cruz, P.; A. L. Ibanez; O. A. Monroy Hermosillo und H. C. Ramirez Saad (2012). Use of probiotics in aquaculture. *ISRN Microbiol.* **2012**: 1-13.
- Martinez-Urtaza, J.; B. Huapaya; R. G. Gavilan; V. Blanco-Abad; J. Ansedo-Bermejo; C. Cadarso-Suarez; A. Figueiras und J. Trinanes (2008a). Emergence of Asiatic *Vibrio* diseases in South America in phase with El Nino. *Epidemiology.* **19**(6): 829-837.
- Martinez-Urtaza, J.; A. Lozano-Leon; J. Varela-Pet; J. Trinanes; Y. Pazos und O. Garcia-Martin (2008b). Environmental determinants of the occurrence and distribution of *Vibrio parahaemolyticus* in the rias of Galicia, Spain. *Appl Environ Microbiol.* **74**(1): 265-274.

- Maruo, K.; T. Akaike; T. Ono und H. Maeda (1998). Involvement of bradykinin generation in intravascular dissemination of *Vibrio vulnificus* and prevention of invasion by a bradykinin antagonist. *Infect Immun.* **66**(2): 866-869.
- Mascher, F.; C. Hase; Y. Moenne-Loccoz und G. Defago (2000). The viable-but-nonculturable state induced by abiotic stress in the biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* CHA0 does not promote strain persistence in soil. *Appl Environ Microbiol.* **66**(4): 1662-1667.
- Mathur, S. und R. Singh (2005). Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria - a review. *Int J Food Microbiol.* **105**(3): 281-295.
- Matsumoto, C.; J. Okuda; M. Ishibashi; M. Iwanaga; P. Garg; T. Rammamurthy; H. C. Wong; A. Depaola; Y. B. Kim; M. J. Albert und M. Nishibuchi (2000). Pandemic spread of an O3:K6 clone of *Vibrio parahaemolyticus* and emergence of related strains evidenced by arbitrarily primed PCR and toxRS sequence analyses. *J Clin Microbiol.* **38**(2): 578-585.
- Matte, M. H.; L. Baldassi; M. L. Barbosa; M. I. C. Malucelli; S. M. O. O. Nitrini und G. R. Matte (2007). Virulence factors of *Vibrio metschnikovii* strains isolated from fish in Brazil. *Food Control.* **18**(6): 747-751.
- McClennen, C. (2004). White Spot Syndrome Virus-The economic, environmental and technical implications on the development of Latin American shrimp farming. Tufts University. 106.
- McSweeney, R. J. und W. R. Forgan-Smith (1977). Wound infections in Australia from halophilic Vibrios. *Med J Aust.* **1**(24): 896-897.
- MEF (2014). Decreto supremo No 005-2014-Produce. Diario Oficial El Peruano. 529182-529184.
- Mengel, M. A.; I. Delrieu; L. Heyerdahl und B. D. Gessner (2014). Cholera outbreaks in Africa. *Curr Top Microbiol Immunol.* **2014**(379): 117-144.
- Messelhauser, U.; J. Colditz; D. Tharigen; W. Kleih; C. Holler und U. Busch (2010). Detection and differentiation of *Vibrio* spp. in seafood and fish samples with cultural and molecular methods. *Int J Food Microbiol.* **142**(3): 360-364.
- MHLW (2009). Food poisoning statistics, 2009. Ministry of health labour and welfare, Japan.
- Miranda, C. D. und R. Zemelman (2002). Antimicrobial multiresistance in bacteria isolated from freshwater Chilean salmon farms. *Sci Total Environ.* **293**(1-3): 207-218.
- Miyasaka, J.; S. Yahiro; Y. Arahira; H. Tokunaga; K. Katsuki und Y. Hara-Kudo (2006). Isolation of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* from wild aquatic birds in Japan. *Epidemiol Infect.* **134**(4): 780-785.
- Mohney, L. L.; D. V. Lightner und T. A. Bell (1994). An epizootic of Vibriosis in Ecuadorian pond - reared *Penaeus vannamei* Boone (Crustacea: Decapoda). *J World Aquac Soc.* **25**(1): 116-125.
- Molero, X.; R. M. Bartolome; T. Vinuesa; L. Guarner; A. Accarino; F. Casellas und R. Garcia (1989). [Acute gastroenteritis due to *Vibrio parahaemolyticus* in Spain. Presentation of 8 cases]. *Med Clin (Barc).* **92**(1): 1-4.
- Moriarty, D. J. W. (1998). Control of luminous *Vibrio* species in penaeid aquaculture ponds. *Aquaculture.* **164**(1-4): 351-358.
- Morris, J. G., Jr. (1990). Non-O group 1 *Vibrio cholerae*: a look at the epidemiology of an occasional pathogen. *Epidemiol Rev.* **12**: 179-191.

- Munoz-Atienza, E.; B. Gomez-Sala; C. Araujo; C. Campanero; R. del Campo; P. E. Hernandez; C. Herranz und L. M. Cintas (2013). Antimicrobial activity, antibiotic susceptibility and virulence factors of lactic acid bacteria of aquatic origin intended for use as probiotics in aquaculture. *BMC Microbiol.* **13**(15): 1-22.
- Mutreja, A.; D. W. Kim; N. R. Thomson; T. R. Connor; J. H. Lee; S. Kariuki; N. J. Croucher; S. Y. Choi; S. R. Harris; M. Lebens; S. K. Niyogi; E. J. Kim; T. Ramamurthy; J. Chun; J. L. Wood; J. D. Clemens; C. Czerkinsky; G. B. Nair; J. Holmgren; J. Parkhill und G. Dougan (2011). Evidence for several waves of global transmission in the seventh cholera pandemic. *Nature.* **477**(7365): 462-465.
- Mutter, R. (2015). Ecuador thrives with low-density, sustainable shrimp farming model. <http://fishfarminginternational.com/keeping-shrimp-sustainable-in-ecuador/>
Abgerufen am: 15.11.2015
- Mwansa, J. C.; J. Mwaba; C. Lukwesa; N. A. Bhuiyan; M. Ansaruzzaman; T. Ramamurthy; M. Alam und G. Balakrish Nair (2007). Multiply antibiotic-resistant *Vibrio cholerae* O1 biotype El Tor strains emerge during cholera outbreaks in Zambia. *Epidemiol Infect.* **135**(5): 847-853.
- NACA (2012). Asia Pacific emergency regional consultation on the emerging shrimp disease: Early Mortality Syndrome (EMS)/Acute Hepatopancreatic Necrosis Syndrome (AHPNS). Network of Aquaculture Centres in Asia-Pacific.
- Nair, G. B.; T. Ramamurthy; S. K. Bhattacharya; B. Dutta; Y. Takeda und D. A. Sack (2007). Global dissemination of *Vibrio parahaemolyticus* serotype O3:K6 and its serovariants. *Clin Microbiol Rev.* **20**(1): 39-48.
- Nair, G. B.; T. Ramamurthy; S. K. Bhattacharya; A. K. Mukhopadhyay; S. Garg; M. K. Bhattacharya; T. Takeda; T. Shimada; Y. Takeda und B. C. Deb (1994). Spread of *Vibrio cholerae* O139 Bengal in India. *J Infect Dis.* **169**(5): 1029-1034.
- Nandi, B.; R. K. Nandy; S. Mukhopadhyay; G. B. Nair; T. Shimada und A. C. Ghose (2000). Rapid method for species-specific identification of *Vibrio cholerae* using primers targeted to the gene of outer membrane protein *OmpW*. *J Clin Microbiol.* **38**(11): 4145-4151.
- Navarro, R.; V. Morales; R. Tello; C. Cuéllar-Anjel und L. Montoya (2013). Manual regional de procedimientos de emergencia para Síndrome de Mortalidad Temprana (EMS/AHPNS). Organización Internacional de Sanidad Agropecuaria (OIRSA)
- Nelson, E. J.; J. B. Harris; J. G. Morris, Jr.; S. B. Calderwood und A. Camilli (2009). Cholera transmission: the host, pathogen and bacteriophage dynamic. *Nat Rev Microbiol.* **7**(10): 693-702.
- Nelson, E. J.; D. S. Nelson; M. A. Salam und D. A. Sack (2011). Antibiotics for both moderate and severe cholera. *N Engl J Med.* **364**(1): 5-7.
- Neumann, D. A.; M. W. Benenson; E. Hubster; N. Thi-nhu-Tuan und L.-t.-. Van (1972). *Vibrio parahemolyticus* in the Republic of Vietnam. *Am J Trop Med Hyg* (21): 464-466.
- Newton, A.; M. Kendall; D. J. Vugia; O. L. Henao und B. E. Mahon (2012). Increasing rates of Vibriosis in the United States, 1996-2010: review of surveillance data from 2 systems. *Clin Infect Dis.* **54**(5): 391-395.
- Ninawe, A. S. und J. Selvin (2009). Probiotics in shrimp aquaculture: avenues and challenges. *Crit Rev Microbiol.* **35**(1): 43-66.

- NOAA (2012). Imports and exports of fishery products annual summary, 2012. <http://www.st.nmfs.noaa.gov/commercial-fisheries/foreign-trade/index> Abgerufen am: 15.10.2015
- NOAA (2014). The surprising sources of your favorite seafoods. http://www.nmfs.noaa.gov/aquaculture/archive/09_13_12_top_seafood_consumed.html Abgerufen am: 15.10.2015
- Noor Uddin, G. M.; M. H. Larsen; H. Christensen; F. M. Aarestrup; T. M. Phu und A. Dalsgaard (2015). Identification and antimicrobial resistance of bacteria isolated from probiotic products used in shrimp culture. *PLoS One*. **10**(7): 1-21.
- Nordstrom, J. L.; M. C. Vickery; G. M. Blackstone; S. L. Murray und A. DePaola (2007). Development of a multiplex real-time PCR assay with an internal amplification control for the detection of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* bacteria in oysters. *Appl Environ Microbiol*. **73**(18): 5840-5847.
- Norhana, M. N. W.; S. E. Poole; H. C. Deeth und G. A. Dykes (2010). Prevalence, persistence and control of *Salmonella* and *Listeria* in shrimp and shrimp products: a review. *Food Control*. **21**(4): 343-361.
- Noriega-Orozco, L.; E. Acedo-Félix; I. Higuera-Ciapara; R. Jiménez-Flores und R. Cano (2007). Pathogenic and non pathogenic *Vibrio* species in aquaculture shrimp ponds. *Rev Latinoam Microbiol*. **49**(3-4): 60-67.
- Novick, R. P. (1987). Plasmid incompatibility. *Microbiol Rev*. **51**(4): 381-395.
- Nunan, L.; D. V. Lightner; C. Pantoja und S. Gomez-Jimenez (2014). Detection of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in Mexico. *Dis Aquat Organ*. **111**(1): 81-86.
- Oh, E. G.; K. T. Son; H. Yu; T. S. Lee; H. J. Lee; S. Shin; J. Y. Kwon; K. Park und J. Kim (2011). Antimicrobial resistance of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio alginolyticus* strains isolated from farmed fish in Korea from 2005 through 2007. *J Food Prot*. **74**(3): 380-386.
- OIE (2009). Methods for disinfection of aquaculture establishments. In: Manual of diagnostic tests for aquatic animals 2009. OIE.
- Okada, N.; T. Iida; K. S. Park; N. Goto; T. Yasunaga; H. Hiyoshi; S. Matsuda; T. Kodama und T. Honda (2009). Identification and characterization of a novel type III secretion system in *trh*-positive *Vibrio parahaemolyticus* strain TH3996 reveal genetic lineage and diversity of pathogenic machinery beyond the species level. *Infect Immun*. **77**(2): 904-913.
- Okoh, A. I. und E. O. Igbinosa (2010). Antibiotic susceptibility profiles of some *Vibrio* strains isolated from wastewater final effluents in a rural community of the Eastern Cape Province of South Africa. *BMC Microbiol*. **10**(143): 1-6.
- Okuda, J.; M. Ishibashi; E. Hayakawa; T. Nishino; Y. Takeda; A. K. Mukhopadhyay; S. Garg; S. K. Bhattacharya; G. B. Nair und 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**(12): 3150-3155.
- Oliver, J. D. (1993). Formation of viable but nonculturable cells. In: Starvation in bacteria Springer US.
- Oliver, J. D. (1999). The viable but nonculturable state and cellular resuscitation. *Microbial biosystems: new frontiers. Proceedings of the 8th international symposium on microbial ecology*. Halifax, Canada: Atlantic Canada Society for Microbial Ecology.

- Oliver, J. D. (2005a). *Vibrio vulnificus*. In: Oceans and health: pathogens in the marine environment Springer US.
- Oliver, J. D. (2005b). Wound infections caused by *Vibrio vulnificus* and other marine bacteria. *Epidemiol Infect.* **133**(3): 383-391.
- Oliver, J. D. (2010). Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol Rev.* **34**(4): 415-425.
- Oliver, J. D.; F. Hite; D. McDougald; N. L. Andon und L. M. Simpson (1995). Entry into, and resuscitation from, the viable but nonculturable state by *Vibrio Vulnificus* in an estuarine environment. *Appl Environ Microb.* **61**(7): 2624-2630.
- Oliver, J. D.; J. E. Wear; M. B. Thomas; M. Warner und K. Linder (1986). Production of extracellular enzymes and cytotoxicity by *Vibrio vulnificus*. *Diagn Microbiol Infect Dis.* **5**(2): 99-111.
- Onifade, T. J.; R. Hutchinson; K. Van Zile; D. Bodager; R. Baker und C. Blackmore (2011). Toxin producing *Vibrio cholerae* O75 outbreak, United States, march to april 2011. *Euro Surveill.* **16**(20): 1-3.
- Orruño, M.; I. Garaizabal; I. Arana und I. Barcina (2013). Persistence and dissemination of antimicrobial resistances in aquatic systems. In: Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education. Formatex Research Center.
- Ottaviani, D.; I. Bacchiocchi; L. Masini; F. Leoni; A. Carraturo; M. Giammarioli und G. Sbaraglia (2001). Antimicrobial susceptibility of potentially pathogenic halophilic Vibrios isolated from seafood. *Int J Antimicrob Agents.* **18**(2): 135-140.
- Ottaviani, D.; F. Leoni; E. Rocchegiani; R. Mioni; A. Costa; S. Virgilio; L. Serracca; D. Bove; C. Canonico; A. Di Cesare; L. Masini; S. Potenziani; G. Caburlotto; V. Ghidini und M. M. Lleo (2013). An extensive investigation into the prevalence and the genetic and serological diversity of toxigenic *Vibrio parahaemolyticus* in Italian marine coastal waters. *Environ Microbiol.* **15**(5): 1377-1386.
- Ottaviani, D.; F. Leoni; E. Rocchegiani; S. Santarelli; L. Masini; V. Di Trani; C. Canonico; A. Pianetti; L. Tega und A. Carraturo (2009). Prevalence and virulence properties of non-O1 non-O139 *Vibrio cholerae* strains from seafood and clinical samples collected in Italy. *Int J Food Microbiol.* **132**(1): 47-53.
- Ottaviani, D.; F. Leoni; R. Serra; L. Serracca; L. Decastelli; E. Rocchegiani; L. Masini; C. Canonico; G. Talevi und A. Carraturo (2012). Non-toxigenic *Vibrio parahaemolyticus* strains causing acute gastroenteritis. *J Clin Microbiol.* **50**(12): 4141-4143.
- Oxoid Limited (2001-2014). Cholera medium TCBS.
http://www.oxoid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM0333&org=146&c=UK&lang=EN Abgerufen am: 02.03.2014
- Padlan, P. G. (undatiert). Pond culture: pond culture of penaeid shrimp.
<http://www.fao.org/docrep/field/003/AC179E/AC179E00.htm> Abgerufen am: 07.07.2015
- PAHO (1991). Cholera situation in the Américas. *Epidemiol. Bull.* **12**: 1-4.
- Paranjpye, R.; O. S. Hamel; A. Stojanovski und M. Liermann (2012). Genetic diversity of clinical and environmental *Vibrio parahaemolyticus* strains from the Pacific Northwest. *Appl Environ Microbiol.* **78**(24): 8631-8638.
- Park, K. S.; T. Ono; M. Rokuda; M. H. Jang; T. Iida und T. Honda (2004a). Cytotoxicity and enterotoxicity of the thermostable direct hemolysin-deletion mutants of *Vibrio parahaemolyticus*. *Microbiol Immunol.* **48**(4): 313-318.

- Park, K. S.; T. Ono; M. Rokuda; M. H. Jang; K. Okada; T. Iida und T. Honda (2004b). Functional characterization of two type III secretion systems of *Vibrio parahaemolyticus*. *Infect Immun.* **72**(11): 6659-6665.
- Park, Y. H.; S. Y. Hwang; M. K. Hong und K. H. Kwon (2012). Use of antimicrobial agents in aquaculture. *Rev Sci Tech.* **31**(1): 189-197.
- Parveen, S.; K. A. Hettiarachchi; J. C. Bowers; J. L. Jones; M. L. Tamplin; R. McKay; W. Beatty; K. Brohawn; L. V. Dasilva und A. Depaola (2008). Seasonal distribution of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in Chesapeake Bay oysters and waters. *Int J Food Microbiol.* **128**(2): 354-361.
- Paz, S.; N. Bisharat; E. Paz; O. Kidar und D. Cohen (2007). Climate change and the emergence of *Vibrio vulnificus* disease in Israel. *Environ Res.* **103**(3): 390-396.
- Pedersen, L. F. und P. B. Pedersen (2012). Hydrogen peroxide application to a commercial recirculating aquaculture system. *Aquac Eng.* **46**(1): 40-46.
- Peterson, K. M. (2002). Expression of *Vibrio cholerae* virulence genes in response to environmental signals. *Curr Issues Intest Microbiol.* **3**(2): 29-38.
- Petsaris, O.; J. B. Nousbaum; M. L. Quilici; G. Le Coadou; C. Payan und M. L. Abalain (2010). Non-O1, non-O139 *Vibrio cholerae* bacteraemia in a cirrhotic patient. *J Med Microbiol.* **59**(10): 1260-1262.
- Poblete, U. R.; A. H. Andresen; C. C. Pérez; L. A. Dougnac; P. O. Díaz und F. V. Tomicic (2002). Septic shock caused by *Vibrio vulnificus*. Report of one case. *Rev. méd. Chile.* **130**(7): 787-791.
- Pollitzer, R. (1959). History of the disease. In: Cholera. WHO.
- Poupard, C. J. (1978). Therapy of fish diseases. In: Fish pathology. Bailliere Tindall.
- Pruzzo, C.; A. Huq; R. R. Colwell und G. Donelli (2005). Pathogenic *Vibrio* species in the marine and estuarine environment. In: Oceans and health: pathogens in the marine environment. Springer US.
- Qadri, F.; N. R. Chowdhury; Y. Takeda und G. B. Nair (2005). *Vibrio parahaemolyticus*—seafood safety and associations with higher organisms. In: Oceans and health: pathogens in the marine environment. Springer US.
- Radu, S.; N. Elhadi; Z. Hassan; G. Rusul; S. Lihan; N. Fifadara; Yuherman und E. Purwati (1998). Characterization of *Vibrio vulnificus* isolated from cockles (*Anadara granosa*): antimicrobial resistance, plasmid profiles and random amplification of polymorphic DNA analysis. *FEMS Microbiol Lett.* **165**(1): 139-143.
- Ramamurthy, T.; P. K. Bag; A. Pal; S. K. Bhattacharya; M. K. Bhattacharya; T. Shimada; T. Takeda; T. Karasawa; H. Kurazono; Y. Takeda und et al. (1993). Virulence patterns of *Vibrio cholerae* non-O1 strains isolated from hospitalised patients with acute diarrhoea in Calcutta, India. *J Med Microbiol.* **39**(4): 310-317.
- Ramamurthy, T. und G. B. Nair (2007). Foodborne pathogenic Vibrios. In: Foodborne diseases. Humana Press.
- Rasco, B. und M. Ovissipour (2015). Electrolyzed water applications in aquaculture and the seafood industry. *J Aquac Res Dev.* **6**(1): 1-2.
- Raszl, S. M.; B. A. Froelich; C. R. Vieira; A. D. Blackwood und R. T. Noble (2016). *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* in South America: water, seafood and human infections. *J Appl Microbiol.* **121**(5): 1201-1222.

- Reboucas, R. H.; O. V. de Sousa; A. S. Lima; F. R. Vasconcelos; P. B. de Carvalho und R. H. Vieira (2011). Antimicrobial resistance profile of *Vibrio* species isolated from marine shrimp farming environments (*Litopenaeus vannamei*) at Ceara, Brazil. *Environ Res.* **111**(1): 21-24.
- Reidl, J. und K. E. Klose (2002). *Vibrio cholerae* and cholera: out of the water and into the host. *FEMS Microbiol Rev.* **26**(2): 125-139.
- Reilly, A. und F. Käferstein (1997). Food safety hazards and the application of the principles of the hazard analysis and critical control point (HACCP) system for their control in aquaculture production. *Aquac Res.* **28**(10): 735-752.
- Reilly, G. D.; C. A. Reilly; E. G. Smith und C. Baker-Austin (2011). *Vibrio alginolyticus*-associated wound infection acquired in British waters, Guernsey, July 2011. *Euro Surveill.* **16**(42): 1-2.
- Rengpipat, S.; W. Phianphak; S. Piyatiratitivorakul und P. Menasveta (1998). Effects of a probiotic bacterium on black tiger shrimp *Penaeus monodon* survival and growth. *Aquaculture.* **167**(3-4): 301-313.
- Rengpipat, S.; S. Rukpratanporn; S. Piyatiratitivorakul und P. Menasaveta (2000). Immunity enhancement in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) by a probiont bacterium (*Bacillus* S11). *Aquaculture.* **191**(4): 271-288.
- Rhodes, G.; G. Huys; J. Swings; P. McGann; M. Hiney; P. Smith und R. W. Pickup (2000). Distribution of oxytetracycline resistance plasmids between aeromonads in hospital and aquaculture environments: Implication of Tn 1721 in dissemination of the tetracycline resistance determinant Tet A. *Appl Environ Microbiol.* **66**(9): 3883-3890.
- Rico, A.; T. M. Phu; K. Satapornvanit; J. Min; A. M. Shahabuddin; P. J. G. Henriksson; F. J. Murray; D. C. Little; A. Dalsgaard und P. J. van den Brink (2013). Use of veterinary medicines, feed additives and probiotics in four major internationally traded aquaculture species farmed in Asia. *Aquaculture.* **412**: 231-243.
- Rippey, S. R. (1994). Infectious diseases associated with molluscan shellfish consumption. *Clin Microbiol Rev.* **7**(4): 419-425.
- Rivas, M.; M. L. Cacace; L. T. Ayala; A. Baschkier; E. Miliwebsky und M. I. Caffer (1996). [Cases of gastroenteritis associated to *Vibrio cholerae* no 01 in Oran, Salta]. *Rev Argent Microbiol.* **28**(4): 163-169.
- Rivera, I. N.; E. K. Lipp; A. Gil; N. Choopun; A. Huq und R. R. Colwell (2003). Method of DNA extraction and application of multiplex polymerase chain reaction to detect toxigenic *Vibrio cholerae* O1 and O139 from aquatic ecosystems. *Environ Microbiol.* **5**(7): 599-606.
- RKI (2014). Mikrobiologische Methoden.
<https://ars.rki.de/Content/Project/Methodology/Standard.aspx> Abgerufen am: 28.05.2014
- Robert-Pillot, A.; S. Copin; M. Gay; P. Malle und M. L. Quilici (2010). Total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in shrimp: fast and reliable quantification by real-time PCR. *Int J Food Microbiol.* **143**(3): 190-197.
- Robert-Pillot, A.; S. Copin; C. Himber; M. Gay und M. L. Quilici (2014). Occurrence of the three major *Vibrio* species pathogenic for human in seafood products consumed in France using real-time PCR. *Int J Food Microbiol.* **189**(2): 75-81.
- Rodríguez, J.; Y. Espinosa; F. Echeverría; G. Cárdenas; R. Román und S. Stern (2007). Exposure to probiotics and β -1,3/1,6-glucans in larviculture modifies the immune

- response of *Penaeus vannamei* juveniles and both the survival to White Spot Syndrome Virus challenge and pond culture. *Aquaculture*. **273**(4): 405-415.
- Rodriguez Loaiza, N. S. und M. G. Sandoval Romero (2010). Caracterización de bacterias marinas presentes en suelos de piscinas camaroneras en tiempo de post-cosecha y pre-siembra, luego de la preparación de suelos mediante el metodo de aplicación de fuentes. *Escuela Superior Politécnica del Litoral*. 61.
- Rodriguez-Mozaz, S. und H. S. Weinberg (2010). Meeting report: pharmaceuticals in water-an interdisciplinary approach to a public health challenge. *Environ Health Perspect*. **118**(7): 1016-1020.
- Romero, J.; C. G. Feijoó und P. Navarrete (2012). Antibiotics in aquaculture-use, abuse and alternatives. In: *Health and environment in aquaculture*. In Tech.
- Roque, A.; A. Molina-Aja; C. Bolan-Mejia und B. Gomez-Gil (2001). In vitro susceptibility to 15 antibiotics of *Vibrios* isolated from penaeid shrimps in Northwestern Mexico. *Int J Antimicrob Agents*. **17**(5): 383-387.
- Rosenberry, B. (2015). About shrimp farming. <http://www.shrimpnews.com/FreeReportsFolder/GeneralInformationFolder/About.html> Abgerufen am: 23.11.2015
- Rozemeijer, W.; L. A. Korswagen; A. E. Voskuyl und A. E. Budding (2009). *Vibrio cholerae* non-O1 non-O139 infection in an immunocompromised patient returning from Spain, july 2009. *Euro Surveill*. **14**(32): 1-2.
- Ruwandeeepika, H.; T. Defoirdt; P. Bhowmick; I. Karunasagar; I. Karunasagar und P. Bossier (2011). In vitro and in vivo expression of virulence genes in *Vibrio* isolates belonging to the *Harveyi* clade in relation to their virulence towards gnotobiotic brine shrimp (*Artemia franciscana*). *Environmental Microbiology*. **13**(2): 506-517.
- Ruwandeeepika, H.; T. Jayaweera; P. Bhowmick; I. Karunasagar; P. Bossier und T. Defoirdt (2012). Pathogenesis, virulence factors and virulence regulation of *Vibrios* belonging to the *Harveyi* clade. *Reviews in Aquaculture*. **4**(2): 59-74.
- Sack, D. A.; R. B. Sack; G. B. Nair und A. K. Siddique (2004). Cholera. *Lancet*. **363**(9404): 223-233.
- Sakazaki, R. (1969). Halophilic *Vibrio* infections. In: *Foodborne infections and intoxications*. Academic Press.
- Samocha, T. M.; A. L. Lawrence; C. A. Collins; F. L. Castille; W. A. Bray; C. J. Davies; P. G. Lee und G. F. Wood (2004). Production of the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, in high-density greenhouse enclosed raceways using low-salinity groundwater. *Journal of Applied Aquaculture* **15**(3-4): 1-19.
- Santos, C. A. M. L. d. und R. H. S. F. Vieira (2013). Bacteriological hazards and risks associated with seafood consumption in Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*. **55**(4): 219-228.
- Sarkar, B. L.; T. S. Bhowmick; M. Das; K. Rajendran und G. B. Nair (2011). Phage types of *Vibrio cholerae* O1 and O139 in the past decade in India. *Jpn J Infect Dis*. **64**(4): 312-315.
- Schassan, H. H. (1978). Die antibakterielle Effektivität von Cefamandol im Vergleich mit anderen Antibiotika. *Infection*. **6**(2): 207-218.
- Schmidt, L. J.; M. P. Gaikowski und W. H. Gingerich (2006). Environmental assessment for the use of hydrogen peroxide in aquaculture for treating external fungal and bacterial diseases of cultured fish and fish eggs. U.S. Geological Survey.

- Schwarz, S.; C. Kehrenberg; B. Doublet und A. Cloeckert (2004). Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol. *FEMS Microbiol Rev.* **28**(5): 519-542.
- SCVPH (2001). Opinion of the scientific committee on veterinary measures relating to public health on *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus* (in raw and undercooked seafood). European Commission.
- Shamsuzzaman, M. und T. K. Biswas (2012). Aqua chemicals in shrimp farm: A study from south-west coast of Bangladesh. *Egypt J Aquat Res.* **38**: 275-285.
- Shandera, W. X.; J. M. Johnston; B. R. Davis und P. A. Blake (1983). Disease from infection with *Vibrio mimicus*, a newly recognized *Vibrio* species-clinical characteristics and epidemiology. *Ann Intern Med.* **99**(2): 169-171.
- Shapiro, R. L.; S. Altekruse; L. Hutwagner; R. Bishop; R. Hammond; S. Wilson; B. Ray; S. Thompson; R. V. Tauxe und P. M. Griffin (1998). The role of Gulf Coast oysters harvested in warmer months in *Vibrio vulnificus* infections in the United States, 1988-1996. *Vibrio Working Group. J Infect Dis.* **178**(3): 752-759.
- Sharma, A. und A. N. Chaturvedi (2006). Prevalence of virulence genes (*ctxA*, *stn*, *OmpW* and *tcpA*) among non-O1 *Vibrio cholerae* isolated from fresh water environment. *Int J Hyg Environ Health.* **209**(6): 521-526.
- Shaw, K. S.; R. E. Rosenberg Goldstein; X. He; J. M. Jacobs; B. C. Crump und A. R. Sapkota (2014). Antimicrobial susceptibility of *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus* recovered from recreational and commercial areas of Chesapeake Bay and Maryland Coastal Bays. *PLoS One.* **9**(2): 1-11.
- Shimada, T.; G. B. Nair; B. C. Deb; M. J. Albert; R. B. Sack und Y. Takeda (1993). Outbreaks of *Vibrio cholerae* non-O1 in India and Bangladesh [letter]. *Lancet.* **341**: 1347.
- Shinoda, S.; T. Nakagawa; L. Shi; K. Bi; Y. Kanoh; K. Tomochika; S. Miyoshi und T. Shimada (2004). Distribution of virulence-associated genes in *Vibrio mimicus* isolates from clinical and environmental origins. *Microbiol Immunol.* **48**(7): 547-551.
- Sidhu, M. S.; E. Heir; T. Leegaard; K. Wiger und A. Holck (2002). Frequency of disinfectant resistance genes and genetic linkage with beta-lactamase transposon Tn552 among clinical *staphylococci*. *Antimicrob Agents Chemother.* **46**(9): 2797-2803.
- Sidhu, M. S.; E. Heir; H. Sorum und A. Holck (2001). Genetic linkage between resistance to quaternary ammonium compounds and beta-lactam antibiotics in food-related *Staphylococcus* spp. *Microb Drug Resist.* **7**(4): 363-371.
- Sieffert, M. (2003). Nachweis und Differenzierung von *Vibrio* sp. in Krusten- und Schalentieren und Erzeugnissen daraus unter besonderer Berücksichtigung der routinemäßigen Diagnostik. Ludwig-Maximilians-Universität München. 150.
- Sieffert, M. und A. Stolle (2002). Nachweis und Differenzierung von *Vibrio* spp. in Krusten- und Schalentieren. *Bundesgesundheitsbl Gesundheitsforsch Gesundheitsschutz.* **45**(6): 507-513.
- Simpson, L. M.; V. K. White; S. F. Zane und J. D. Oliver (1987). Correlation between virulence and colony morphology in *Vibrio vulnificus*. *Infect Immun.* **55**(1): 269-72.
- Singh, D. V.; S. R. Isac und R. R. Colwell (2002). Development of a hexaplex PCR assay for rapid detection of virulence and regulatory genes in *Vibrio cholerae* and *Vibrio mimicus*. *J Clin Microbiol.* **40**(11): 4321-4324.

- Sirikharin, R.; S. Taengchaiyaphum; K. Sritunyalucksana; S. Thitamadee; T. W. Flegel; R. Mavichak und P. Proespraiwong (2014). "A new and improved PCR method for detection of AHPND bacteria." <http://www.enaca.org/modules/news/article.php>.
- Sobrinho, P. D. C.; M. T. Destro; B. D. G. M. Franco und M. Landgraf (2010). Correlation between environmental factors and prevalence of *Vibrio parahaemolyticus* in oysters harvested in the southern coastal area of Sao Paulo State, Brazil. *Appl Environ Microb.* **76**(4): 1290-1293.
- Son, M. S.; C. J. Megli; G. Kovacicova; F. Qadri und R. K. Taylor (2011). Characterization of *Vibrio cholerae* O1 El Tor biotype variant clinical isolates from Bangladesh and Haiti, including a molecular genetic analysis of virulence genes. *J Clin Microbiol.* **49**(11): 3739-3749.
- Sonnenholzner, S.; L. Massaut; C. Saldias; J. Calderón und C. E. Boyd (2002). Case Studies of ecuadorian Shrimp Farming. Report prepared under the World Bank, NACA, WWF and FAO Consortium Program on Shrimp Farming and the Environment. Work in Progress for Public Discussion. Consortium. 55.
- Srinivasan, P. und P. Ramasamy (2009). Occurrence, distribution and antibiotic resistance patterns of *Vibrio* species associated with viral diseased Shrimp of South Indian aquaculture environment. *International Journal of Agriculture Sciences.* **1**(2): 1-10.
- Statista (2015). Verordnungsvolumen und durchschnittliche Kosten von Antibiotika in der gesetzlichen Krankenversicherung (GKV) nach Wirkstoffen im Jahr 2011 <http://de.statista.com/statistik/daten/studie/371161/umfrage/verordnungsvolumen-und-durchschnittliche-kosten-von-antibiotika-nach-wirkstoffen/> Abgerufen am: 27.11.2015
- Stentiford, G. D.; D. M. Neil; E. J. Peeler; J. D. Shields; H. J. Small; T. W. Flegel; J. M. Vlak; B. Jones; F. Morado; S. Moss; J. Lotz; L. Bartholomay; D. C. Behringer; C. Hauton und D. V. Lightner (2012). Disease will limit future food supply from the global crustacean fishery and aquaculture sectors. *J Invertebr Pathol.* **110**(2): 141-157.
- Stern, S. und S. Sonnenholzner (2010). Semi-intensive shrimp culture, the history of shrimp farming in Ecuador. In: *The shrimp book*. Nottingham University Press.
- Stickney, R. R. und D. T. Granvil (2012). History of aquaculture. In: *Aquaculture production systems*. John Wiley & Sons.
- Strom, M. S. und R. N. Paranjpye (2000). Epidemiology and pathogenesis of *Vibrio vulnificus*. *Microbes Infect.* **2**(2): 177-188.
- Strumbelj, I.; I. Prelog; T. Kotar; D. Dovecar; T. Petras und M. Socan (2005). A case of *Vibrio cholerae* non-O1, non-O139 septicaemia in Slovenia, imported from Tunisia, July 2005. *Euro Surveill.* **10**(10): E051020 6.
- Su, Y. C. und C. Liu (2007). *Vibrio parahaemolyticus*: a concern of seafood safety. *Food Microbiol.* **24**(6): 549-558.
- Subramanya, S. B.; V. M. Rajendran; P. Srinivasan; N. S. Nanda Kumar; B. S. Ramakrishna und H. J. Binder (2007). Differential regulation of cholera toxin-inhibited Na-H exchange isoforms by butyrate in rat ileum. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* **293**(4): 857-863.
- Sudha, S.; C. Mridula; R. Silvester und A. A. M. Hatha (2014). Prevalence and antibiotic resistance of pathogenic Vibrios in shellfishes from Cochin market. *Indian J Geomarine Sci.* **43**(5): 815-824.

- Sudheesh, P. S. und H. S. Xu (2001). Pathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus* in tiger prawn *Penaeus monodon* Fabricius: possible role of extracellular proteases. *Aquaculture*. **196**(1-2): 37-46.
- Sugita, H.; N. Matsuo; Y. Hirose; M. Iwato und Y. Deguchi (1997). *Vibrio* sp. strain NM 10, isolated from the intestine of a Japanese coastal fish, has an inhibitory effect against *Pasteurella piscicida*. *Appl Environ Microbiol*. **63**(12): 4986-4989.
- Summerfelt, S. T. (2003). Ozonation and UV irradiation - an introduction and examples of current applications. *Aquac Eng*. **28**(1-2): 21-36.
- Szumilas, M. (2010). Explaining odds ratios. *J Can Acad Child Adolesc Psychiatry*. **19**(3): 227-229.
- Tarr, C. L.; J. S. Patel; N. D. Pühr; E. G. Sowers; C. A. Bopp und N. A. Strockbine (2007). Identification of *Vibrio* isolates by a multiplex PCR assay and *rpoB* sequence determination. *J Clin Microbiol*. **45**(1): 134-140.
- Tauxe, R. V.; E. D. Mintz und R. E. Quick (1995). Epidemic cholera in the new world: translating field epidemiology into new prevention strategies. *Emerg Infect Dis*. **1**(4): 141-146.
- Tendencia, E. A. und L. D. de la Pena (2001). Antibiotic resistance of bacteria from shrimp ponds. *Aquaculture*. **195**(3-4): 193-204.
- Teo, J. W. P.; A. Suwanto und C. L. Poh (2000). Novel beta-lactamase genes from two environmental isolates of *Vibrio harveyi*. *Antimicrob Agents Chemother*. **44**(5): 1309-1314.
- Tercero-Albuero, J. J.; H. Gonzalez-Marquez; E. Bonilla-Gonzalez; E. I. Quinones-Ramirez und C. Vazquez-Salinas (2014). Identification of capsule, biofilm, lateral flagellum, and type IV pili in *Vibrio mimicus* strains. *Microb Pathog*. **76**: 77-83.
- TFS (2007). Rising domestic consumption pulls in shrimp. <http://www.thefishsite.com/fishnews/4737/rising-domestic-consumption-pulls-in-shrimp/> Abgerufen am: 15.10.2015
- Thitamadee, S.; A. Prachumwat; J. Srisala; P. Jaroenlak; P. V. Salachan; K. Sritunyalucksana; T. W. Flegel und O. Itsathitphaisarn (2016). Review of current disease threats for cultivated penaeid shrimp in Asia. *Aquaculture*. **452**(1): 69-78.
- Thompson, F. L.; T. Iida und J. Swings (2004). Biodiversity of Vibrios. *Microbiol Mol Biol Rev*. **68**(3): 403-431.
- Thompson, J.; S. Gregory; S. Plummer und A. F. Rowley (2010). An in vitro and in vivo assessment of the potential of *Vibrio* spp. as probiotics for the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *J Appl Microbiol*. **109**(4): 1177-1187
- Thompson, M. (2014). Ecuadorian farmed shrimp seafood watch report. Monterey Bay Aquarium Seafood Watch.
- Threlfall, E. J.; B. Said und B. Rowe (1993). Emergence of multiple drug resistance in *Vibrio cholerae* O1 El Tor from Ecuador. *Lancet*. **342**(8880): 1173.
- Torgersen, Y. und T. Hastein (1995). Disinfection in aquaculture. *Rev Sci Tech Off Int Epiz*. **14**(2): 419-434.
- Tran, L.; L. Nunan; R. M. Redman; L. L. Mohny; C. R. Pantoja; K. Fitzsimmons und D. V. Lightner (2013). Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp. *Dis Aquat Organ*. **105**(1): 45-55.

- Tran, L. H.; K. Fitzsimmons und D. V. Lightner (2014). AHPND/EMS: From the academic science perspective to the production point of view. *Aqua Culture Asia Pacific*. **10**(2): 14-18.
- Unger, J. (2014). Reporte de auditoría camaronera Cachugrán, operadora y procesadora de productos marinos Omarsa S.A. MOswiss AG (IMO) Fisheries & Aquaculture.
- Unterweger, D.; M. Kitaoka; S. T. Miyata; V. Bachmann; T. M. Brooks; J. Moloney; O. Sosa; D. Silva; J. Duran-Gonzalez; D. Provenzano und S. Pukatzki (2012). Constitutive type VI secretion system expression gives *Vibrio cholerae* intra- and interspecific competitive advantages. *PLoS One*. **7**(10): e48320.
- Utsalo, S. J.; F. O. Eko und E. O. Antia-Obong (1992). Features of cholera and *Vibrio parahaemolyticus* diarrhoea endemicity in Calabar, Nigeria. *Eur J Epidemiol*. **8**(6): 856-860.
- Vandenbergh, J.; L. Verdonck; R. Robles-Arozarena; G. Rivera; A. Bolland; M. Balladares; B. Gomez-Gil; J. Calderon; P. Sorgeloos und J. Swings (1999). Vibrios associated with *Litopenaeus vannamei* larvae, postlarvae, broodstock, and hatchery probionts. *Appl Environ Microbiol*. **65**(6): 2592-2597.
- Vandijck, D. M.; M. Depaemelaere; S. O. Labeau; P. O. Depuydt; L. Annemans; F. M. Buyle; S. Oeyen; K. E. Colpaert; R. P. Peleman; S. I. Blot und J. M. Decruyenaere (2008). Daily cost of antimicrobial therapy in patients with intensive care unit-acquired, laboratory-confirmed bloodstream infection. *Int J Antimicrob Agents*. **31**(2): 161-165.
- Vasudevan, P.; P. Marek; S. Daigle; T. Hoagland und K. S. Venkitanarayanan (2002). Effect of chilling and freezing on survival of *Vibrio parahaemolyticus* on fish fillets. *J Food Saf*. **22**(4): 209-217.
- Velazquez-Roman, J.; N. Leon-Sicairos; L. de Jesus Hernandez-Diaz und A. Canizalez-Roman (2013). Pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 on the American continent. *Front Cell Infect Microbiol*. **3**(110): 1-14.
- Verschuere, L.; G. Rombaut; P. Sorgeloos und W. Verstraete (2000). Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiol Mol Biol Rev*. **64**(4): 655-671.
- Vezzulli, L.; I. Brettar; E. Pezzati; P. C. Reid; R. R. Colwell; M. G. Hofle und C. Pruzzo (2011). Long-term effects of ocean warming on the prokaryotic community: evidence from the Vibrios. *ISME J*. **1**(6): 21-30.
- Vezzulli, L.; R. R. Colwell und C. Pruzzo (2013). Ocean warming and spread of pathogenic Vibrios in the aquatic environment. *Microb Ecol*. **65**(4): 817-825.
- Vezzulli, L.; C. Pruzzo; A. Huq und R. R. Colwell (2010). Environmental reservoirs of *Vibrio cholerae* and their role in cholera. *Environ Microbiol Rep*. **2**(1): 27-33.
- Vieira, F. D. N.; F. S. Pedrotti und C. C. B. Neto (2007). Lactic-acid bacteria increase the survival of marine shrimp, *Litopenaeus vannamei*, after infection with *Vibrio harveyi*. *Braz J Oceanogr* **55**(4): 251-255.
- Villacrés, D.; L. I. Díaz; P. Herrera; F. Naranjo; A. C. Vargas; E. Sierra; D. Freire; E. Palacios; J. Paez und J. Zurita (2013). Sepsis por *Vibrio vulnificus*: reporte de dos casos en ciudades de altura en el Ecuador. *Rev Med Vozandes*. **24**: 53-58.
- Vinod, M. G.; M. M. Shivu; K. R. Umesha; B. C. Rajeeva; G. Krohne; I. Karunasagar und I. Karunasagar (2006). Isolation of *Vibrio harveyi* bacteriophage with a potential for biocontrol of luminous Vibriosis in hatchery environments. *Aquaculture*. **255**(1-4): 117-124.

- Waldor, M. K. und J. J. Mekalanos (1996). Lysogenic conversion by a filamentous phage encoding cholera toxin. *Science*. **272**(5270): 1910-1914.
- Walker, P. J. und C. V. Mohan (2009). Viral disease emergence in shrimp aquaculture: origins, impact and the effectiveness of health management strategies. *Reviews in Aquaculture*. **1**(2): 125-154.
- Walker, P. J. und J. R. Winton (2010). Emerging viral diseases of fish and shrimp. *Vet Res*. **41**(6): 51-74.
- Wang, F.; L. Jiang; Q. Yang; F. Han; S. Chen; S. Pu; A. Vance und B. Ge (2011). Prevalence and antimicrobial susceptibility of major foodborne pathogens in imported seafood. *J Food Prot*. **74**(9): 1451-1461.
- Wang, Y. B.; Z. R. Xu und M. S. Xia (2005). The effectiveness of commercial probiotics in Northern white shrimp *Penaeus vannamei* ponds. *Fish Sci*. **71**(5): 1036-1041.
- Weber, G. G. und K. E. Klose (2011). The complexity of ToxT-dependent transcription in *Vibrio cholerae*. *Indian J Med Res*. **133**: 201-206.
- Weber, J. T.; E. D. Mintz; R. Canizares; A. Semiglia; I. Gomez; R. Sempertegui; A. Davila; K. D. Greene; N. D. Pühr; D. N. Cameron und et al. (1994). Epidemic cholera in Ecuador: multidrug-resistance and transmission by water and seafood. *Epidemiol Infect*. **112**(1): 1-11.
- Werckenthin, C.; A. Bottner; H. M. Hafez; K. Hartmann; M. Kaske; C. Kehrenberg; M. Kietzmann; D. Klarmann; G. Klein; P. Krabisch; T. Kuhn; G. Luhofer; A. Richter; B. Schulz; S. Schwarz; C. Sigge; W. Traeder; K. H. Waldmann und J. Wallmann (2005). Cross-resistance between antimicrobial agents used in veterinary medicine: molecular background and practical consequences for susceptibility testing. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*. **118**(11-12): 471-480.
- Werckenthin, C. und S. Schwarz (2003). Kreuzresistenzen: Beurteilung von Antibiogrammen, Auswahl von antimikrobiellen Wirkstoffen für die in-vitro Empfindlichkeitsprüfung und molekulare Grundlagen. 22. Arbeits- und Fortbildungstagung Bakteriologie des Arbeitskreises Veterinärmedizinischer Infektionsdiagnostik (AVID) der DVG. Staffelstein, Deutschland: DVG.
- West, P. A. (1989). The human pathogenic Vibrios - a public health update with environmental perspectives. *Epidemiol Infect*. **103**(1): 1-34.
- WHO (2009). Cholera: global surveillance summary, 2008. *Wkly Epidemiol Rec*. **84**(31): 309-324.
- WHO (2010). Cholera vaccines: WHO position paper. *Wkly Epidemiol Rec*. **85**(13): 117-128.
- WHO (2011a). Cholera 2010. *Wkly Epidemiol Rec*. **86**(31): 325-340.
- WHO (2011b). Microbial fact sheets - *Vibrio*. In: Guidelines for drinking-water quality - Fourth edition. WHO.
- WHO (2014). Antimicrobial resistance: global report on surveillance. WHO.
- WHO (2015). Cholera. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs107/en/>
Abgerufen am: 24.10.2015
- Williams, S. T. und J. C. Vickers (1986). The ecology of antibiotic production. *Microb Ecol*. **12**(1): 43-52.
- Wong, H. C.; S. H. Liu; L. W. Ku; I. Y. Lee; T. K. Wang; Y. S. Lee; C. L. Lee; L. P. Kuo und D. Y. Shih (2000). Characterization of *Vibrio parahaemolyticus* isolates obtained from

foodborne illness outbreaks during 1992 through 1995 in Taiwan. *J Food Prot.* **63**(7): 855-986, 900-906.

Woodring, J.; A. Srijan; P. Puripunyakom; W. Oransathid; B. Wongstitwilairoong und C. Mason (2012). Prevalence and antimicrobial susceptibilities of *Vibrio*, *Salmonella*, and *Aeromonas* isolates from various uncooked seafoods in Thailand. *J Food Prot.* **75**(1): 41-47.

Wright, G. D. (2007). The antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity. *Nat Rev Microbiol.* **5**(3): 175-186.

Xiong, P.; X. Peng; S. Wei; Y. Chen; H. Zhao; S. Tang und X. Wu (2014). [Virulence-related genes of *Vibrio alginolyticus* and its virulence in mice]. *Wei Sheng Wu Xue Bao.* **54**(1): 80-88.

Xu, M.; T. Iida; K. Yamamoto; Y. Takarada; T. Miwatani und T. Honda (1994a). Demonstration and characterization of simultaneous production of a thermostable direct hemolysin (TDH/I) and a TDH-related hemolysin (TRHx) by a clinically isolated *Vibrio parahaemolyticus* strain, TH3766. *Infect Immun.* **62**(1): 166-171.

Xu, M.; K. Yamamoto; T. Honda und X. Ming (1994b). Construction and characterization of an isogenic mutant of *Vibrio parahaemolyticus* having a deletion in the thermostable direct hemolysin-related hemolysin gene (*trh*). *J Bacteriol.* **176**(15): 4757-4760.

Yamasaki, S.; S. Garg; G. B. Nair und Y. Takeda (1999). Distribution of *Vibrio cholerae* O1 antigen biosynthesis genes among O139 and other non-O1 serogroups of *Vibrio cholerae*. *FEMS Microbiol Lett.* **179**(1): 115-121.

Yang, Y. T.; I. T. Chen; C. T. Lee; C. Y. Chen; S. S. Lin; L. I. Hor; T. C. Tseng; Y. T. Huang; K. Sritunyalucksana; S. Thitamadee; H. C. Wang und C. F. Lo (2014). Draft genome sequences of four strains of *Vibrio parahaemolyticus*, three of which cause Early Mortality Syndrome/Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease in shrimp in China and Thailand. *Genome Announc.* **2**(5): 1-2.

Yoshida, S.; M. Ogawa und Y. Mizuguchi (1985). Relation of capsular materials and colony opacity to virulence of *Vibrio vulnificus*. *Infect Immun.* **47**(2): 446-451.

Zanetti, S.; T. Spanu; A. Deriu; L. Romano; L. A. Sechi und G. Fadda (2001). In vitro susceptibility of *Vibrio* spp. isolated from the environment. *Int J Antimicrob Agents.* **17**(5): 407-409.

Zorriehzahra, M. J. und R. Banaederakhshan (2015). Early Mortality Syndrome (EMS) as new emerging threat in shrimp industry. *Adv Anim Vet Sci.* **3**(2): 64-72.

11 Anhang

Fragebogen zur Datenerhebung auf Shrimps-Aquakulturen, Spanisch

Cuestionario Camaroneras

Fecha:/...../.....

1. Nombre del Propietario: _____
2. Número de Empleados: _____
3. Tamaño de la Camaronera en hectáreas (ha): _____
4. Número total de estanques/piscinas: _____
5. Especies de camarón cultivados:
 - Penaeus monodon Penaeus vannamei Otro: _____
6. Origen del post larvas (Laboratorio):

7. Dias de cultivo de los camarones de la muestra: _____
8. Peso aproximado de camarón de la muestra: _____
9. Densidad de siembra: _____
10. Sistema de alimentación: Alimento comercial Alimentación de mezcla auto

11. Sistema de oxigenación del estanque/piscinas: _____
12. El uso de medicamentos veterinarios / antibióticos: _____
13. El uso de pro bióticos: _____
14. Sistema de calidad de control implementado: _____
15. Sistema „all-in, all-out“/ siempre en bloque aplicado o no: _____
16. Se realiza un análisis de laboratorio antes de introducir la larva en los estanques/piscinas:

17. Los tiempos de ciclo: _____
18. La producción en el año (en toneladas): _____
19. ¿El agua de los estanques es Agua de mar o agua dulce salado?
20. Valor pH del agua: _____
21. Salinidad del agua: _____
22. Temperatura: _____
23. Comentarios: _____

Fragenbogen zur Datenerhebung auf Shrimps-Aquakulturen, Deutsch

Fragebogen für Shrimpfarmen

Datum:/...../.....

1. Name des Inhabers: _____
2. Anzahl der Angestellten: _____
3. Größe der Aquakulturanlage in Hektar (ha): _____
4. Anzahl der Becken: _____
5. Kultivierte Shrimpspezies:
 Penaeus monodon *Penaeus vannamei* andere: _____
6. Herkunft der Larven (Larvenzuchtanlage):

7. : Kultivierungsdauer der beprobten Shrimps in Tagen: _____
8. Gewicht der beprobten Shrimps: _____
9. Aussaatdichte der Larven: _____
10. Fütterungssystem: Kommerzielles Futtermittel Selbst hergestelltes Futtermittel

11. Sauerstoffaustausch in den Zuchtbecken: _____
12. Verwendung von Arzneimitteln/Antibiotika: _____
13. Verwendung von Probiotika: _____
14. System der Qualitätskontrolle: _____
15. Anwendung eines "All-in. All-out"-Systems _____
16. Laboruntersuchungen der Larven vor der Aussaat:

17. Zykluszeiten: _____
18. Jahresproduktion in Tonnen: _____
19. Wasser der Zuchtbecken Meerwasser gesalzenes Süßwasser
20. pH-Wert des Wassers: _____
21. Salinität des Wassers: _____
22. Temperatur: _____
23. Kommentare: _____

Einfluss der Produktions- und Managementfaktoren auf das Vorkommen von *Vibrio* spp.

Tabelle 52. Einfluss verschiedener Produktions- und Managementfaktoren auf das Vorkommen von *Vibrio alginolyticus*

Produktionsfaktoren	Anzahl der Proben	Nachweis von <i>V. a.</i>	Prävalenz von <i>V. a.</i>	Odds Ratio (95 % Konfidenzintervall)	p-Wert
Larven/ha					
≥ 100.000	48	17	35,4 %	0,55 (0,27-1,11)	0,0942
< 100.000	106	53	50 %		
Antibiotika					
Ja	34	19	55,9 %	1,71 (0,80-3,69)	0,169
Nein	120	51	42,5 %		
pH-Wert*¹					
≤ 8	121	59	48,8 %	2,38 (0,71-8,00)	0,1614
> 8	14	4	28,6 %		

ha: Hektar; *¹ ausgewertet für 15 Aquakulturen (135 Becken)

Tabelle 53. Einfluss verschiedener Produktions- und Managementfaktoren auf das Vorkommen von *Vibrio cholerae*

Produktionsfaktoren	Anzahl der Proben	Nachweis von <i>V. c.</i>	Prävalenz von <i>V. c.</i>	Odds Ratio (95 % Konfidenzintervall)	p-Wert
Größe (ha)					
≥ 150	70	11	15,7 %	1,38 (0,55-3,47)	0,494
< 150	84	10	11,9 %		
Larven/ha					
≥ 100.000	48	6	12,5 %	0,87 (0,31-2,39)	0,7823
< 100.000	106	15	14,2 %		
Antibiotika					
Ja	34	8	23,5 %	2,53 (0,95-6,74)	0,063
Nein	120	13	10,8 %		
Probiotika					
Ja	146	21	14,4 %	2,91 (0,16-52,33)	0,4683
Nein	8	0	0 %		

ha: Hektar

Tabelle 54. Einfluss verschiedener Produktions- und Managementfaktoren auf das Vorkommen von *Vibrio parahaemolyticus*

Produktionsfaktoren	Anzahl der Proben	Nachweis von <i>V. p.</i>	Prävalenz von <i>V. p.</i>	Odds Ratio (95 % Konfidenzintervall)	p-Wert
Larven/ha					
≥ 100.000	48	44	91,7%	1,54 (0,47-4,99)	0,4736
< 100.000	106	93	87,7%		

Tabelle 54 wird auf der nächsten Seite fortgeführt.

Produktionsfaktoren	Anzahl der Proben	Nachweis von <i>V. p.</i>	Prävalenz von <i>V. p.</i>	Odds Ratio (95 % Konfidenzintervall)	p-Wert
Antibiotika					
Ja	34	28	82,4%	0,47 (0,16-1,38)	0,1709
Nein	120	109	90,8%		
Probiotika					
Ja	146	131	89,7%	2,91 (0,54-15,73)	0,2145
Nein	8	6	75%		
pH-Wert*¹					
≤ 8	121	105	86,8%	0,22 (0,01-3,88)	0,3012
> 8	14	14	100%		
Salinität (ppt)*²					
≤ 25	51	48	94,1%	1,71 (0,43-6,75)	0,4462
> 25	83	75	90,4%		

ha: Hektar; ppt: Promille; *¹ ausgewertet für 15 Aquakulturen (135 Becken); *² ausgewertet für 16 Aquakulturen (134 Becken)

Tabelle 55. Einfluss verschiedener Produktions- und Managementfaktoren auf das Vorkommen von *Vibrio vulnificus*

Produktionsfaktoren	Anzahl der Proben	Nachweis von <i>V. v.</i>	Prävalenz von <i>V. v.</i>	Odds Ratio (95 % Konfidenzintervall)	p-Wert
Größe (ha)					
≥ 150	70	2	2,9 %	0,38 (0,07-1,96)	0,2485
< 150	84	6	7,1 %		
Larven/ha					
≥ 100.000	48	1	2,1 %	0,3 (0,04-2,52)	0,2677
< 100.000	106	7	6,6 %		
Antibiotika					
Ja	34	2	5,9 %	1,19 (0,23-6,17)	0,838
Nein	120	6	5 %		
Probiotika					
Ja	146	7	4,8 %	0,35 (0,04-3,27)	0,3592
Nein	8	1	12,5 %		
pH-Wert*¹					
≤ 8	121	6	5 %	0,31 (0,06-1,73)	0,1824
> 8	14	2	14,3 %		
Temperatur (°C)					
≥ 28	92	6	6,5 %	2,09 (0,41-10,72)	0,3756
< 28	62	2	3,2 %		

ha: Hektar; °C: Grad Celsius; *¹ ausgewertet für 15 Aquakulturen (135 Becken)

Antibiotika-Kombinationen multiresistenter Isolate

Tabelle 56. Antibiotika-Kombinationen der Isolate mit zwei Resistenzen

Antibiotika	AMP TE	AMP PRL	AMP AK	AMP GM	AMP CZ	AMP CL	AMP CAZ	AMP FOX	AMP KF	AMP OFX	AMP SXT	PRL GM	PRL PTZ	GM AK	GM FOX	CZ AMC
Isolate	31	16	4	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
%	44,9 %	23,2 %	5,8 %	2,9 %	2,9 %	1,4 %	1,4 %	1,4 %	1,4 %	1,4 %	1,4 %	1,4 %	1,4 %	1,4 %	1,4 %	1,4 %

Antibiotika	CZ KF	TE CXM	TE SXT
Isolate	1	1	1
%	1,4 %	1,4 %	1,4 %

AMP: Ampicillin; AMC: Amoxicillin-Clavulansäure; SAM: Ampicillin-Sulbactam; PRL: Piperacillin; PTZ: Piperacillin-Tazobactam; CZ: Cefazolin; CPM: Cefepim; CTM: Cefotaxim; FOX: Cefoxitin; CAZ: Ceftazidim; CXM: Cefuroxim-Natrium; KF: Cephalothin; IMI: Imipenem; MEM: Meropenem; AK: Amikacin; GM: Gentamicin; TE: Tetracyclin; CIP: Ciprofloxacin; LEV: Levofloxacin; OFX: Ofloxacin; CL: Chloramphenicol; SXT: Trimethoprim-Sulfamethoxazol

Tabelle 57. Antibiotika-Kombinationen der Isolate mit drei Resistenzen

Antibiotika	AMP PRL TE	AMP AK TE	AMP CZ KF	AMP GM PRL	AMP CZ TE	AMP GM TE	AMP CIP PRL	AMP SXT TE	AMP CZ PRL	AMP AK PRL	AMP AK GM	AMP PTZ TE	AMP CL TE	AMP CIP TE	AMP KF TE	AMP AK CZ
Isolate	12	6	4	4	3	3	3	2	2	2	2	1	1	1	1	1
%	21,1 %	10,5 %	7 %	7 %	5,3 %	5,3 %	5,3 %	3,5 %	3,5 %	3,5 %	3,5 %	1,8 %	1,8 %	1,8 %	1,8 %	1,8 %

Antibiotika	AMP CZ GM	AMP CZ CXM	AMP AK KF	AMP CIP PTZ	AMP OFX PTZ	AMP CAZ FOX	CPM KF TE	CXM CZ KF	FOX CZ KF
Isolate	1	1	1	1	1	1	1	1	1
%	1,8 %	1,8 %	1,8 %	1,8 %	1,8 %	1,8 %	1,8 %	1,8 %	1,8 %

AMP: Ampicillin; AMC: Amoxicillin-Clavulansäure; SAM: Ampicillin-Sulbactam; PRL: Piperacillin; PTZ: Piperacillin-Tazobactam; CZ: Cefazolin; CPM: Cefepim; CTM: Cefotaxim; FOX: Cefoxitin; CAZ: Ceftazidim; CXM: Cefuroxim-Natrium; KF: Cephalothin; IMI: Imipenem; MEM: Meropenem; AK: Amikacin; GM: Gentamicin; TE: Tetracyclin; CIP: Ciprofloxacin; LEV: Levofloxacin; OFX: Ofloxacin; CL: Chloramphenicol; SXT: Trimethoprim-Sulfamethoxazol

Tabelle 58. Antibiotika-Kombinationen der Isolate mit vier Resistenzen

Antibiotika	AMP	AMP	AMP	AMP	AMP	AMP	AMP	AMP	AMP	AMP	AMP	AMP	AMP	AMP	AMP	AMP
	GM	PRL	PRL	GM	CZ	AK	PRL	PRL	PRL	PRL	GM	GM	AK	AK	CIP	AK
	TE	TE	TE	TE	KF	GM	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	GM	CZ
	AK	CIP	AK	CIP	PRL	PRL	PTZ	CL	AMC	SXT	FOX	LEV	CZ	SXT	PRL	PRL
Isolate	4	3	2	2	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
%	13,8 %	10,3 %	6,9 %	6,9 %	6,9 %	6,9 %	3,5 %	3,5 %	3,5 %	3,5 %	3,5 %	3,5 %	3,5 %	3,5 %	3,5 %	3,5 %

Antibiotika	AMP	AMP	AMP	AMP
	AK	CZ	CZ	CZ
	KF	SXT	GM	KF
	PRL	PRL	CIP	CIP
Isolate	1	1	1	1
%	3,5 %	3,5 %	3,5 %	3,5 %

AMP: Ampicillin; AMC: Amoxicillin-Clavulansäure; SAM: Ampicillin-Sulbactam; PRL: Piperacillin; PTZ: Piperacillin-Tazobactam; CZ: Cefazolin; CPM: Cefepim; CTX: Cefotaxim; FOX: Cefoxitin; CAZ: Ceftazidim; CXM: Cefuroxim-Natrium; KF: Cephalothin; IMI: Imipenem; MEM: Meropenem; AK: Amikacin; GM: Gentamicin; TE: Tetracyclin; CIP: Ciprofloxacin; LEV: Levofloxacin; OFX: Ofloxacin; CL: Chloramphenicol; SXT: Trimethoprim-Sulfamethoxazol

Tabelle 59. Antibiotika-Kombinationen der Isolate mit fünf Resistenzen

Antibiotika	AMP	AMP	AMP	AMP	AMP	AMP	AMP	AMP	AMP	AMP	AMP	AMP	AMP	AMC
	AK	AK	AK	AK	AK	AK	AK	AK	AK	AK	CIP	CIP	CIP	CZ
	CZ	CZ	CZ	GM	GM	PTZ	CZ	KF	FOX	LEV	LEV	CXM	CXM	FOX
	PRL	PRL	PRL	PRL	PRL	PRL	GM	GM	GM	OFX	OFX	PTZ	CZ	IMI
	KF	GM	TE	TE	CIP	TE	KF	TE	TE	TE	PRL	PRL	KF	KF
Isolate	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
%	13,3 %	6,7 %	6,7 %	6,7 %	6,7 %	6,7 %	6,7 %	6,7 %	6,7 %	6,7 %	6,7 %	6,7 %	6,7 %	6,7 %

AMP: Ampicillin; AMC: Amoxicillin-Clavulansäure; SAM: Ampicillin-Sulbactam; PRL: Piperacillin; PTZ: Piperacillin-Tazobactam; CZ: Cefazolin; CPM: Cefepim; CTM: Cefotaxim; FOX: Cefoxitin; CAZ: Ceftazidim; CXM: Cefuroxim-Natrium; KF: Cephalothin; IMI: Imipenem; MEM: Meropenem; AK: Amikacin; GM: Gentamicin; TE: Tetracyclin; CIP: Ciprofloxacin; LEV: Levofloxacin; OFX: Ofloxacin; CL: Chloramphenicol; SXT: Trimethoprim-Sulfamethoxazol

Tabelle 60. Antibiotika-Kombinationen der Isolate mit sechs Resistenzen

Antibiotika	AMP	AMP	AMP	AMP	AMP	AMP
	KF	KF	KF	KF	KF	CXM
	PRL	PRL	PRL	PRL	GM	GM
	AK	AK	AMC	CXM	AK	AK
	CIP	GM	CIP	CIP	CIP	CZ
	CZ	LEV	CZ	TE	TE	TE
Isolate	1	1	1	1	1	1
%	16,7 %	16,7 %	16,7 %	16,7 %	16,7 %	16,7 %

AMP: Ampicillin; AMC: Amoxicillin-Clavulansäure; SAM: Ampicillin-Sulbactam; PRL: Piperacillin; PTZ: Piperacillin-Tazobactam; CZ: Cefazolin; CPM: Cefepim; CTM: Cefotaxim; FOX: Cefoxitin; CAZ: Ceftazidim; CXM: Cefuroxim-Natrium; KF: Cephalothin; IMI: Imipenem; MEM: Meropenem; AK: Amikacin; GM: Gentamicin; TE: Tetracyclin; CIP: Ciprofloxacin; LEV: Levofloxacin; OFX: Ofloxacin; CL: Chloramphenicol; SXT: Trimethoprim-Sulfamethoxazol

Tabelle 61. Antibiotika-Kombinationen der Isolate mit sieben Resistenzen

Antibiotika	TE	TE	TE
	AK	AK	OFX
	AMP	CXM	AMP
	CZ	CZ	CIP
	PRL	FOX	PRL
	SXT	GM	GM
	KF	KF	LEV
Isolate	1	1	1
%	33,3 %	33,3 %	33,3 %

AMP: Ampicillin; AMC: Amoxicillin-Clavulansäure; SAM: Ampicillin-Sulbactam; PRL: Piperacillin; PTZ: Piperacillin-Tazobactam; CZ: Cefazolin; CPM: Cefepim; CTM: Cefotaxim; FOX: Cefoxitin; CAZ: Ceftazidim; CXM: Cefuroxim-Natrium; KF: Cephalothin; IMI: Imipenem; MEM: Meropenem; AK: Amikacin; GM: Gentamicin; TE: Tetracyclin; CIP: Ciprofloxacin; LEV: Levofloxacin; OFX: Ofloxacin; CL: Chloramphenicol; SXT: Trimethoprim-Sulfamethoxazol

Tabelle 62. Antibiotika-Kombinationen der Isolate mit acht Resistenzen

	AK	AK
	AMP	AMP
	CIP	CXM
Antibiotika	KF	CZ
	OFX	FOX
	GM	GM
	PRL	PRL
	SXT	TE
Isolate	1	1
%	50 %	50 %

AMP: Ampicillin; AMC: Amoxicillin-Clavulansäure; SAM: Ampicillin-Sulbactam; PRL: Piperacillin; PTZ: Piperacillin-Tazobactam; CZ: Cefazolin; CPM: Cefepim; CTM: Cefotaxim; FOX: Cefoxitin; CAZ: Ceftazidim; CXM: Cefuroxim-Natrium; KF: Cephalothin; IMI: Imipenem; MEM: Meropenem; AK: Amikacin; GM: Gentamicin; TE: Tetracyclin; CIP: Ciprofloxacin; LEV: Levofloxacin; OFX: Ofloxacin; CL: Chloramphenicol; SXT: Trimethoprim-Sulfamethoxazol

Publikationen

Population analysis of *Vibrio parahaemolyticus* originating from different geographical regions demonstrates a high genetic diversity. Urmersbach S, Alter T, Koralage MS, Sperling L, Gerdts G, Messelhäusser U, Huehn S. BMC Microbiol. 2014 Mar 8;14:59. doi: 10.1186/1471-2180-14-59. PMID:24606756

Prevalence and Antimicrobial Resistance of *Vibrio* spp. in Retail and Farm Shrimps in Ecuador. Sperling, L, Alter, T, Huehn, S. J Food Prot. 2015 Nov;78(11):2089-92. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-15-160. PMID: 26555534

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Prof. Dr. Thomas Alter für die Möglichkeit der Erstellung und die Betreuung dieser Arbeit bedanken. Ebenso danke ich ihm für die fortwährende und stets freundliche Unterstützung.

Besonders herzlich danke ich Prof. Dr. Stephan Hühn für seine Geduld und Mühe sowie unablässige Hilfsbereitschaft und Unterstützung bei allen Fragen, die sich im Rahmen der Erstellung meiner Dissertation stellten.

Mein besonderer Dank gilt auch Kathrin Oeleker für ihre tatkräftige und unermüdliche Unterstützung bei der Laborarbeit. Ohne Kathrins Hilfe wäre die Bearbeitung meiner Proben nicht möglich gewesen.

Daneben bedanke ich mich bei allen weiteren Mitarbeitern des Instituts für Lebensmittelhygiene der FU Berlin für ihre Hilfsbereitschaft und Unterstützung.

Dr. Eduardo Peña Cuesta und Silvana Larriva González der Universität Cuenca danke ich herzlich für die Zurverfügungstellung ihrer Labore und die Unterstützung bei der Organisation meines Aufenthalts in Ecuador.

Ein besonderer Dank gilt Dr. Wilson Giovanni Larriva, der mir bei allen Fragen und Problemen stets mit großer Hilfsbereitschaft zur Seite stand.

Weiterhin gilt mein Dank Norma Cedillo und Anna Maria Lopez für die nette Zusammenarbeit und zeitlich flexible Nutzung ihrer Labore und Arbeitsgeräte.

Alle Mitarbeiter der Universität Cuenca begegneten mir mit viel Herzlichkeit und Offenheit. Für das mir entgegengebrachte Vertrauen sowie das große Maß an Interesse und Hilfsbereitschaft bedanke ich mich.

Weiterhin gilt mein Dank Dr. Stanislaus Sonnenholzner für seine Hilfe, Zugang zu Shrimp-Aquakulturanlagen in Ecuador zu erlangen.

Bei Jaime Cruz, Danny Arcos und insbesondere bei Paul Pina bedanke ich mich für ihren Einsatz und ihre Mithilfe beim Transport der entnommenen Proben aus Aquakulturen.

Bedanken möchte ich mich auch bei allen Shrimp-Farmern, die mir Zugang zu ihren Aquakulturanlagen gewährt haben.

Ein besonderer Dank gilt meinem Freund Manuel für seine uneingeschränkte Unterstützung, Rücksichtnahme sowie seine große Hilfe bei vielen organisatorischen Punkten. Ohne seine Unterstützung wäre das Erstellen dieser Arbeit nicht möglich gewesen.

Weiterhin danke ich meinen Eltern und Geschwistern Katrin, Johannes und Luzie für all ihre Unterstützung.

Ebenso gilt mein Dank Hanne Ulrich de Alfonso für ihre Mühe und Ausdauer beim Korrekturlesen.

Selbständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Ich versichere, ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen zu haben.

Berlin, den 19.12.2017

Lisa Sperling



9 783863 878795

mbvberlin | mensch und buch verlag

49,90 Euro | ISBN: 978-3-86387-879-5