

Aus dem Institut der Lebensmittelhygiene  
des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

„*In vivo* Studien  
zur Anreicherung, Lokalisation und Persistenz  
von *Vibrio* spp.  
in artifiziell kontaminierten  
*Mytilus edulis*“

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

vorgelegt von  
**Doreen Herrfurth**  
Tierärztin aus Belgien

Berlin 2013

Journal-Nr.: 3652

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. Reimar Johne  
Dritter Gutachter: PD Dr. Peggy Braun

*Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):*

Vibrio parahaemolyticus, Vibrio cholerae, Vibrio vulnificus, Mytilus edulis,  
contamination, concentration, localization, persistence

Tag der Promotion: 13.11.2013

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: 978-3-86387-401-8

**Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2013**

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 2013

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

verlag@menschundbuch.de – [www.menschundbuch.de](http://www.menschundbuch.de)

Meinen Eltern  
meinem Bruder  
meinem Lebensgefährten Thomas  
und meinem Sohn Jonas





<b>Inhaltsverzeichnis</b>	
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	III
<b>1 Einleitung</b> .....	1
<b>2 Schrifttum</b> .....	3
2.1 Vibrionen.....	3
2.1.1 Taxonomie.....	3
2.1.2 Habitate.....	4
2.1.3 <i>Vibrio</i> spp.-Prävalenzen.....	8
2.1.4 Meldepflicht.....	14
2.1.5 <i>Vibrio</i> spp. im EU-Recht.....	14
2.1.6 Nachweisverfahren.....	15
2.2 <i>Vibrio</i> spp.....	19
2.2.1 <i>Vibrio parahaemolyticus</i> .....	19
2.2.2 <i>Vibrio cholerae</i> .....	21
2.2.3 <i>Vibrio vulnificus</i> .....	24
2.3 <i>Bivalvia</i> spp.....	25
2.3.1 <i>Mytilus edulis</i> .....	25
2.3.2 Rechtsgrundlagen zur Handhabung von <i>Bivalvia</i> .....	27
2.3.3 Hälterung von <i>Bivalvia</i> .....	28
2.3.4 Bakterien in Organen von <i>Bivalvia</i> und / oder anderen Meeresfrüchten.....	30
2.4 Studien nach artifizieller Kontamination von Muscheln und Meeresfrüchten mit <i>Vibrio</i> spp. und / oder anderen Bakterien.....	31
2.4.1 Kontaminationsstudien.....	31
2.4.2 Hälterungsstudien.....	34
2.4.3 Lagerungsstudien.....	37
2.5 Ziel dieser Arbeit.....	40
<b>3 Materialien</b> .....	41
3.1 <i>Vibrio</i> spp.....	41
3.2 <i>Mytilus edulis</i> .....	41
3.3 Puffer.....	42
3.4 Nährmedien.....	43
3.5 Instrumente / Geräte.....	46
3.6 Verbrauchsmaterialien.....	47
3.7 Reagenzien.....	48
3.8 Primer und Adapter.....	49
3.9 Software.....	50
<b>4 Methoden</b> .....	51
4.1 Versuchsaufbau.....	51
4.1.1 Aufbau der Versuchsanlage.....	51
4.1.2 Herstellung der Kontaminationssuspensionen.....	52
4.2 Isolierung und Quantifizierung von <i>Vibrio</i> spp.....	53
4.2.1 Isolierung von <i>Vibrio</i> spp.....	53
4.2.2 Quantifizierung von <i>Vibrio</i> spp.....	55
4.3 Speziesdetektion.....	56
4.3.1 PCR-Systeme.....	56
4.3.2 Wachstumsversuche.....	62
4.4 Versuchsdurchführung.....	62
4.4.1 Kontrollprobe und Kontamination.....	62

4.4.2	Kontaminationsversuche .....	63
4.4.3	Hälterungsversuche .....	63
4.4.4	Lagerungsversuche .....	64
4.5	Molekularbiologische Untersuchung .....	64
4.5.1	DNA-Isolation .....	64
4.5.2	Multiplex Polymerase-Kettenreaktion .....	65
4.5.3	Genotypisierung .....	67
4.6	Bestimmung der Begleitflora .....	70
4.6.1	Standard-Prüfmethoden .....	70
4.6.2	Isolierung und Quantifizierung der Begleitflora .....	71
4.6.3	Mesophile aerobe Gesamtkeimzahl .....	72
4.6.4	<i>Aeromonas</i> spp. ....	72
4.6.5	Coliforme Bakterien .....	73
4.6.6	<i>E. coli</i> .....	74
4.6.7	<i>Enterobacteriaceae</i> .....	75
4.6.8	<i>Pseudomonas</i> spp. ....	75
5	<b>Ergebnisse</b> .....	77
5.1	Wachstumsverhalten von <i>Vibrio</i> spp. ....	77
5.2	Kontaminations-, Hälterungs- und Lagerungsversuche mit <i>V. cholerae</i> , <i>V. parahaemolyticus</i> oder <i>V. vulnificus</i> kontaminierten <i>M. edulis</i> .....	77
5.2.1	Kontaminationsversuche .....	77
5.2.2	Hälterungsversuche .....	80
5.2.3	Lagerungsversuche .....	84
5.3	Genotypisierung .....	102
5.4	Vorhandene Begleitflora .....	103
6	<b>Diskussion</b> .....	104
6.1	Kontaminationsversuche .....	104
6.2	Hälterungsversuche .....	106
6.3	Lagerungsversuche .....	107
6.4	Schlussfolgerung .....	108
7	<b>Zusammenfassung</b> .....	110
8	<b>Summary</b> .....	111
9	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	112
10	<b>Anhang</b> .....	133
10.1	<i>Vibrio</i> spp.-Zellzahlen .....	133
10.2	Tabellenverzeichnis .....	137
10.3	Abbildungsverzeichnis .....	138
	Publikationsverzeichnis .....	139
	Danksagung .....	140
	Selbständigkeitserklärung .....	141

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
abs.	absolut
AFLP	Amplified Fragment-Length Polymorphism
APW	alkaline peptone water (Alkalisches Peptonwasser)
Aqua dest.	Aqua destillata
ASP	amnesic shellfish poisoning
ASW	Artifizielles Seewasser
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung
bp	base pairs (Basenpaare)
<i>C. gigas</i>	<i>Crassostrea gigas</i>
CPC	Cellobiose-Polymixin (B-) Colistin (Agar)
CR	Clearance Rate
CVA	Chrom-Vibrio-Agar
DNA	Deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Deoxyribonucleic acid tri phosphate (Desoxyribonukleinsäure Tri-Phosphat)
DSP	diarrhetic shellfish poisoning
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>En. durans</i>	<i>Enterococcus durans</i>
EG	Europäische Gemeinschaft
<i>et al.</i>	et alii
EPW	estuarine peptone water (1 % Peptonwasser)
FAO	Food and Agriculture Organization (UN)
FDA	Food and Drug Administration (USA)
GKZ	Gesamtkeimzahl
HW	Hälterungswasser
IfSG	Infektionsschutzgesetz
ISO	International Organisation for Standardisation
J	Jutesack
KbE	Kolonie-bildende Einheit
KbE <sub>(abs.)</sub>	Kolonie-bildende Einheiten (absolut)
KP	Kanagawa-Phänomen
KW	Kontaminationswasser
LFGB	Lebensmittel-, Bedarfsgegenstände- und Futtermittelgesetzbuch
<i>M. edulis</i>	<i>Mytilus edulis</i>

MDD	Mitteldarmdrüsen
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MLW	Muschel-Lumen-Wasser
mPCR	Multiplex Polymerase-Kettenreaktion
MPN	Most-Probable-Number
MR	Muschel-(Gewebe-) Rest
Na	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
neg.	negativ
nm	Nanometer
NSP	neurotoxic shellfish poisoning
NSSP	National Shellfish Sanitation Program
OD	Optische Dichte
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
pH	<i>pondus Hydrogenii</i>
pos.	positiv
PSP	paralytic shellfish poisoning
PW	Peptonwasser
RKI	Robert Koch Institut
rRNA	ribosomal ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
RT	Raumtemperatur
<i>S.</i>	<i>Staphylococcus</i>
SPM	Standard-Prüfmethoden
sp.	Spezies (Singular)
spp.	Spezies (Plural)
Tab.	Tabelle
Taq	(Polymerase aus) <i>Thermophilus aquaticus</i>
TCBS	Thiosulfate-citrate-bile (salts) sucrose (Thiosulfate- Zitrats-Gallensalz Saccharose-Agar)
<i>tdh</i>	thermostable direct hemolysin
<i>tlh</i>	thermolabile hemolysin
<i>trh</i>	thermostable direct related hemolysin
Tris	Tri (hydroxymethyl)-aminomethan
TW	Tank-Wasser
UBA	Umweltbundesamt
UV	Ultraviolett
<i>V.</i>	<i>Vibrio</i>
<i>V. a.</i>	<i>Vibrio alginolyticus</i>
<i>V. c.</i>	<i>V. cholerae</i>

<i>V. m.</i>	<i>V. mimicus</i>
<i>V. p.</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>
<i>V. v.</i>	<i>V. vulnificus</i>
V	Vakuumbbeutel
VBNC	viable-but-non culturable (lebend aber nicht kultivierbar)
VO	Verordnung
WHO	World Health Organization (Weltgesundheitsorganisation)



# 1 Einleitung

Vibrionen sind gram-negative Stäbchenbakterien, die über den Verzehr belasteter Meerestiere sowie durch direkten Wundkontakt mit belastetem Wasser an Badestränden schwerwiegende Infektionen bei Menschen und Tieren auslösen können.

In Deutschland wurden verschiedene Studien zum Vorkommen von Vibrionen in Muscheln auf pre-harvest- und Einzelhandels-Ebene durchgeführt (Lhafi und Kühne, 2007; Messelhäusser *et al.*, 2010; Randt *et al.*, 2011). Diese Untersuchungen wurden angestellt, weil es in vielen Ländern wie Japan, den Vereinigten Staaten, Mexiko, Vietnam, Thailand, Indonesien und Chile über den Verzehr Vibrionen-belasteter Meerestiere bereits zu schwerwiegenden Infektionen kam (Lesmana *et al.*, 2002; McLaughlin *et al.*, 2005; Cabanillas-Beltran *et al.*, 2006; Cabello *et al.*, 2007; Chitov *et al.*, 2009; Nguyen *et al.*, 2009; Hara-Kudo *et al.*, 2012). In allen bisher in Deutschland durchgeführten Studien wurde gezeigt, dass bis zu 75 % der untersuchten Muscheln mit *Vibrio* spp. belastet sein können.

Eine weitere wichtige Infektionsquelle für alimentäre Infektionen in Deutschland stellt der Verzehr von importierten Muscheln dar. Lebensmittelerkrankungen, ausgelöst durch *Vibrio* (*V.*) *parahaemolyticus*, werden derzeit in vielen Ländern, wie den USA und Japan diagnostiziert, aber auch in Europa (Frankreich, Spanien) werden derartige Fälle verzeichnet (Morris, 2003; Su und Liu, 2007). Japan und die USA sind Hauptimporteure von Fischerei- und Aquakulturprodukten (Anonym, 2012). China war 2009 Hauptlieferant für die EU, bezogen auf den Wert der Einfuhren von Fisch und Fischereierzeugnissen (FIZ, 2010; Anonym, 2012). Obwohl die Einfuhrzahlen von Fischereiprodukten nach Deutschland in den letzten Jahren tendenziell abnahmen, stieg die Einfuhrmenge sowie der Verzehr von Schalen- und Weichtieren an (FIZ, 2010; Anonym, 2012). Zu den Schalen- und Weichtieren zählt auch die in Deutschland häufig verzehrte Miesmuschel (*Mytilus* [*M.*] *edulis*). Sie wird immer häufiger in Aquakulturen produziert und filtriert Meerwasser mit einer Rate von ca. 1,5 Litern pro Stunde. Mit dem aufgenommenen Meerwasser gelangen aber auch Mikroorganismen wie *V. parahaemolyticus* und *V. cholerae* in die Muschel, die zu Infektionen beim Menschen bei Rohverzehr oder unzureichender Erhitzung führen können.

In deutschen Gewässern werden Vibrionen in Sommermonaten vermehrt nachgewiesen, dies zeigt, dass sie bei wärmeren Temperaturen häufiger vorkommen und ebenfalls in Nord- und Ostsee endemisch sind (Anonym, 2006; Ramdohr *et al.*, 2012). In Studien zum Temperaturverlauf der letzten Jahrzehnte bestätigten das Umweltbundesamt (UBA), das Robert-Koch-Institut (RKI) und das Max-Planck-Institut für Meteorologie einen ansteigenden Trend der Temperaturen in Deutschland (Stark *et al.*, 2009; UBA, 2012). Seit 1994 werden vereinzelt Wundinfektionen bei Badegästen an der deutschen Ostseeküste diagnostiziert, bei denen *V. vulnificus* die Ursache darstellte (Ruppert *et al.*, 2004; Anonym, 2009; 2010a; Ramdohr *et al.*, 2010). Diese vermehrt auftretenden Infektionen könnten im Temperaturanstieg der deut-

schen Gewässer begründet sein. Nach Angaben des Landesamts für Gesundheit und Soziales Mecklenburg-Vorpommern (LAGuS) sowie des RKI wurden in den Jahren 2001 bis 2012 immer wieder vereinzelt Vibrionen-Infektionen registriert. Die Infektionen, bei denen zusätzlich zu *V. cholerae* auch *V. vulnificus* oder *V. alginolyticus* detektiert wurden, wurden hauptsächlich nach dem Baden in der Ostsee gemeldet, wobei auch nach dem Baden in der Nordsee sowie in Binnengewässern Vibrionen aus Wunden oder Blutkulturen detektiert wurden (RKI, 2006a; 2012b). In Deutschland wurden in den Jahren 2001 bis 2012 insgesamt 19 Cholera-Fälle gemeldet, in 15 Fällen wurde die Infektion in Deutschland erworben (RKI, 2004; 2006a; 2006b; Anonym, 2010a; 2010b). Von den nicht in Deutschland erworbenen Cholera-Fällen wurden einige durch Reisende beispielsweise aus Indien und Pakistan importiert, dennoch besteht auch in Deutschland die Gefahr, sich mit *V. cholerae* zu infizieren. Im Jahr 2010 verliefen zwei von vier gemeldeten Vibrionen-Infektionen tödlich. In diesen Fällen wurden *V. cholerae* und *V. vulnificus* nachgewiesen. In den Jahren 2011 und 2012 wurden ebenfalls zwei in Deutschland erworbene *V. cholerae*-Fälle bekannt (Neifer, 2012).

Aufgrund der Infektionsgefahr für Menschen und Tiere mit Vibrionen, ist die Überwachung der marinen Bakterien-Flora unabdingbar. Die Vibrionen-Belastung von Lebensmitteln aquatischen Ursprungs muss kontrolliert und gegebenenfalls verringert werden. Weitergehend wäre es sinnvoll zu kontrollieren, wie sich die Lagerung kontaminierter Produkte auf die verschiedenen *Vibrio* spp. auswirkt. *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae* und *V. vulnificus* gehören zu den bedeutendsten Erregern dieser Gattung und werden häufig aus Miesmuscheln isoliert. Deshalb war die Aufgabe der vorliegenden Arbeit, die Anreicherung, Lokalisation und Persistenz dieser drei Spezies in artifiziell kontaminierten *M. edulis* zu untersuchen. Kontaminations-, Hälterungs- und Lagerungsversuche wurden durchgeführt, in denen die Wachstumsraten und die Persistenz der Vibrionen verfolgt wurden. Die kontaminierten *M. edulis* wurden über Zeiträume von einer Woche gehältert bzw. für zehn Tage in handelsüblichen Verpackungen unter gebräuchlichen Temperaturbedingungen gelagert. Durch Präparation der Muscheln ergaben sich verschiedene Probensegmente, in denen die Anreicherungs-dichten der verschiedenen *Vibrio* spp. miteinander verglichen wurden.



## 2 Schrifttum

### 2.1 Vibrionen

#### 2.1.1 Taxonomie

Vibrionen sind gram-negative Bakterien, die zum Stamm der *Proteobacteria* gehören. Sie werden in die Klasse der *Gammaproteobacteria* und dort in die Ordnung *Vibrionales* eingeordnet. Die Gattung *Vibrio* wurde 1854 zum ersten Mal von Pacini beschrieben (Frerichs, 2001). Er identifizierte ein gram-negatives Bakterium als Auslöser der Cholera. Den wissenschaftlichen Namen *Vibrionaceae* bekamen sie 1965 von Véron (Frerichs, 2001).

Robert Koch untersuchte 1883 als Leiter der deutschen Cholerakommission in Ägypten einen Cholera-Ausbruch, bei dem er das erste Mal Reinkulturen von *V. cholerae* kultivieren und für weitere Untersuchungen nach Berlin bringen konnte (Anonym, 1905; Howard-Jones, 1984).

Vibrionen sind kleine (0,5-0,8 µm x 1,4-2,6 µm), kommaförmige Stäbchenbakterien, die fakultativ anaerob sind und sich durch eine oder mehrere polare Geißeln fortbewegen können (Holt und Bergey, 2000).

Zurzeit sind 81 Spezies der Familie *Vibrionaceae* zugeordnet (Alter *et al.*, 2012). Für die jeweiligen *Vibrio* spp. werden unterschiedliche Natriumchlorid-Toleranzwerte angegeben. *V. hollisae*, *V. damsela* und *V. furnissii* zeigen optimales Wachstum in 1 % Peptonwasser (PW) mit 1 % NaCl. *V. cholerae* und *V. mimicus* wachsen am besten in 1 % PW mit 0-3 % NaCl. Daher werden sie überwiegend in Süßwasser detektiert. Für *V. vulnificus* und *V. fluvialis* liegt die optimale NaCl-Konzentration in 1 % PW dagegen bei 1-3 %. *V. parahaemolyticus*, *V. harveyi* und *V. metschnikovii* weisen mit 1-8 % NaCl die größte NaCl-Toleranz in 1 % PW auf. Aufgrund unterschiedlicher Salztoleranz kommen Vibrionen im marinen Habitat ubiquitär vor. Einige Spezies innerhalb der *Vibrionaceae* können durch die Fähigkeit, Sucrose zu fermentieren, unterschieden werden (Holt und Bergey, 2000).

Thompson *et al.* (2009) erstellten mittels Multi-lokus Sequenz-Analysen (MLSA) und Stammbaum-Analysen phylogenetische Konsensus-Bäume. Dadurch wurde die Familie *Vibrionaceae* in eine *Vibrio*-Kerngruppe, eine *V. cholerae*-*V. mimicus*-Gruppe, in Alii-*Vibrio* spp. und in *Photobacterium* spp. unterteilt (Thompson *et al.*, 2009). Für die Stammbaumanalyse *alsS*, *gyrB*, *hisS*, *metG*, *recA*, *rpoA*, *rpoB* sowie weitere Gene. Eine *Vibrio* sp. wurde dabei als eine Gruppe von Stämmen definiert, deren DNA in den MLSA und Stammbaum-Analysen zu über 95 % identisch ist, in über 96 % gleiche Aminosäuren besitzt und in mehr als 61 % der Proteome übereinstimmt.

Einige Spezies dieser Art sind pathogen, der größte Anteil (ca. 69 %) jedoch apathogen, deswegen werden sie als fakultativ pathogen bezeichnet. Zwölf *Vibrio* spp. wurden bisher als humanpathogen identifiziert (Tab. 1). Dabei gehören *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* und *V. vulnificus* zu den Spezies, die für Human-Infektionen eine übergeordnete Rolle spielen.

Tabelle 1: Humanpathogene *Vibrio* spp. und ihre Erkrankungsformen (nach SCVPH, 2001)

Vibrio-Spezies	Erkrankungen						
	Gastro-enteritis	Wundinfektion	Ohrinfektion	Septikämie	Bakteriämie	Lungeninfektion	Meningitis
<i>V. cholerae</i> O1 / O139	++	(+)	?	?	?	?	?
<i>V. cholerae</i> non-O1/non-O139	++	+	+	(+)	(+)	?	(+)
<i>V. parahaemolyticus</i>	++	+	(+)	?	(+)	(+)	(+)
<i>V. vulnificus</i>	+	++	?	++	+	(+)	(+)
<i>V. alginolyticus</i>	?	++	+	?	(+)	?	?
<i>V. fluvialis</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 Infektionen; + regelmäßig vorkommende Infektionen; (+) seltene Infektionen; ? Hinweise auf Infektionen

## 2.1.2 Habitate

### Wasser

Vibrionen sind in Meerwasser und Küstenregionen sowie Flussmündungen ubiquitär verbreitet. Dabei sind die Verbreitung und die Vermehrung abhängig von z. B. der Wassertemperatur, der Salinität und dem Sauerstoffgehalt.

Bei Temperaturen um 20 °C Wassertemperatur zeigen Vibrionen im allgemeinen Wachstum. Ab 30 °C kann ein Generationszyklus in 12-18 Minuten vollzogen sein (Thompson *et al.*, 2009). Psychrotolerante Arten, wie beispielsweise *V. cholerae* und *V. parahaemolyticus*, die bereits bei niedrigeren Temperaturen um 8 °C bis 10 °C Vermehrung zeigen, kommen ebenfalls vor. Ist die Umgebungstemperatur für die nicht psychrotoleranten *Vibrio* spp. zu niedrig, gehen sie vorübergehend in einen nicht kultivierbaren Ruhezustand (VBNC-Zustand) über und liegen so zum Beispiel im Sediment vor (Hood und Ness, 1982; Vezzulli *et al.*, 2009). Die Überlebensrate von *Vibrio* spp. liegt im Sediment signifikant ( $p < 0,01$ ) höher als im Vergleich zum darüber liegenden Wasser (Chandran *et al.*, 2011). So kann *V. parahaemolyticus* im Mittelmeerraum das gesamte Jahr über aus Sediment nachgewiesen werden (Vezzulli *et al.*, 2009).

Bisher traten durch Vibrionen verursachte Infektionen verstärkt in wärmeren Klimazonen auf. Durch den Trend zu immer wärmeren Sommertemperaturen (UBA, 2012) kann es auch in deutschen Gewässern über kontaminiertes Wasser und kontaminierte Fische und Meeresfrüchte zu Human-Infektionen kommen.

Phytoplankton stellt für *Vibrio* spp. im natürlichen Lebensraum ein Reservoir dar (Huq *et al.*, 1983; Binsztein *et al.*, 2004; Baffone *et al.*, 2006; Mahmud *et al.*, 2007; Kirschner *et al.*, 2008; Martinelli *et al.*, 2011). Vibrionen heften sich an Phytoplankton und können sich an diesem ansammeln bzw. anreichern. Durch verschiedenste Umwelteinflüsse bzw. Wetterphänomene wie beispielsweise El Niño, bei denen es zu Wirbelstürmen kommen kann, die sich auf dem Meer bilden und auf das Land übergehen, kann es zu verstärkten Krankheitsausbrüchen durch das vermehrte Auftreten von *Vibrio* spp. in Küstennähe sowie auf dem Land kommen (Colwell, 1996; Pascual *et al.*, 2000; Nigro *et al.*, 2011; Ramdohr *et al.*, 2012).

Zusätzlich zu Wasser und Sediment stellen Biofilme eine Überlebens- und Vermehrungsmöglichkeit für Vibrionen dar, das als Ursprung für die Verbreitung von *V. cholerae*, *Vibrio* spp. allgemein und anderen Bakterien, wie beispielsweise *Escherichia (E.) coli* dienen kann (Alam *et al.*, 2006; Alam *et al.*, 2007; Shikuma und Hadfield, 2010). Durch Biofilmbildung könnten sich Vibrionen unter natürlichen Bedingungen an und in Muschelschalen, -netzen und -seilen sowie an Steinen anheften. Des Weiteren scheinen Öklumpen im Meer ein Reservoir für *V. vulnificus* zu bilden (Tao *et al.*, 2011).

## **Menschen**

Vibrionen-Infektionen zählen zu den Infektionskrankheiten, die unter den Begriff der Zoonose fallen. Zoonosen sind Infektionen die von Bakterien, Parasiten, Pilzen, Prionen oder Viren verursacht werden. Dabei ist eine wechselseitige Übertragung der Erkrankung zwischen Tieren und Menschen möglich (Baker-Austin, 2010). Die Übertragung von Vibrionen kann durch einen direkten Kontakt mit kontaminiertem Badewasser sowie über Trinkwasser oder andere Lebensmittel erfolgen.

Etliche durch *V. vulnificus* verursachte Wundinfektionen wurden in den Jahren 2006 und 2010 gemeldet (Frank *et al.*, 2006; Anonym, 2010a). Auf den Britischen Inseln konnte aus einer Wundinfektion *V. alginolyticus* isoliert werden (Reilly *et al.*, 2011). Die betroffene Patientin badete zuvor im Meer und behandelte eine bereits vorhandene Beinwunde mit einer Mischung aus verschiedenen Algen. In anderen Fällen führten Vibrionen-Infektionen zu Multiorganversagen sowie Wundinfektionen und machten Amputationen verschiedener Extremitäten erforderlich (Torres *et al.*, 2002; Tena *et al.*, 2010). Besonders betroffen sind meist ältere männliche und chronisch kranke Personen, bei denen es über Wundinfektionen zu schweren Septikämien kommt (Park *et al.*, 1991). Prädisponierende Faktoren für eine Infektion sind Immunsuppression, Hepatitis oder chronische Leberzirrhosen (Merkel *et al.*, 2001). Bei infizierten Patienten wurden Vibrionen aus Blut, Stuhl, Wunden, Gallenblasen und dem Erbrochenen isoliert (Blake *et al.*, 1980; Dekeyser *et al.*, 1972; Huq *et al.*, 1980; Hickman-Brenner

*et al.*, 1984; Park *et al.*, 1991; Klontz *et al.*, 1994; Hodge *et al.*, 1995; Dalsgaard *et al.*, 1996; West *et al.*, 1998; Torres *et al.*, 2002; Gomez *et al.*, 2003; Linde *et al.*, 2004; Frank *et al.*, 2006; Anonym, 2010a; Tena *et al.*, 2010). Aus eitrigem Exsudat einer Ohrinfektion, die nach dem Schwimmen in Meerwasser auftrat, konnte *V. fluvialis* isoliert werden (Cabrera Rodriguez *et al.*, 2005). Bei einem Patienten mit Lungenentzündung wurde *V. metschnikovii* im Bronchial-Auswurf detektiert (Wallet *et al.*, 2005).

Weltweit wurden im Jahr 2011 in 58 Ländern ca. 600.000 Cholera-Fälle gemeldet, die durch *V. cholerae* ausgelöst wurden (WHO, 2012). Ungefähr 7.800 Fälle verliefen tödlich. In Europa wurden 71 Fälle verzeichnet, von denen 38 aus anderen Ländern importiert wurden. Insgesamt 61 % der Erkrankungen sind auf die Cholera-Ausbrüche auf Haiti und in der Dominikanischen Republik zurückzuführen. Im Jahr 2008 wurden ca. 190.000 Cholera-Fälle registriert. In den folgenden Jahren konnte bis 2012 ein stetiger Anstieg der Cholera-Fälle verzeichnet werden (WHO, 2009; 2010; 2011d). In Deutschland besteht nur für Cholera-Infektionen eine Meldepflicht. In den USA hingegen werden auch Vibrionen-Infektionen erfasst, die durch andere *Vibrio* spp. (*V. parahaemolyticus*, *V. cholerae*, *V. vulnificus*, *V. alginolyticus*, *V. fluvialis*, *V. mimicus*, etc.) ausgelöst wurden (CDC, 2011). Im Jahr 2009 wurden aus 837 Patienten *Vibrio* spp. isoliert. Seit 2007 wurde ein Anstieg der Inzidenz verzeichnet (CDC, 2007; 2008). Die in den USA am häufigsten detektierte *Vibrio*-Spezies war *V. parahaemolyticus* (42-47 %), gefolgt von *V. alginolyticus* (16-18 %), *V. vulnificus* (13-17 %) und nicht toxische *V. cholerae* (8-10 %). In Japan, wo es häufig zu *V. parahaemolyticus*-Infektionen kam, wurde für die Jahre 2000 bis 2009 ein Rückgang der Infektionen beschrieben. Dies wurde einem besseren hygienischen Umgang mit Fischen und Meeresfrüchten zugeschrieben (Hara-Kudo *et al.*, 2012). Seit Beginn der Aufzeichnungen im Jahr 1962 wurden jährlich zwischen ca. 3.000-14.000 *V. parahaemolyticus*-Fälle und 150-750 Ausbrüche verzeichnet (Hara-Kudo *et al.*, 2012). Im Jahr 1998 wurde mit ca. 1.200 Fällen und 840 Ausbrüchen die höchste Anzahl an *V. parahaemolyticus*-Infektionen gemeldet.

Etliche Vibrionen-Infektionen traten nach Verzehr von kontaminierten Schalentieren, hauptsächlich Austern auf (Morris, 2003; Su und Liu, 2007). Kontaminierte Fische oder Schalentiere können Lebensmittelintoxikationen, schwere Septikämien sowie Cholera über den Verzehr und die Handhabung verursachen (Holt *et al.*, 1994; Dalsgaard *et al.*, 1995; Gopal *et al.*, 2005).

### **Tiere**

Tiere können sich mit Vibrionen über die Aufnahme kontaminierter Fische und Meeresfrüchte infizieren. Über den direkten Kontakt mit kontaminiertem Wasser kann es zur Infektion kommen. Fischpathogene Arten der Gattung *Vibrio* treten hauptsächlich bei Meeres-, Brack- und Süßwasserfischen auf (Bullock, 1977; Munn, 1977; Rasheed, 1989). Symptomatisch zeigen sich Erytheme an Flossenbasen, Flossensaum und Bauch sowie am Kiemen-Isthmus mit Begleiterscheinungen wie hämorrhagischer Enteritis, Splenomegalie und Anämie.

Die Bakterien können aus den meisten inneren Organen, aus lokalisierten flächigen Hautläsionen, aus tiefen Muskelnekrosen und dem Darm isoliert werden (Colwell und Grimes, 1984; Toranzo *et al.*, 2005; Fouz *et al.*, 2010; Senderovich *et al.*, 2010). Dabei stellen sich eine blasse Leber mit weißen Flecken und vergrößerten Nieren dar (Rasheed, 1989; Saeed, 1995).

Die sogenannte Kaltwasser-Vibriose, 1979 erstmals beschrieben, wird durch *V. salmonicida* ausgelöst (Egidius *et al.*, 1981). Hierbei handelt es sich um eine systemische Infektion des Atlantischen Lachses in europäischen Marikulturanlagen. Die Infektion von Aalen (Salzwasseraalseuche) europäischer Küstengebiete sowie in Aquakulturanlagen in Europa und Fernost, verursacht durch *V. vulnificus* und *V. anguillarum*, tritt akut mit hämorrhagisch-septikämischen Symptomen und / oder als chronisch, lokalisierte entzündliche Form auf (Colwell und Grimes, 1984; Fouz und Amaro, 2003; Fouz *et al.*, 2006; Fouz *et al.*, 2010; Frans *et al.*, 2011). An der Salzwasseraalseuche (auch „rote Pest“ der Aale) kann *V. alginolyticus* beteiligt sein, der als Teil der normalen marinen Flora vorkommt (Austin, 2011). Eine durch *V. alginolyticus* ausgelöste Geschwürkrankheit, die mit der Ausbildung von Nekrosen und Granulomen verbunden ist, wurde bei Tintenfischen der Gattung *Sepia* in Japan beschrieben (Sangster und Smolowitz, 2003). *V. alginolyticus* kann als Haupterreger für Krankheiten bei Mensch und Tier (Zoonose) auftreten wie auch *V. vulnificus* Biotyp 2 (Amaro und Biosca, 1996; Krupesha Sharma *et al.*, 2011).

*V. cholerae* non-O1 wurde als fischpathogen beschrieben, obwohl das Bakterium sowohl bei kranken als auch gesunden Ayu („Silbermaulfisch“ / „kleiner Schuppen Fisch“) in Japan isoliert wurde (Colwell und Grimes, 1984).

Nicht alle durch Vibrionen ausgelösten Infektionen zeigen bei Fischen und Meeresfrüchten krankhafte Symptome. *V. parahaemolyticus* zum Beispiel kann fischpathogen sein, gehört aber bei vielen Fischarten tropischer Gewässer zur Mikroflora und kann über den Verzehr dieser Fische pathogene Auswirkungen beim Menschen haben.

Aber nicht nur Marikulturen sind von Vibriosen betroffen. Auch aus dem Darm klinisch gesunder Möwen gelang die Isolierung von *V. cholerae* O1, dem Erreger der Cholera asiatica (Ogg *et al.*, 1989). Aus Pferden, Lämmern und amerikanischen Büffeln wurden diese Bakterien ebenfalls isoliert (Rhodes *et al.*, 1985). Für Mäuse wurde eine Infektion mit *V. cholerae* beschrieben (Colwell und Grimes, 1984).

### **Mögliche Lebensräume**

Algen und Zooplankton stellen einen der wichtigsten und umfangreichsten Lebensräume für Vibrionen dar (Binsztein *et al.*, 2004; Baffone *et al.*, 2006; Mahmud *et al.*, 2007). *V. cholerae* O1 und non-O1-Serovare konnten in und auf der Oberfläche von lebenden Copepoden und auf Plankton nachgewiesen werden (Nalin *et al.*, 1979; Cole, 1982; Huq *et al.*, 1983; Doucette, 1995; Kirschner *et al.*, 2008; Martinelli *et al.*, 2011). Diesen Umstand begründeten die Autoren mit der Interaktion zwischen Bakterien und Plankton sowie Bakterien und Chitin.

Korallen können den Vibrionen als Lebensraum dienen, in dem sie im VBNC Zustand überdauern (Sharon und Rosenberg, 2010). In Amöben kann *V. cholerae* überdauern und Wachstum zeigen (Thom *et al.*, 1992; Jain *et al.*, 2006).

Chironomide (Zuckmücken)-Ei-Massen wurden als potentielles Reservoir für *V. cholerae* identifiziert (Halpern *et al.*, 2004). Die sogenannten Zuckmücken (Diptera; Chironomidae) sind weltweit verbreitet und die am häufigsten auftretende Insektengruppe in Binnengewässern (Lüder, 2007). Chironomiden-Eier, umhüllt von einer Schicht Gelatine, stellen eine nährstoffreiche Umgebung für Vibrionen dar. Die Chironomidae wiederum dienen verschiedensten Fischarten als Nahrungsquelle. Die Fische werden nachfolgend von Vögeln als Nahrung aufgenommen, wodurch es zu einem weiten Transfer von *Vibrio* spp. kommen kann. Beispielsweise kam es durch Bakterien-tragende Wasservögel und Fliegen zum Ausbruch einer Campylobacteriose in Florida (Sacks und Lieb, 1986). Hierbei gelangten ertrinkende Fliegen und fäkale Ausscheidungen von Wasservögeln in Trinkwasserquellen. Selbst aus Fliegen in Kalkutta wurden *V. parahaemolyticus* O3:K6-Stämme isoliert (Chatterjee *et al.*, 1978).

*Vibrio*-NAG-Stämme (nicht agglutinierbare *Vibrio*) wurden aus dem Darm vieler Vogelspezies, vor allem von Wasservögeln, isoliert, ohne dass klinische Symptome bei den Tieren beobachtet wurden (Ogg *et al.*, 1989; Vezzulli *et al.*, 2010). Bei Untersuchungen aus den Jahren 1986-1987 konnten bei 20 von 28 verschiedenen Wasservogelarten *V. cholerae* aus dem Kot isoliert werden (Ogg *et al.*, 1989). Da die von Wasservögeln getragenen Stämme über weite Strecken hinweg transportiert werden und klinische Erkrankungen beim Menschen verursachen können, sind Vögel bei der Suche nach Lebensräumen von Vibrionen mit zu beachten.

### 2.1.3 *Vibrio* spp.-Prävalenzen

*Vibrio* spp. kommen unter den gleichen Umweltbedingungen wie die verschiedensten Meeresfrüchte vor, so dass es ständig zu kontaminierten Fischen und Meeresfrüchten kommen kann. Neben den durch kontaminiertes Wasser ausgelösten Infektionen werden 19 % der gesamten Lebensmittelerkrankungen kontaminierten Meeresfrüchten zugeschrieben (Butt *et al.*, 2004). Mit Vibrionen kontaminierte Muscheln und Garnelen gelten daher als Vektoren für die Übertragung auf den Menschen.

Vibrionen-freie Meeresfrüchte zu ernten wird durch saisonale Temperaturschwankungen und die Anwesenheit von *Vibrio* spp. in Küstenregionen vor allem in den Sommermonaten erschwert (Crocchi *et al.*, 2001; DePaola *et al.*, 2003).

### Prävalenzen in Deutschland

In Deutschland wurden bisher hauptsächlich Fisch-, Muschel- und Krustentier-Erzeugnisse aus Einzelhandel, Großhandel und Gaststätten auf das Vorhandensein von Vibrionen untersucht. Dabei konnten in einer Probe häufig mehr als eine *Vibrio* sp. nachgewiesen werden. Im

Jahr 2001 wurden von Sieffert und Stolle (2002) aus 82 Proben von Krusten- und Schalentieren sowie deren Erzeugnissen in 19,5 % der Proben Vibrionen nachgewiesen: *V. alginolyticus* (8 %), *V. cholerae* non-O1 (3 %) und *V. parahaemolyticus* (*tdh* und *trh* negativ) sowie *V. metschnikovii*, *V. anguillarum*, *V. fluvialis* und *V. mimicus* (je 1 %).

Im Zeitraum November 2007 bis April 2008 untersuchten Judek *et al.* (2008) Muschelproben (n=50) die zu 92 % positiv getestet wurden. Die Muscheln stammten aus Berliner Einzel- und Großhandelsgeschäften sowie vom Versuchsgut des Bundesinstitutes für Risikobewertung in Berlin Marienfelde. In dieser Untersuchung waren Miesmuscheln, Scheidenmuscheln und Herzmuscheln bis zu 100 % *Vibrio* spp.-positiv. *V. alginolyticus* (69,6 %) dominierte, gefolgt von *V. fluvialis* (34,8 %) und *V. parahaemolyticus* (20 %).

Messelhäusser *et al.* (2010) fanden zwischen 2008 und 2009 in einem Probenumfang von 338 rohen und gekochten Meeresfrüchten und Fischproben in zwei Muschelproben (6,5 %), 39 Garnelen-Proben (32,2 %) und einer Fischprobe (1,6 %) Vibrionen. Dabei wurden *V. cholerae*, *V. vulnificus* und *V. parahaemolyticus* detektiert. Ein *V. parahaemolyticus*-Stamm codierte das *trh* Gen und zehn *V. cholerae*-Isolate das *toxR* Gen, jedoch keiner das *ctx* Gen.

Zwischen Oktober 2009 und Dezember 2010 wurden in 50 % von 82 Muschelproben Vibrionen detektiert (Randt *et al.*, 2011). Bei den Isolaten handelte es sich um *V. alginolyticus* (63 %), *tdh* und *trh* negative *V. parahaemolyticus* (15 %) sowie *V. cholerae* non-O1 / non-O139 und *V. metschnikovii* (5 %).

Bei Untersuchungen von Meerwasserproben, Plankton und Muscheln die direkt nach der Ernte von Muschelbänken untersucht wurden, konnten Vibrionen detektiert werden (Lehmacher und Hansen, 2007; Lhafi und Kühne, 2007; Oberbeckmann *et al.*, 2011).

In der Untersuchung von Miesmuscheln, die von sieben verschiedenen Muschelbänken aus dem Wattenmeer stammten, wurden im Zeitraum Juni 2004 bis Mai 2005 82 Proben *M. edulis* untersucht (Lhafi und Kühne, 2007). Insgesamt waren 61 Proben (74,4 %) *Vibrio* spp.-positiv. Darunter befanden sich *V. alginolyticus* (51,2 %), *V. parahaemolyticus* (39,5 %) *V. cholerae* non-O1 / non-O139 (4,7 %), *V. vulnificus* (3,5 %) und *V. harveyi* (1,2 %). In mehreren Proben konnten zwei *Vibrio* spp. nachgewiesen werden, in einer der Proben drei.

In einer Studie in der 710 Fische und Krebstierprodukte sowie Muscheln untersucht wurden, wurden in 126 Proben verschiedenste *Vibrio* spp. detektiert (Lehmacher und Hansen, 2007). In 37 Proben waren *trh* und *tdh* negative *V. parahaemolyticus* vorhanden.

Zwischen Mai 2008 und Januar 2010 wurden Meerwasserproben, *M. edulis* und Plankton aus der deutschen Nordsee im Zweiwochentakt untersucht (Oberbeckmann *et al.*, 2011). Dabei konnten dreimal freilebende Vibrionen nachgewiesen werden. Zwischen Mai und Oktober 2008 sowie Februar und Mai 2009 wurden keine Vibrionen detektiert.

Die Prävalenzdaten von Vibrionen in Meeresfrüchten aus Deutschland wurden in Tabelle 2 zusammengefasst.

**Tabelle 2: Prävalenzdaten von *Vibrio* spp. in Muscheln und Meeresfrüchten aus Deutschland**

<i>Zeitraum</i>	<i>Warengruppe</i>	<i>Proben- umfang n=</i>	<i>Positiver Nachweis</i>	<i>Vibrio spp.</i>	<i>Referenz</i>
2001	Krusten- und Schalentiere	82	19,5 %	<i>V. alg.</i> 8 %; <i>V. chol.</i> 3 %; <i>V. para.</i> , <i>V. metsch.</i> , <i>V. ang.</i> , <i>V. fluv.</i> , <i>V. mim.</i> 1 %	Sieffert und Stolle (2002)
Nov. 2007 – April 2008	Muscheln	50	92 %	<i>V. alg.</i> 69,5 %; <i>V. fluv.</i> 34,8 %; <i>V. para.</i> 20 %	Judek <i>et al.</i> (2008)
2008 - 2009	Meeresfrüchte und Fischproben	338	Muscheln 6,5 %; Garnelen 32,2 %; Fischproben 1,6 %	<i>V. chol.</i> , <i>V. vuln.</i> , <i>V. para.</i> , 1 x <i>V. para.</i> trh(+); 10 x <i>V. chol.</i> toxR (+)	Messelhäus- ser <i>et al.</i> (2010)
Okt. 2009 – Dez. 2010	Muschelproben	82	50 %	<i>V. alg.</i> 63 %; <i>V. para.</i> 15 %; <i>V. chol.</i> , <i>V. metsch.</i> 5 %	Randt <i>et al.</i> (2011)
Juni 2004 – Mai 2005	<i>M. edulis</i> von sieben Muschel- bänken	82	74,4 %	<i>V. alg.</i> 51,2 %; <i>V. para.</i> 39,5 %; <i>V. chol.</i> 4,7 %; <i>V. vuln.</i> 3,5 %; <i>V. harv.</i> 1,2 %	Lhafi und Kühne (2007)
2006-2007	Fische, Krebstier- produkte und Muscheln	710	126	<i>V. para.</i> 37 %	Lehmacher und Hansen (2007)

Die Tabelle wird auf nachfolgender Seite fortgesetzt.



Zu: Prävalenzdaten von *Vibrio* spp. in Muscheln und Meeresfrüchten aus Deutschland

<b>Zeitraum</b>	<b>Warengruppe</b>	<b>Proben- umfang n=</b>	<b>Positiver Nachweis</b>	<b><i>Vibrio</i> spp.</b>	<b>Referenz</b>
Mai 2008 – Jan. 2010	Meerwasserpro- ben, <i>M. edulis</i> und Plankton aus Nordsee	im zwei Wochen- takt	3 x freilebende <i>Vibrio</i> spp.	<i>Vibrio</i> spp.	Oberbeck- mann <i>et al.</i> (2011)

*M. edulis*: *Mytilus edulis*, *V. alg.*: *Vibrio alginolyticus*, *V. ang.*: *Vibrio anguillarum*, *V. chol.*: *Vibrio cholerae*, *V. fluv.*: *Vibrio fluvialis*, *V. metsch.*: *Vibrio metschnikovii*, *V. mim.*: *Vibrio mimicus*, *V. para.*: *Vibrio parahaemolyticus*

### Prävalenzen in anderen EU-Staaten

An der dänischen Küste untersuchten Hoi *et al.* (1998) zwischen Mai 1996 und Oktober 1996 Muscheln, Wasser, Sediment und Fische, wobei sie *V. vulnificus* fanden.

An der italienischen Adria wurden von September 1997 bis Januar 1998 insgesamt 62 Proben *Mytilus galloprovincialis* untersucht (Ripabelli *et al.*, 1999). In 48,4 % der Proben wurden verschiedene *Vibrio* spp. detektiert. Darunter befanden sich *V. alginolyticus* (32,2 %), *V. vulnificus* (17,7 %), *V. cincinnatiensis* (3,2 %), *V. parahaemolyticus* (1,6 %), *V. fluvialis* (1,6 %) und *V. cholerae* non-O1 (1,6 %). In den Proben konnte häufiger mehr als eine *Vibrio* sp. nachgewiesen werden.

Im selben Jahr wurden an der spanischen Küste vor Valencia Vibrionen-Konzentrationen zwischen  $3 \times 10^2$  Kolonie-bildende Einheiten pro Gramm (KbE/g) und  $5 \times 10^5$  KbE/g in Muscheln detektiert (Arias *et al.*, 1999). Dabei ergab sich folgende Aufteilung: *V. splendidus* (36 %), *V. harveyi* (19 %), *V. mediterranei* (11 %), *V. pelagius* (6 %), *V. tubiashii* (5 %) sowie *V. alginolyticus*, *V. orientalis*, *V. diazotrophicus* und *V. anguillarum* (alle unter 5 %).

Croci *et al.* (2001) isolierten aus *Mytilus galloprovincialis*, *Tapes decussatus*, *Crassostrea virginica* und Meerwasserproben aus der Adria in einem 2-jährigen Studienzeitraum 726 Bakterienstämme. Insgesamt waren 46,9 % der Bakterienstämme Vibrionen. Im Sommer wurden zu ca. 54,4 % Vibrionen detektiert, in der Wintersaison ca. 12,5 % weniger. Nachgewiesen wurden *V. alginolyticus* (31,8 %), *V. parahaemolyticus* und *V. vulnificus* (4,7 %), *V. cholerae* non-O1 (0,6 %) und *Photobacterium damsela* (5,1 %).

Die Prävalenzdaten von Vibrionen in Meeresfrüchten aus anderen EU-Staaten wurden in Tabelle 3 zusammengefasst.

Tabelle 3. Prävalenzdaten von *Vibrio* spp. in Muscheln und Meeresfrüchten aus anderen EU-Staaten

<i>Zeitraum</i>	<i>Warengruppe / Herkunft</i>	<i>Vibrio</i> spp.	<i>Referenz</i>
Mai 1996 – Okt. 1996	Muscheln, Wasser, Sedi- ment und Fische an däni- scher Küste	<i>V. vulnificus</i>	Hoi <i>et al.</i> (1998)
Sept. 1997 – Jan. 1998	<i>Mytilus galloprovincialis</i> n = 62 an italienischer Adria	<i>Vibrio</i> spp. 48,4 %; <i>V. alg.</i> 32,2 %; <i>V. vuln.</i> 17,7 %; <i>V. cin.</i> 3,2 %; <i>V. chol.</i> , <i>V. fluv.</i> , <i>V. para.</i> , 1,6 %	Ripabelli <i>et al.</i> (1999)
1997-1998	Muscheln an spanischer Küste vor Valencia	Konz. zwischen $3 \times 10^2$ KbE/g und $5 \times 10^5$ KbE/g <i>V. splen.</i> 36 %; <i>V. harv.</i> 19 %; <i>V. mediterr.</i> 11 %; <i>V. pelag.</i> 6 %; <i>V. tub.</i> 5 %; <i>V. alg.</i> , <i>V. orien.</i> , <i>V. diaz.</i> , <i>V. ang.</i> 5 %	Arias <i>et al.</i> (1999)
2 Jahre	<i>Mytilus galloprovincialis</i> , <i>Tapes decussatus</i> , <i>Crassostrea virginica</i> und Meerwasserproben	726 Bakterienstämme; <i>Vibrio</i> spp. 46,9 %; <i>V. alg.</i> 31,8 %; <i>V. para.</i> , <i>V. vuln.</i> 4,7 %; <i>V. chol.</i> 0,6 %; <i>Photo-</i> <i>bacterium damsela</i> 5,1 %	Croci <i>et al.</i> (2001)

*V. alg.*: *Vibrio alginolyticus*, *V. ang.*: *Vibrio anguillarum*, *V. chol.*: *Vibrio cholerae*, *V. cin.*: *Vibrio cincinnatiensis*; *V. diaz.*: *Vibrio dizotrophicus*; *V. fluv.*: *Vibrio fluvialis*, *V. harv.*: *Vibrio harveyi*; *V. mediterr.*: *Vibrio mediterranei*; *V. metsch.*: *Vibrio metschnikovii*, *V. mim.*: *Vibrio mimicus*, *V. orien.*: *Vibrio orientalis*; *V. para.*: *Vibrio parahaemolyticus*; *V. pelag.*: *Vibrio pelagius*; *V. tub.*: *Vibrio tubiashii*

### Prävalenzen in Nicht-EU-Staaten

In den USA wurden seit 1991 verschiedene Untersuchungen zu *Vibrio* spp. in Austern durchgeführt (Wright *et al.*, 1996; Cook *et al.*, 2002). Zwischen April 1991 und Dezember 1992 untersuchten Wright *et al.* (1996) Austern aus der Chesapeake Bay auf *V. vulnificus*. Dabei wurde *V. vulnificus* in Konzentrationen  $1,0 \times 10^3$  KbE/g bis  $4,7 \times 10^4$  KbE/g fast das ganze Jahr über in den Austern nachgewiesen, nur im Zeitraum Februar und März 1992 wurden keine *V. vulnificus* detektiert.

Cook *et al.* (2002) haben zwischen Juni 1998 und Juli 1999 in den USA und Kanada insgesamt 350 Austernchargen aus Restaurants, von Fischmärkten und vom Großhandel auf das

Vorkommen von *V. vulnificus* und *V. parahaemolyticus* hin untersucht. Dabei haben sie in einer Probe, die sich aus zehn bis zwölf Austern zusammensetzte, weder *V. vulnificus* noch *V. parahaemolyticus* detektiert. In jeder anderen Probe detektierten sie entweder eine dieser beiden Spezies oder beide Spezies. Wright *et al.* (1996) zeigten schon zuvor eine 100 %- Auffindungsrate von *Vibrio* spp. in Austern. Auch DePaola *et al.* (2003) fanden in allen Austern-Proben, die sie im Zeitraum März 1999 bis September 2000 nach Anreicherung untersuchten, *V. parahaemolyticus*.

In einer norwegischen Studie wurden von Juli 2002 bis September 2004 in 102 *M. edulis* Proben *V. alginolyticus* (24,5 %), *V. parahaemolyticus* (10,3 %), *V. cholerae* (1 %) und *V. vulnificus* (in einer Probe nach direktem Ausplattieren) detektiert (Bauer *et al.*, 2006). In Proben von der Südküste wurde in mehr als der Hälfte der 13 Proben *V. parahaemolyticus* nachgewiesen, nachdem die Wassertemperatur auf über 16 °C angestiegen war. Insgesamt waren vier *V. parahaemolyticus*-Stämme *trh* positiv. Alle neun detektierten *V. cholerae*-Stämme waren non-O1 / non-O139 und *ctxA* negativ.

Die Prävalenzdaten von Vibrionen in Meeresfrüchten aus Nicht-EU-Staaten wurden in Tabelle 4 zusammengefasst.

**Tabelle 4: Prävalenzdaten von *Vibrio* spp. in Muscheln und Meeresfrüchten aus Nicht-EU-Staaten**

<i>Zeitraum</i>	<i>Warengruppe / Herkunft</i>	<i>Probenumfang n=</i>	<i>Positiver Nachweis</i>	<i>Vibrio spp.</i>	<i>Referenz</i>
April 1991 – Dez. 1992	Austern aus der Chesapeake Bay		1,0x10 <sup>3</sup> KbE/g bis 4,7x10 <sup>4</sup> KbE/g	<i>V. vuln.</i>	Wright <i>et al.</i> (1996)
Juni 1998 – Juli 1999	Austernchargen aus Restaurant, Fischmarkt und Großhandel aus USA, Kanada	350	bis auf eine Probe alle positiv	<i>V. vuln.</i> ; <i>V. para.</i>	Cook <i>et al.</i> (2002)
März 1999 – Sept. 2000	Austernproben		nach Anreicherung 100 %	<i>V. para.</i>	De Paola <i>et al.</i> (2003)

Die Tabelle wird auf nachfolgender Seite fortgesetzt.

Zu: Prävalenzdaten von *Vibrio* spp. in Muscheln und Meeresfrüchten aus Nicht-EU-Staaten

<b>Zeitraum</b>	<b>Warengruppe / Herkunft</b>	<b>Probenum- fang n=</b>	<b>Positiver Nach- weis</b>	<b><i>Vibrio</i> spp.</b>	<b>Referenz</b>
Juli 2002 – Sept. 2004	<i>Mytilus edulis</i> aus Norwegen	102		<i>V. alg.</i> 24,5 %, <i>V. para.</i> 10,3 %; <i>V. chol.</i> 1 %; <i>V. vuln.</i> (1x nach ausplattieren)	Bauer <i>et al.</i> (2006)

*V. alg.*: *Vibrio alginolyticus*, *V. chol.*: *Vibrio cholerae*, *V. para.*: *Vibrio parahaemolyticus*, *V. vuln.*: *Vibrio vulnificus*

Zusammen genommen zeigen die weltweit durchgeführten Studien, dass die Detektionsrate der verschiedenen *Vibrio* spp. saisonal, also temperaturabhängig zu sein scheint. So detektierten z. B. Ripabelli *et al.* (1999) zwischen September bis Januar 48,4 % *Vibrio* positive Proben, dagegen fanden Lhafi und Kühne (2007) zwischen Juni bis Mai 74,4 %.

Alle Untersuchungen zum Vorkommen von Vibrionen in Fischen und Meeresfrüchten deuten auf eine hohe Prävalenz hin.

#### 2.1.4 Meldepflicht

In Deutschland besteht eine namentliche Meldepflicht für den Krankheitsverdacht, die Erkrankung sowie den Tod an Cholera (§6 IfSG).

Hinzukommend muss, soweit nicht anders bestimmt, der direkte oder indirekte Nachweis von *Vibrio cholerae* O1 und O139 namentlich gemeldet werden (§7 IfSG).

#### 2.1.5 *Vibrio* spp. im EU-Recht

Im EU-Recht sind derzeit keine rechtlichen Bestimmungen zum Nachweis von *Vibrio* spp. in Lebensmitteln verankert. Eine einheitliche Empfehlung für mikrobiologische Kriterien hinsichtlich Vibrionen in Fischen und Meeresfrüchten ist weltweit nicht gegeben und wird von etlichen Ländern unterschiedlich gehandhabt (Tab. 5).

**Tabelle 5: Internationale Grenz- und Warnwerte für *Vibrio* spp.**  
(nach SCVPH 2004)

<i>Vibrio</i> -Spezies	Land/Organisation	Warengruppe	Limits			
			<i>n</i>	<i>c</i>	<i>m</i>	<i>M</i>
<i>V. cholerae</i>	USA/FDA (1998)	Verzehrfertige Meeresfrüchte	-	-	Abwesenheit von toxischen O1 und non O1-Stämmen	
	UK/PHLS	Verzehrfertige Lebensmittel (Einzelhandel)	-	-	Nicht nachweisbar in 25 g	
<i>V. parahaemolyticus</i>	ICMSF (1998)	Frischer oder gefrorener Fisch, kalt geräucherter Fisch	5	2	100/g	1.000/g
		Gefrorene / gekochte Krustentiere	5	1	100/g	1.000/g
		Gekochtes, gekühltes und gefrorenes Krabbenfleisch, frische und gefrorene Muscheln	10	1	100/g	1.000/g
	NL/Produktschap voor Vis en Visproducten (1994)	Rohe, gekochte, frische oder gefrorene Hummer, Krabben und Garnelen (Einzelhandel)	-	-	-	100/g
	UK/PHLS	Verzehrfertige Lebensmittel (Einzelhandel)	-	-	≥ 1.000/g nicht akzeptabel	
	USA/FDA (1998)	Verzehrfertige Meeresfrüchte	-	-	10.000/g (Aktionslevel)	
	USA/Interstate Shellfish Sanitation Conference (2009)	Verzehrfertige Meeresfrüchte (Einzelhandel)	-	-	Nicht nachweisbar (<30 MPN/g)	
Japan (CODEX, 2003)	Meeresfrüchte im Rohverzehr			> 100 MPN/g nicht akzeptabel		
<i>V. vulnificus</i>	USA/FDA (1998)	Verzehrfertige Meeresfrüchte	-	-	Abwesenheit von pathogenen Stämmen (Mausassay)	
	USA/Interstate Shellfish Sanitation Conference (2009)	Verzehrfertige Meeresfrüchte (im Einzelhandel)	-	-	Nicht nachweisbar (<30 MPN/g)	

*n* = Anzahl der Probeneinheiten der Stichprobe; *c* = Anzahl der Probeneinheiten, deren Werte über *m* oder zwischen *m* und *M* liegen; *m* = Grenzwert; *M* = Warnwert

## 2.1.6 Nachweisverfahren

### Mikrobiologisches Nachweisverfahren

Um Vibrionen in Lebensmittel- und Umweltproben nachzuweisen wird in der Regel eine selektive, teilweise auch zweistufige Voranreicherung, gefolgt von Ausstrichen auf selektiven Festnährmedien und einer anschließenden morphologischen und biochemischen Charakterisierung durchgeführt.

Anwendung als selektives Festnährmedium findet vor allem Thiosulfate-Zitrat-Gallensalz Saccharose-Agar (TCBS-Agar). TCBS enthält zur Hemmung von grampositiven Bakterien Ochsengalle. Der alkalische pH-Wert von 8,6 begünstigt die Kultivierung von Vibrionen. Die Detektion der Saccharose-Fermentation ermöglicht eine Differenzierung von *Vibrio*-Spezies. Dabei bilden die *Vibrio* spp., die zur Saccharose-Fermentation fähig sind, wie z. B. *V. cholerae*, *V. alginolyticus* und einige *V. parahaemolyticus*-Stämme, gelbe Kolonien. Andere *V. parahaemolyticus*-Stämme sind, wie auch *V. vulnificus* und *V. mimicus*, nicht in der Lage, Saccharose zu metabolisieren. Sie bilden kleine blau-grüne Kolonien.

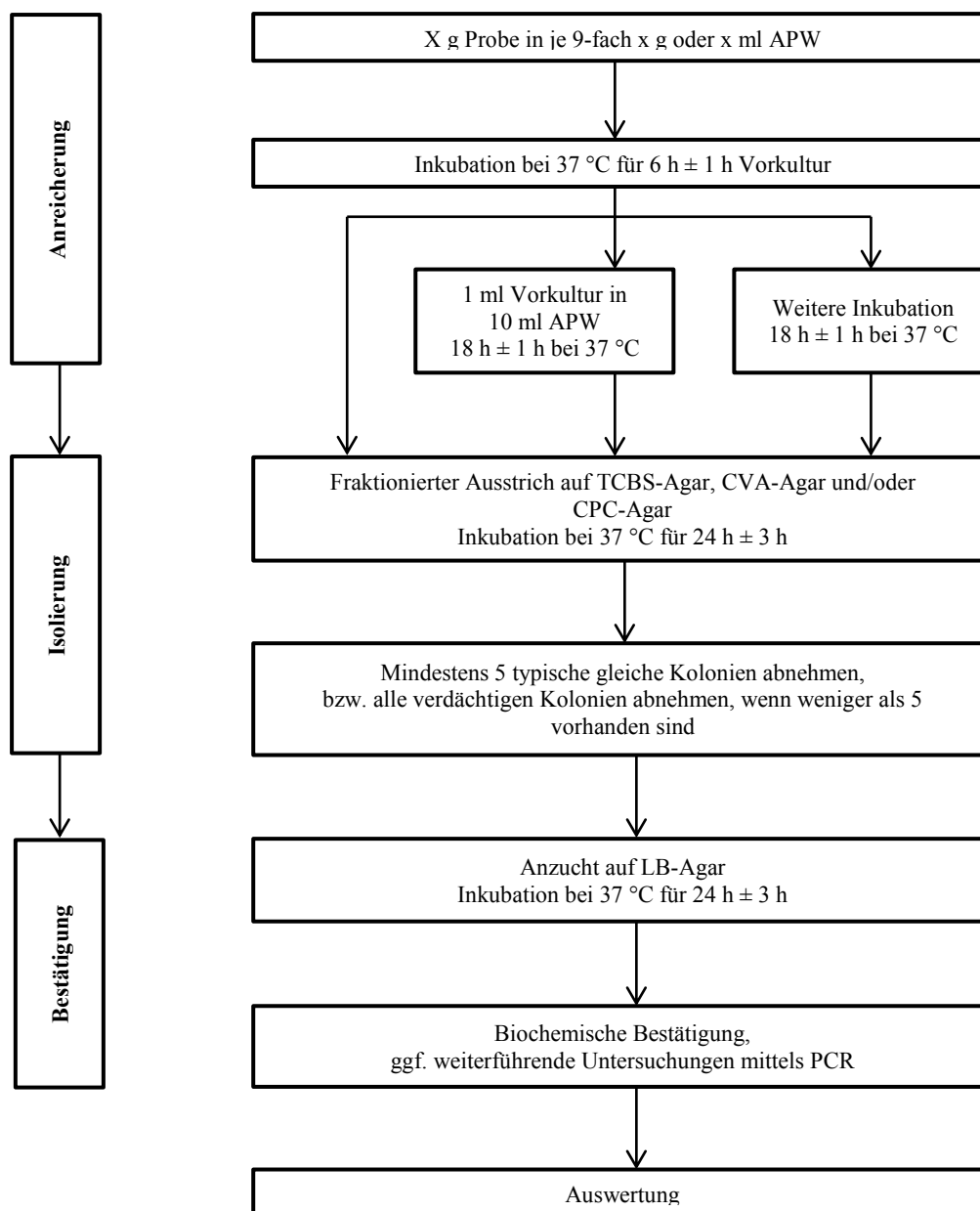
Für eine farbliche Speziesunterscheidung kann Chrom-Vibrio-Agar (CV-Agar) oder Cellobiose-Polymixin B-Colistin-Agar (CPC) verwendet werden. CV-Agar ist ein chromogenes Selektivmedium, auf dem sich Kolonien von *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae* und *V. vulnificus* farblich voneinander unterscheiden. Su *et al.* (2005) und Di Pinto *et al.* (2011) haben für den Nachweis von *V. parahaemolyticus* auf CV-Agar eine höhere Sensitivität und Spezifität ermittelt, als für TCBS-Agar. Ähnliches zeigten auch Duan und Su (2005) für die Detektion von *V. parahaemolyticus* in Seewasser, Sediment und Austern. Eddabra *et al.* (2011) evaluierten chromID<sup>TM</sup> *Vibrio*-Medium, das bei ihren Untersuchungen zur Detektion von *V. cholerae* und *V. parahaemolyticus* bessere Ergebnisse erzielte als TCBS.

Im Gegensatz dazu zeigte Schets (2012), dass es beim Nachweis von *Vibrio* spp. in Seewasser und Muscheln auf TCBS-Agar zu einer genaueren Wiedergabe von Koloniewachstum kommt als auf CV-Agar, bei dem sich mehr falsch-positive non-*Vibrio* Kolonien zeigten.

CV-Agar scheint sich vor allem für Untersuchungen zu eignen, in denen mehrere unterschiedliche *Vibrio* spp. zu erwarten sind, wie etwa in Lebensmittel- oder Umweltproben.

Als Flüssigmedien zur Verdünnung bzw. Anreicherung von Probenmaterial, in dem Vibrionen vorhanden sein können, stehen alkalisches Peptonwasser (APW) und 1 % Peptonwasser (EPW) zur Verfügung. Das Anreicherungsmedium EPW eignet sich zur direkten Detektion von *V. cholerae* aus Umweltproben (Malayil *et al.*, 2011). In dieser Studie wurde gezeigt, dass *V. cholerae* unter Verwendung von APW in nur 10 % untersuchter Proben detektiert werden konnte, wohingegen *V. cholerae* unter Verwendung von EPW in 40 % der Proben nachgewiesen wurde. Für die Wiederfindungsrate von *V. cholerae* bedeutet dies, dass *V. cholerae* nach Anreicherung in EPW um das 4-fache öfter detektiert wird als nach Anreicherung in APW. Allerdings wurde das Cholera-Toxin *ctxA* unter Verwendung von APW und EPW in allen Fällen gleich oft detektiert. Malayil *et al.* (2011) wiesen außerdem darauf hin, dass sich *V. vulnificus* in APW besser regeneriert als in EPW. Diese Studien zeigten Unterschiede zwischen Toxin codierenden und nicht-codierenden *V. cholerae* Stämmen sowie eine unterschiedlich schnelle Rekonvaleszenz verschiedener *Vibrio* spp. auf.

Bis auf wenige Ausnahmen werden die Nährmedien und Bouillons bei 37 °C für 24±3 Stunden bebrütet. Im Falle einer zweistufigen Voranreicherung wird die erste Anreicherung bei 37 °C, die von tiefgefrorenen Produkten bei 41,5 °C für 6±1 Stunde inkubiert (Abb. 1).



**Abbildung 1: Fließschema zur konventionellen Kultivierung von *Vibrio parahaemolyticus* und *Vibrio cholerae* (gemäß ISO/TS 21872-2:2007)**

Für die weitere Differenzierung und Identifizierung aller *Vibrio* spp. werden biochemische Tests durchgeführt (Tab. 6).

**Tabelle 6: Eigenschaften von *Vibrionaceae***  
(modifiziert nach Alter *et al.*, 2012)

	<i>V. cholerae</i>	<i>V. mimicus</i>	<i>V. metschnikovii</i>	<i>V. vulnificus</i>	<i>V. alginolyticus</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>
<b>TCBS-Agar</b>	gelb	grün	gelb/grün	grün	gelb	grün/gelb
<b>Oxidase</b>	+	+	-	+	+	+
<b>Gram-Verhalten</b>	-	-	-	-	-	-
<b>Stäbchen/Kokken</b>	Stäbchen	Stäbchen	Stäbchen	Stäbchen	Stäbchen	Stäbchen
<b>Beweglichkeit</b>	+	+	+	+	+	+
<b>OF-(Glucose)-Test</b>	F	F	F	F	F	F
<b>Wachstum bei 42 °C</b>	+	+	+/-	+	+	+
<b>in APW</b>						
<b>Morphologie auf Schafblut-Agar</b>	Mittelgroß grauweiß, β-Hämolyse					
<b>O/129-Test (10 µg / 150 µg)</b>	S/S	S/S	S/S	S/S	R/S	R/S
<b>1 % PW, 0 % NaCl</b>	+	+	-	-	-	-
<b>1 % PW, 1 % NaCl</b>	+	+	+	+	+	+
<b>1 % PW, 3 % NaCl</b>	+	+	+	+	+	+
<b>1 % PW, 8 % NaCl</b>	-	-	+/-	-	+	+
<b>1 % PW, 10 % NaCl</b>	-	-	-	-	+	-

Wachstum auf TCBS-Agar nach 24 h bei 37 °C;

Gram-Verhalten im KOH-Test: Fadenbildung = gram-negativ; homogene Suspension = gram-positiv;

OF-Test-Glucose: Bebrütung 2-4 Tage bei 37 °C, F: Fermentativer Glucoseabbau

Vibriostatikum O/129 Blättchentest auf Schafblut-Agar für 24 h bei 37 °C, S: sensibel, R: resistent;

Wachstum in Peptonwasser mit 0, 1, 3, 8, 10 % NaCl bei 37 °C, 24 h

Die kulturellen Methoden sind in der ISO/TS 21872-2007 zusammengefasst.

## Molekularbiologisches Nachweisverfahren

### PCR zur Speziesdetektion

Hohe Prävalenzen von Vibrionen in Fischen und Meeresfrüchten bestätigen die Notwendigkeit, bei Untersuchungen von Lebensmittelproben auch *Vibrio* spp. zu detektieren. Für die Identifikation von *Vibrio*-Isolaten existieren multiplex PCR (mPCR)-Systeme, mit denen die drei bis fünf wichtigsten humanpathogenen *Vibrio* spp. detektiert werden.

Ein verbreitetes mPCR-System ist die PCR nach Bauer und Rorvik (2007), bei der *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae* und *V. vulnificus* mittels des *toxR* Gen detektiert werden. In der mPCR nach Espineira *et al.* (2010) werden vier *Vibrio* spp. nachgewiesen, dabei wird



*V. cholerae* anhand von *ctxA*, *V. parahaemolyticus* durch *tlh*, *V. vulnificus* und *V. alginolyticus* anhand von *dnaJ* nachgewiesen.

Bei der von Tarr *et al.* (2007) publizierten mPCR Methode werden ebenfalls vier verschiedene Spezies erfasst, statt *V. alginolyticus* aber *V. mimicus*. Dabei werden andere Zielgene genutzt: *V. cholerae* und *V. mimicus* über *sodB*, *V. parahaemolyticus* über *flaE* und *V. vulnificus* über *hsp*.

Eine weitere Alternative bietet das mPCR-System, in dem das Collagenase codierende Gen der Spezies *V. alginolyticus*, *V. cholerae* und *V. parahaemolyticus* detektiert wird (Di Pinto *et al.*, 2005). Diese PCR fand bereits Anwendung in einer Untersuchung von kontaminierten Fischen und Meeresfrüchten (Di Pinto *et al.*, 2006). Eine tabellarische Aufstellung der hier genannten mPCR-Systeme ist unter Punkt 4.3.1 (Tab. 17) zu finden.

### **PCR zur Identifikation von Serogruppen und Virulenzfaktoren**

Verschiedene Serogruppen codieren unterschiedliche Oberflächenantigene (O-Antigene) und können durch die Anwesenheit dieser differenziert werden.

Für *V. cholerae* wird zwischen den pathogenen Serogruppen O1 und O139 sowie zwischen weiteren O-Antigen tragenden pathogenen und nicht-pathogenen Serogruppen unterschieden. Zusätzlich können über die Detektion von Toxin codierenden Genen, wie beispielsweise *ctx* und *tcpA*, Rückschlüsse auf die Pathogenität eines Stammes gezogen werden (Rivera *et al.*, 2001; Rivera *et al.*, 2003; Espineira *et al.*, 2010).

Für *V. parahaemolyticus* werden mittels serologischer Reaktionen Oberflächen- (O-) und Kapselbildende- (K-) Antigene detektiert. Chen *et al.* (2012) haben ein PCR-System zur Detektion der O-Antigene, O1 bis O13, veröffentlicht. Zusätzlich kann über die Detektion der Hämolyse gene *tdh* und *trh* die Virulenz eines Stammes beurteilt werden (Markoulatos *et al.*, 2002; Myers *et al.*, 2003; Kim und Bang, 2008). Eine tabellarische Aufstellung solcher mPCR-Systeme, ist unter Punkt 4.3.1 (Tab. 18) zu finden.

## **2.2 *Vibrio* spp.**

### **2.2.1 *Vibrio parahaemolyticus***

#### **Vorkommen und Charakteristika**

*V. parahaemolyticus* ist ein gram-negatives, kommaförmig gebogenes, begeißeltes Stäbchenbakterium, das halophil ist und weltweit in flachen warmen Küstengewässern der Ozeane vorkommt. Diese Spezies wird anhand unterschiedlicher O- und K-Antigene in verschiedene Gruppen eingeteilt.

Diese Spezies gehört zu den bedeutendsten humanpathogenen *Vibrio*-Spezies. Auf TCBS-Agar bildet *V. parahaemolyticus* nach 20-24 Stunden Inkubation bei 37 °C grüne Kolonien mit einem Durchmesser von ca. 1-2 mm aus, wobei einige Stämme zur Saccharose-Fermentation fähig sind und daher auch gelbe Kolonien ausbilden können.

*V. parahaemolyticus* bevorzugt NaCl-Konzentrationen zwischen 1 % und 8 %. Bereits in zehn bis zwölf Minuten kann diese Spezies einen Generationszyklus vollziehen und in drei bis vier Stunden von zehn KbE bis hin zu einer Million KbE angereichert sein (Barker, 1974). Dieser Organismus kann in Fischen und Meeresfrüchten überleben, die keiner ausreichenden Erhitzungstemperatur ausgesetzt waren (Vanderzant und Nickelson, 1972). Besonders in Japan, aber auch in anderen Ländern wurden in den letzten Jahren viele Lebensmittelinfektionen in Zusammenhang mit mit *V. parahaemolyticus*-verunreinigten Meeresfrüchten gebracht, die entweder roh oder ungenügend erhitzt verzehrt wurden (Butt *et al.*, 2004; Velazquez-Roman *et al.*, 2012). Die minimale Infektionsdosis für *V. parahaemolyticus* beträgt in der Regel  $10^4$  KbE bis  $10^5$  KbE (Joseph *et al.*, 1982).

### Krankheitscharakteristika

Fische und Meeresfrüchte, die humanpathogene *V. parahaemolyticus* enthalten, können nach Verzehr innerhalb von vier Stunden bis zu vier Tagen zu Gastroenteritiden mit starken Koliken, Übelkeit, Erbrechen und Abdominalschmerz, wässrigem bis teils blutigem Durchfall, Darmkrämpfen und Fieber führen (Powell, 1999). Eine oft allgemeine Mattigkeit wird begleitet von Kopfschmerzen. Eine ausgebildete Gastroenteritis gilt als selbstlimitierend.

Einige Patienten zeigen Komplikationen wie Austrocknung, Herzrhythmusstörungen und Kollaps (Iida *et al.*, 2006). Besonders bei immungeschwächten Personen und Leberzirrhotikern können Septikämien und Wundinfektionen auftreten (Hlady und Klontz, 1996).

Eine Infektion kann am besten verhindert werden, wenn man den Verzehr von rohem Fisch, etwa Sushi und rohen Muscheln vermeidet.

### Klassifikation

Die Detektion der verschiedenen OK-Serotypen, sowie der Virulenz-Faktoren TDH (thermostable direct hemolysin) und TRH (thermostable-related hemolysin) ermöglicht eine Unterteilung der Spezies in mehrere Gruppen. Bis 2007 waren 76 OK-Serotypen, abgeleitet von dem somatischen Lipopolysaccharid (O) und dem Kapselpolysaccharid (K), bekannt (Drake *et al.*, 2007; Lehmacher und Hansen, 2007). Die wichtigsten Virulenz-Faktoren bilden das TDH und das TDH-related hemolysin (TRH), welche jeweils durch das zugehörige *tdh*- / *trh*-Gen kodiert sind (Nishibuchi und Kaper, 1995). Die codierte TRH-Sequenz kann in TRH1 und TRH2 unterschieden werden, die zu 84 % identisch sind (Kishishita *et al.*, 1992). Beide Virulenz-Faktoren (TDH / TRH) können zur Ausbildung einer Gastroenteritis führen, indem sie die Sekretion von Chlorid-Ionen in das Darmlumen stimulieren, was einen starken Flüssigkeitsverlust (Durchfall) zur Folge hat.

Über die Detektion der Hämolysegene *tdh* und *trh* kann man die Virulenz eines Stammes beurteilen (Iida *et al.*, 1998; Espineira *et al.*, 2010).

### ***V. parahaemolyticus* O3:K6**

Der bedeutsamste pandemische Klon ist derzeit der *V. parahaemolyticus* O3:K6, der das thermostabile direkte Hämolyisin (TDH) bildet und seit 1996 weltweit verbreitet ist (Chowdhury *et al.*, 2000). Dieser Serotyp zeigt das sogenannte Kanagawa-Phänomen (KP), bei dem auf Wagatsuma-Agar eine  $\beta$ -Hämolyse ausgebildet wird, die auf eine starke Produktion von TDH zurückzuführen ist. Das Serovar O3:K6 wurde erstmals im Februar 1996 in Kalkutta isoliert und hat als pandemischer Klon bereits zu etlichen Krankheitsausbrüchen in verschiedenen Ländern wie Indien, Afrika, Bangladesch, Chile, Frankreich, Japan, Korea, Laos, etc. geführt (Okuda *et al.*, 1997; Ansaruzzaman *et al.*, 2005; Nair *et al.*, 2007). Die schnelle Ausbreitung des O3:K6-Serotypen führte nach 1996 zur ersten beschriebenen *V. parahaemolyticus*-Pandemie.

Ansaruzzaman *et al.* (2005) berichteten darüber, dass zehn andere Serotypen (O4:K68, O1:K25, O1:K41, O1:KNT [NT nicht typisierbar], O1:K56, O3:K75, O4:K8, O4:K12, O4:KNT und O5:KNT) aus dem O3:K6 Serotypen entstanden sind, wobei den Serotypen O4:K68 und O1:KNT eine besondere Bedeutung zugeschrieben wird. Diese Serotypen wurden bereits mit Infektionen in Verbindung gebracht (Nair *et al.*, 2007).

### **2.2.2 *Vibrio cholerae***

#### **Vorkommen und Charakteristika**

*V. cholerae* ist ein gram-negatives, kommaförmig gebogenes, begeißeltes Stäbchenbakterium, das anhand unterschiedlicher O-Antigene in über 100 Serovare unterteilt wird. Dabei gehört das Serovar O1 zu den bedeutsamsten Cholera verursachenden Serovaren. *V. cholerae* O1-Stämme können in zwei unterschiedliche Biovare differenziert werden: Biovar „Klassisch“ des klassischen Koch-Kommabazillus, das sehr virulent ist und zu dem *V. cholerae* Cholerae gehört, und das Biovar „El Tor“, das weniger virulent ist. Das Cholera-Toxin kann von beiden Biovaren gebildet werden. Zusätzlich können auch Stämme des Serovars O139 das Cholera-Toxin bilden (Johnson *et al.*, 1994).

Die Cholera ist in von Flutkatastrophen betroffenen Regionen endemisch, wobei schlechte hygienische Bedingungen eine entscheidende Rolle bei der Ausbreitung spielen. Eine positive Korrelation zwischen Monsunzeiten und Cholera-Ausbrüchen konnte beobachtet werden (Glass *et al.*, 1982). In Teilen Asiens, Afrikas und Südamerikas werden regelmäßig auftretende Infektionen beschrieben, z. B. in der Demokratischen Republik Kongo (2011), auf Haiti (2010), in Pakistan (2010), Zentralafrika (2010) und Zimbabwe (2008) (WHO, 2011a; 2011b). Jährlich infizieren sich drei bis fünf Millionen Menschen mit Cholera, die in 100 Tausend bis 120 Tausend Fällen tödlich verläuft (WHO, 2011c). Im Jahr 2011 traten 2,8 Millionen Fälle mit 91 Tausend Toten in Cholera-endemischen Gebieten auf und ungefähr 87 Tausend Fälle mit 2.500 Toten in nicht-endemischen Ländern (Ali *et al.*, 2012). Von 148 Ländern wurden 51 Länder (z. B. Afghanistan, Bangladesch, Kambodscha, China, Gambia und Ghana) in der Studie von Ali *et al.* (2012) als endemisch klassifiziert, 18 (darunter

einige Länder in Nordamerika und Westeuropa) als nicht endemisch. Bleiben Infizierte unbehandelt, so wird eine hohe Mortalitätsrate beobachtet (ca. 50 %). Hierbei sind alle Altersgruppen in etwa gleich betroffen (Gunnlaugsson *et al.*, 1998; Deen *et al.*, 2008).

Im Jahr 2011 wurden dem RKI vier Erkrankungen an Cholera in Deutschland gemeldet (RKI, 2012a). Dabei erkrankte eine 17-Jährige während einer Pakistan-Reise, zwei Frauen im Alter von 33 und 60 Jahren während einer Reise in die Dominikanische Republik und eine 25-jährige Frau in Indien, während ihrer Tätigkeit in einer karitativen Einrichtung. 2010 wurden dem RKI (2011) in Deutschland sechs Erkrankungen an Cholera übermittelt. Vier Kinder und eine 81-jährige Frau erkrankten unmittelbar nach einer Pakistan-Reise, wo infolge großflächiger Überflutungen seit August 2010 vermehrt *V. cholerae*-Infektionen diagnostiziert wurden. Von diesen fünf Erkrankten starb ein neun Monate altes Kind. Außerdem erkrankte ein 80-jähriger Mann nach einer Indienreise, wie zuvor bereits zwei Personen im Jahr 2007 (RKI, 2010). Im Jahr 2004 erkrankten drei Personen nach Aufenthalt in Thailand (eine) und Indien (zwei). In den Jahren 2011 und 2012 (bis Anfang August) wurde jeweils eine in Deutschland erworbene *V. cholerae*-Infektion bekannt (Neifer, 2012). Der letzte Cholera-Ausbruch in Deutschland fand 1892 in Hamburg statt (Hays, 2005).

Am häufigsten wird Cholera durch fäkal-kontaminiertes Trinkwasser, Muscheln, Meeresfrüchte und andere planktonfressende Seetiere übertragen (Sumner und Ross, 2002). Auch über den Verzehr und die Handhabung kontaminierter Fische kann Cholera ausgelöst werden (Holt *et al.*, 1994; Dalsgaard *et al.*, 1995; Gopal *et al.*, 2005).

In Süßwasser und auch in Salzwasser (mit NaCl-Konzentrationen bis zu 3 %) kann *V. cholerae* wochenlang überleben, Biofilme bilden und sich vermehren (Alam *et al.*, 2006; Faruque *et al.*, 2006).

### **Krankheitscharakteristika**

Die Ansteckung erfolgt fäkal-oral durch kontaminierte Lebensmittel, insbesondere verunreinigtes Trinkwasser (Holt *et al.*, 1994; Dalsgaard *et al.*, 1995; Gopal *et al.*, 2005). Nach der Magenpassage findet eine massive Vermehrung im alkalischen Dünndarm-Milieu mit der Bildung des Exotoxins Cholera-Toxin, dem wichtigsten Virulenz-Faktor von *V. cholerae* statt. Cholera ist eine Erkrankung der Darmschleimhaut, die zu sehr häufigem Erbrechen und Durchfällen führt. Sie kann aber auch nur zu leichten Durchfällen oder zu gar keinen Beschwerden führen, selbst symptomfreie Träger sind möglich (Felsenfeld, 1966). Während einer Infektion kann *V. cholerae* mit den Exkrementen des Infizierten ausgeschieden werden, dies ermöglicht eine Infektion über den Stuhl der Erkrankten (Muller, 1977; Jones, 1999). Alle Gegenstände, die mit dem kontaminierten Stuhl verunreinigt sind, können Infektionsquellen darstellen.

Häufig zeigen nur 20 % der Betroffenen akute Erkrankungserscheinungen, bei den anderen 80 % sind in der Regel nur milde Symptome ausgebildet (WHO, 2011c). Erste Anzeichen der Erkrankung sind schlagartig beginnende Durchfälle, die als reiswaasserartig beschrieben

werden (Gorbach *et al.*, 1970). Durch die Wirkung des enterotoxischen Cholera-Toxins kann es zu einem enormen Flüssigkeitsverlust durch den Darm kommen, der mit dem Verlust lebenswichtiger Mineralien einhergeht (Moss und Vaughan, 1979; Cooper *et al.*, 1981). Dieser starke Elektrolytverlust kann zu Kreislaufproblemen führen. Ohne Behandlung sterben die meisten Erkrankten innerhalb von ein bis sechs Tagen.

*V. cholerae* kann aber nicht nur im Zusammenhang mit Gastroenteritiden detektiert, sondern auch aus Wundinfektionen isoliert werden (Torres *et al.*, 2002; Andersson und Ekdahl, 2006; Frank *et al.*, 2006; Anonym, 2010a; Tena *et al.*, 2010).

### **Klassifikation**

*V. cholerae* wird aufgrund von O-Antigenen in verschiedene Serovare unterteilt. Innerhalb des Serovars O1 wird zwischen verschiedenen Serogruppen unterschieden, die alle das somatische Lipopolysaccharid-Antigen O1 gemein haben, sich aber in drei somatischen Partialantigenen (a, b, c) unterscheiden und dadurch in drei Varianten vorkommen. Die Inaba-Variante, der das Partialantigen b fehlt, die Ogawa-Variante die nur wenig Antigen c besitzt und die Hikojima-Variante, welche alle drei Partialantigene trägt (Stroher *et al.*, 1992). Üblicherweise wird aber vor allem zwischen den Biovaren „Klassisch“ und „El Tor“ unterschieden.

### **Pathogenitätsfaktoren**

Das enterotoxische Cholera-Toxin ist identisch mit dem hitzelablen Toxin von *E. coli*, das zytotoxisch wirkt und einen Flüssigkeitsausstrom vom Darmlumen in den Darm verursacht (Williams, 2000). Dieses Toxin besteht aus einer alpha- und beta-Untereinheit. Durch die Bindung an den Gangliosid-Rezeptor kommt es zu einer irreversiblen Aktivierung der Adenylat-Cyclase (Vaughan und Moss, 1978; Moss und Vaughan, 1979; Cooper *et al.*, 1981). Diese irreversible Aktivierung führt zur Ausschüttung von hohen Konzentrationen zyklischen Adenosin-Mono-Phosphates. Dadurch findet eine gesteigerte Ausschüttung von Chlorid-Ionen statt, dem das Wasser aufgrund von Osmose folgt, woraus wiederum massive Durchfälle resultieren. Gleichzeitig wird die Aufnahme von Natriumchlorid aus dem Darm inhibiert. Die Serovare O1 und O139 gelten als pathogen. Aber auch andere Serovare wie zum Beispiel der Serotyp O75 kann zu Infektionen über den Verzehr von kontaminierten Lebensmitteln führen, wie 2011 in Florida durch den Verzehr kontaminierter Austern (FDA, 2011).

Die Infektionsdosis zur Auslösung einer Cholera-Infektion wird mit  $10^7$ - $10^8$  KbE angegeben. Einige Autoren berichten jedoch über sehr viel niedrigere minimale Infektionsdosen von  $10^3$  KbE (Tschäpe, 2000; Kothary und Babu, 2001; Schmid-Hempel und Frank, 2007). *V. cholerae* wird seit 1817 als weltweit pandemisch beschrieben (Emch *et al.*, 2008; Webb, 2011). Das natürliche Erregerreservoir ist der Mensch. Seit 1961 breitet sich die siebte Cholera-Pandemie weltweit aus, die durch das Serovar O1 Biovar „El Tor“ dominiert wird. Die

letztbekannte große Cholera-Epidemie erlebt Haiti seit Oktober 2010, die ebenfalls durch das Serovar O1 Biovar „El Tor“ ausgelöst wurde (CDC, 2012). Seit einigen Jahren zirkuliert in Südasien allerdings auch das Serovar O139 als Auslöser der Cholera, das 1992 erstmals in Bangladesch identifiziert wurde (Albert *et al.*, 1993; WHO, 2011c).

### 2.2.3 *Vibrio vulnificus*

#### Vorkommen und Charakteristika

*V. vulnificus* ist ein gram-negatives, kommaförmig gebogenes, begeißeltes Stäbchenbakterium, das in drei Biotypen mit unterschiedlicher Pathogenität vorkommt (Bisharat *et al.*, 1999; Linkous und Oliver, 1999). Biotyp 1 kann zu humanen Infektionen führen und das RTX Toxin ausbilden (Kim *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2008; Lo *et al.*, 2011). Dieser Biotyp wird unterschieden in C- und E-Genotypen (Warner und Oliver, 2008; Froelich *et al.*, 2010; Rosche *et al.*, 2010). Biotyp 2 wird als fischpathogen bezeichnet (Fouz *et al.*, 2010), kann aber wie Biotyp 3 auch über den Umgang mit Fischen zu Human-Infektionen führen (Hoi *et al.*, 1998; Bisharat *et al.*, 1999). Lebensmittel- oder Wundinfektionen wären die Folge.

In Europa nimmt die Bedeutung von *V. vulnificus* immer mehr zu. Die gemeldeten Fälle von Wundinfektionen, hervorgerufen durch *V. vulnificus*, haben in den letzten Jahren an Aufmerksamkeit gewonnen (Torres *et al.*, 2002; Kregel *et al.*, 2003; Frank *et al.*, 2006; Anonym, 2009; 2010a).

#### Krankheitscharakteristika

Für diese Infektionen wird eine hohe Mortalitätsrate von 50-80 % beschrieben (Park *et al.*, 1991; Hlady und Klontz, 1996; Mead *et al.*, 1999). Durch Septikämien kann der Tod innerhalb von 24 Stunden nach dem Kontakt mit dem Bakterium eintreten (Hlady und Klontz, 1996; Strom und Paranjpye, 2000). Hautmanifestationen in Form von hämorrhagischen Blasen und nekrotischen Veränderungen können auftreten, die häufig Amputationen erforderlich machen oder zu Septikämien mit Symptomen wie Fieber, Hypotonie, Übelkeit, Erbrechen, Durchfall und Bauchschmerzen führen (Gulig *et al.*, 2005). Weiterhin können Pneumonien und Gastroenteritiden infolge der Infektion auftreten (Tacket *et al.*, 1984; Chuang *et al.*, 1992; Warnock und MacMath, 1993).

In sterilem Seewasser vermehrt sich *V. vulnificus* bei Temperaturen von 13 °C bis 22 °C, wobei das Optimum bei 14 °C liegt (Kaspar und Tamplin, 1993).

*V. vulnificus* kann in Verbindung mit Zooplankton, Austern, Küstenwasser, Muscheln, Sediment und freies organisches Material im Meer gefunden werden (Hoi *et al.*, 1998). Im Darm und anderen Geweben von Muscheln und Austern konnten Konzentrationen von  $10^3$ - $10^6$  KBE/g *V. vulnificus* detektiert werden (Motes *et al.*, 1998). Außerdem konnte *V. vulnificus* in vielen Meeresbewohnern, die sich von Austern und Muscheln ernähren, nachgewiesen werden (DePaola *et al.*, 1994).

## Klassifikation

*V. vulnificus* wird anhand der Virulenzfaktoren in virulente und nicht virulente Stämme unterschieden (Rodrigues *et al.*, 1992; Linkous und Oliver, 1999). Das Vorhandensein von DNase, Chitinase, Amylase, Lecithinase und Chelatinase sowie die Fähigkeit zur Kapselbildung wurde beschrieben. Außerdem Elastase, Collagenase und Chondroitinase, die aber nicht regelmäßig vorkommen. Durch Kapselbildung kann *V. vulnificus* der Phagozytose des Wirtsmechanismus entgehen, da die Phagozyten keine Rezeptoren für Kapselpolysaccharide besitzen (Amako *et al.*, 1984; Hayat *et al.*, 1993; Simonson und Siebeling, 1993). Die Auslösung der Kallikrein-Kinin-Kaskade z. B. über Metalloproteasen (beschrieben für Biotyp 1 und 2) führt zur vermehrten Bildung von Bradikinin, das über die Bindung an Bradikinin-Rezeptoren zu einer erhöhten Gefäßpermeabilität führt (Miyoshi und Shinoda, 1992; Maruo *et al.*, 1998; Watanabe *et al.*, 2004). Bei Wundinfektionen dringt der Erreger über Hautläsionen in den Körper ein, gelangt durch Perforation der Zell- und Gefäßwände in den Blutkreislauf und führt zur Sepsis mit Fieber, Unwohlsein und Hypotonie (Tacket *et al.*, 1984). In über 90 % der Fälle ist der Erreger systemisch, also im Blut nachweisbar (Strom und Paranjpye, 2000). Über eine minimale Infektionsdosis kann nur spekuliert werden, da bei immunsuppressiven Menschen bereits Dichten von  $10^2$  KbE von *V. vulnificus* Infektionen auslösen können (FDA, 2012).

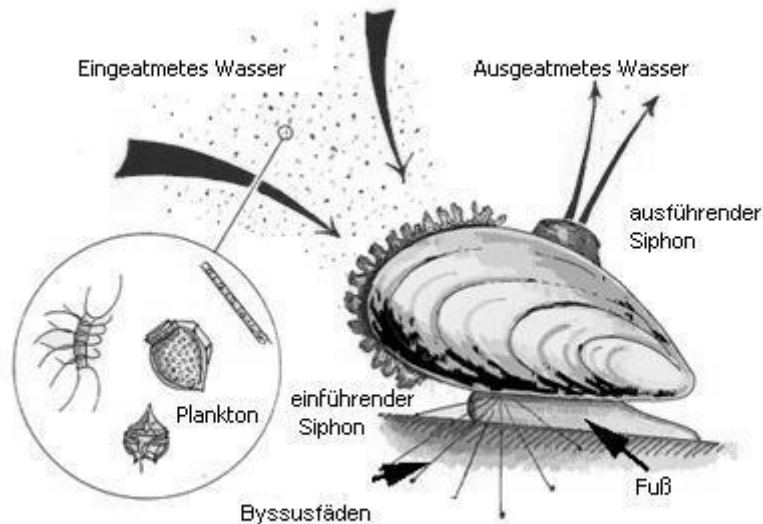
Zur Risikogruppe, bei denen *V. vulnificus* leichter Infektionen auslösen kann, gehören Menschen mit Leberschäden oder Immunsuppression z. B. bei Diabetes oder AIDS (Koenig *et al.*, 1991; Bross *et al.*, 2007; Hau und Ho, 2011). Bei leberkranken Menschen besteht eine bis zu 30-fach höhere Infektionsgefahr als bei gesunden Menschen, die Todesrate ist 200-fach höher (Kizer, 1994).

## 2.3 *Bivalvia* spp.

### 2.3.1 *Mytilus edulis*

Miesmuscheln (*Mytilus edulis*, Linnaeus 1758 [Mytilidae]) werden auch als Pfahlmuscheln bezeichnet (FAO, 2004-2012). Aufgrund der zwei Schalen werden sie der weltweit verbreiteten Gattung *Bivalvia* zugeordnet (Gosling, 2007). Sie haben eine graue bis blau-violette Schale, eine Länge von etwa fünf bis zehn Zentimeter und sind von länglicher ovaler Form. Aufgrund ihrer Farbe werden sie im englischen Sprachgebrauch als „blaue Muscheln“ (blue mussels) bezeichnet. In Bezug auf die Salztoleranz weisen *M. edulis* je nach Herkunft eine weite Anpassungsspanne auf. Sie tolerieren Salzgehalte zwischen 11 ‰ und 40 ‰, wobei für ihre Entwicklung der Herkunftssalzgehalt der Eltern eine entscheidende Rolle spielt (Bayne, 1965; Theede und Lassig, 1967; Lehnberg und Theede, 1979). Unterschieden wird zwischen Nachkommen mariner Eltern mit Entwicklung in Gewässern mit einem Salzgehalt zwischen 30 ‰ und 40 ‰ und solchen von Brackwassermuttertieren mit Entwicklung in Brackwasser mit einem Salzgehalt zwischen 11 ‰ bis 30 ‰ Salzgehalt.

*M. edulis* wächst weltweit in Uferzonen. In Aquakulturanlagen und Muschelfeldern werden sie gezüchtet und geerntet. Wie alle anderen Muscheln ernährt sich die Miesmuschel von Schwebstoffen und Plankton (Gosling, 2007). Die Nahrungsaufnahme erfolgt in Form von Filtration über die Kiemen (Abb. 2).



**Abbildung 2: Muschelatmung und Nahrungsaufnahme**  
(modifiziert nach [Aquascope](http://www.vattenkikaren.gu.se/fakta/arter/mollusca/bivalvia/mytidul/mytifile.html), mit freundlicher Genehmigung von Lars-Ove Loo  
[www.vattenkikaren.gu.se/fakta/arter/mollusca/bivalvia/mytidul/mytifile.html](http://www.vattenkikaren.gu.se/fakta/arter/mollusca/bivalvia/mytidul/mytifile.html))

Im Normalfall filtriert *M. edulis* Nahrungspartikel, das sogenannte Seston, aus dem Wasser (Bayne *et al.*, 1987). Seston beschreibt eine in der Wassersäule vorliegende, aus verschiedenen organischen Partikeln zusammengesetzte Suspension. Organische Partikel können in diesem Zusammenhang Algen, Plankton und Bakterien sowie beispielsweise Detritus aus der Umgebung sein. Da sich Bakterien an Plankton, organische und anorganische Partikel anheften können, kann es bei deren Aufnahme zu einer Akkumulation der Bakterien in den Muscheln kommen (Doucette, 1995). Die Selektion der Partikelgröße ist dabei durch die Kiemenfäden (Cilien) der Miesmuschel beeinflusst, wobei eine Mindestgröße von 1 µm vorliegen muss (Jorgensen, 1975; Winter, 1978). Zwischen 2 µm und 6 µm Partikelgröße filtriert *M. edulis* am besten. Bei der Filtration von Meerwasser werden oftmals auch Plastikpartikel aufgenommen, an denen sich Toxine wie Schwermetall-Ionen und Pestizide sowie Viren akkumulieren können. Durch die Möglichkeit der Akkumulation verschiedener Pathogene (Bakterien und Viren) kann es vorkommen, dass die Muschel diese passiv auf den Menschen überträgt.

*M. edulis* kann in einer Stunde bis zu 1,5 Liter Wasser filtrieren, *Crassostrea* spp. (Austern) können im gleichen Zeitraum bis zu sechs Liter filtrieren (Riisgard, 1988). Beeinflusst wird das Filtrationsvermögen durch Umweltparameter wie Sauerstoff- und Partikelkonzentration (Widdows *et al.*, 1979). Auch ist die Filtrationsrate von der Umgebungstemperatur, dem



Hungerzustand sowie der Größe des Individuums abhängig (Riisgard *et al.*, 2006; Gosling, 2007). Verschiedenste Studien zur Filtrationsleistung von Muscheln zeigen, dass *M. edulis* die Filtration einschränken, sobald  $10^7$  Zellen pro Liter vorliegen, und dass ab dieser Dichte die Produktion von Pseudofaeces beginnt (Thompson und Bayne, 1972).

Im Zusammenhang mit der Filtrationsleistung der Muscheln spielt die Clearance Rate (CR) eine bedeutende Rolle. Sie beschreibt das Wasservolumen, das durch die Filtration nach einer bestimmten Zeiteinheit vollständig von Partikeln befreit ist. In einer Studie von Widdows *et al.* (1979) wurde beschrieben, dass die CR mit zunehmender Partikelkonzentration anfangs stark steigt, sich dann aber auf einem Maximalniveau von 1,4 Litern pro Stunde einpendelt. Diese 1,4 Liter pro Stunde entsprechen einem Trockengewicht von 0,07 mg Algen pro Tag (für *Phaeodactylum tricornutum* ungefähr  $10^6$  Zellen).

### 2.3.2 Rechtsgrundlagen zur Handhabung von *Bivalvia*

Die gesetzlichen Anforderungen bzw. Vorschriften zum Umgang mit lebenden Muscheln widmen sich der Ernte, der Reinigung und dem Inverkehrbringen von Muscheln lt. Verordnung (EG) Nr. 853/2004 (Anonym, 2004a).

Die Klassifizierung von Erntegebieten ist in der Verordnung (EG) Nr. 854/2004 festgelegt und beinhaltet spezifische Vorschriften für die amtliche Überwachung von Erzeugnissen tierischen Ursprungs, die für den menschlichen Gebrauch bestimmt sind (Anonym, 2004b). Diese Klassifizierung basiert auf den Gehalten des Indikatorkeimes *E. coli* in 100 g Probenmaterial von Meeresfrüchten. Die als Muschelerzeugungsgebiete ausgewiesenen Flächen werden je nach Ausmaß ihrer Verunreinigung mit Fäkalbakterien in drei Kategorien eingeteilt. Diese Kategorisierung entscheidet über die Verkehrsfähigkeit der aus diesen Gebieten gewonnenen Muscheln. Gebiete, aus denen lebende Muscheln für den unmittelbaren Verzehr geerntet werden dürfen werden in die Klasse A eingestuft. Bei diesen Muscheln dürfen in 25 g Muschelfleisch keine Salmonellen nachgewiesen werden. Gebiete, aus denen die Muscheln zwar geerntet, aber erst nach Aufbereitung in einem Reinigungszentrum bzw. nach Einbringen in ein Umsetzungsgebiet für den unmittelbaren Verzehr gewonnen werden dürfen, werden in die Klassen B und C eingestuft. Weiterhin müssen Muscheln auf Toxine untersucht werden, die von Dinoflagellaten produziert werden. Dinoflagellaten sind einzellige Algen, die sowohl im Salz- als auch im Süßwasser vorkommen.

Des Weiteren müssen Fischereierzeugnisse in geeigneten Anlagen in schmelzendem Eis gelagert werden, neues Eis muss so oft wie nötig nachgefüllt werden und die Transportbehältnisse müssen so beschaffen sein, dass die Fischereierzeugnisse nicht mit dem Schmelzwasser in Berührung bleiben (BMELV, 2009).

Empfohlen wird, lebende Muscheln in feuchten Gewebesäcken und Vakuumverpackungen zu vermarkten (Fehlhaber *et al.*, 2007). In feuchter Jute sollen die Muscheln bei 2 °C bis 10 °C eine Haltbarkeit von ca. einer Woche aufweisen. In Vakuumverpackungen soll eine längere Haltbarkeit gewährleistet werden, genauere Zeitangaben finden sich hierzu aber nicht.

### 2.3.3 Hälterung von *Bivalvia*

Muscheln sollen, bevor sie nach der Ernte zum Verkauf in die Läden gelangen, zur Entsandung für ca. zwei bis 14 Tage in Reinigungsbecken verbracht werden (Fehlhaber *et al.*, 2007). Nach Fehlhaber *et al.* (2007) soll in diesen Reinigungszentren eine deutliche Keimreduzierung stattfinden, wobei die Virusbelastung geringer abnimmt.

Bei diesem als Hälterung bezeichneten Prozess werden die Muscheln in einem Becken mit reinem / sauberem Seewasser unter Bedingungen gehalten, die die maximale Filtrationsaktivität der Muscheln anregen, sodass es zur Reinigung kommen kann. Die Hälterung stellt eine effektive Methode dar, um Verunreinigungen aus den Muscheln zu entfernen. Verunreinigungen stellen in diesem Zusammenhang Bakterien (*Vibrio* spp., *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., *Shigella* spp.), Viren (Norovirus, Hepatitis A-Virus) oder marine Biotoxine dar. Wobei die marinen Biotoxine Vergiftungen, wie das paralytic shellfish poisoning (PSP), diarrhetic shellfish poisoning (DSP), amnesic shellfish poisoning (ASP), neurotoxic shellfish poisoning (NSP) auslösen können. Zu den Verunreinigungen zählen des Weiteren Chemikalien und Schwermetalle (Blei, Cadmium, Dioxine, Pestizide).

Die Anforderungen an die Hälterung von Muscheln in den USA sind im National Shellfish Sanitation Program (NSSP) genauer beschrieben als in der EU-Gesetzgebung (FDA, 2009).

#### **Hälterungssysteme**

Im Folgenden sind Hälterungssysteme (Umluft, Durchfluss, Statisch) aus verschiedenen Ländern dargestellt (Tab. 7) (FAO, 2008).

Generell erfolgt die Hälterung von Schalentieren durch die Platzierung der Tiere in fließendem, artifiziellem oder normalem Seewasser über einen bisher nicht definierten Zeitraum. Dabei sollen die Tiere ihre normale Filtrationsaktivität wieder aufnehmen und dadurch die Verunreinigungen aus den Kiemen und dem Darm-Trakt entfernen.

**Tabelle 7: Hälterungssysteme aus verschiedenen Länder**

Nach FAO Fisheries Technical Paper 511 (Bivalve depuration: fundamental and practical aspects 2008 - Depuration in selected countries as of December 2006)

<i>Land</i>	<i>Spezies</i>	<i>Hälterungssysteme</i>	<i>Desinfektion</i>
China	Muscheln und Austern	Umluft; Durchfluss	UV; Ozon
Frankreich	<i>C. gigas</i> ; <i>M. edulis</i> ; <i>M. galloprovincialis</i> ; <i>O. edulis</i> ; <i>Cerastoderma edule</i> ; <i>R. decussatus</i> ; <i>T. philipinarum</i>	Statisch; Umluft; Durchfluss	UV; Ozon; Chlor; Belüftung
Irland	<i>C. gigas</i> ; <i>M. edulis</i> ; <i>O. edulis</i>	Umluft	UV; Brunnenwasser
Italien	<i>T. philippinarum</i> ; <i>M. galloprovincialis</i> ; <i>Charnelea gallina</i>	Umluft; Durchfluss	UV; Ozon; Chlor
Malaysia	<i>C. iredalei</i> ; <i>C. belcheri</i>	Umluft	UV
Marokko	<i>C. gigas</i> ; <i>R. decussatus</i> ; <i>M. galloprovincialis</i> ; <i>P. perna</i>	Statisch; Umluft	UV; Chlor
Niederlande	<i>M. edulis</i> ; <i>C. gigas</i> ; <i>O. edulis</i>	Umluft; Durchfluss	UV oder nicht desinfiziert
Philippinen	<i>C. iredalei</i> ; <i>P. viridis</i>	Statisch; Durchfluss?	UV; Ozon; Chlor; PVP-Jod
Portugal	<i>R. decussatus</i> ; <i>Ostrea</i> spp.; <i>C. angulate</i> ; <i>Mytilus</i> spp.	Statisch; Umluft; Durchfluss	UV; Chlor
UK	<i>Mytilus</i> spp.; <i>C. gigas</i> ; <i>O. edulis</i> ; <i>T. philippinarum</i> ; <i>Cerastoderma edule</i>	Umluft; Durchfluss	UV
Japan	Austern und Jakobsmuscheln	Statisch; Umluft; Durchfluss	UV; Ozon; Chlor; Elektrolyse
Spanien - Galizien	Miesmuscheln, Venusmuscheln, Herzmuscheln, Austern	Umluft; Durchfluss	Chlor

*C.*: *Crassostrea*; *M.*: *Mytilus*; *O.*: *Ostrea*; *P.*: *Perna*; *R.*: *Ruditapes*; *T.*: *Tapes*

Generell muss eine mikrobiologische Überprüfung vor und nach der Hälterung erfolgen. In Deutschland dürfen in Stichproben nach der Hälterung nicht mehr als 230 KBE *E. coli* in 100 g Muschelfleisch und Schalenflüssigkeit nachgewiesen werden (VO [EG] Nr. 853/2004). In den USA wird auf die Abwesenheit von *V. cholerae* O1 und non-O1 in verzehrfertigen Meeresfrüchten hin untersucht (Punkt 2.1.5, Tab. 5). Hinsichtlich *V. parahaemolyticus* werden verzehrfertige Meeresfrüchte bis zu einem Aktionslevel von 10.000/g toleriert, und bezüglich *V. vulnificus* werden verzehrfertige Meeresfrüchte auf die Abwesenheit von pathogenen Stämmen bzw. das Vorhandensein von unter 30 MPN/g hin untersucht (Punkt 2.1.5, Tab. 5).

### 2.3.4 Bakterien in Organen von *Bivalvia* und / oder anderen Meeresfrüchten

Wenn Bakterien bei der Nahrungsaufnahme von Muscheln und Meeresfrüchten aufgenommen werden, kann es zur Anreicherung der filtrierten Bakterien in verschiedenen Organen der Muscheln und Meeresfrüchte kommen (Doucette, 1995). Die Muscheln und Meeresfrüchte, die keine pathologischen Erscheinungen aufzeigen, werden zu passiven Überträgern dieser Bakterien. Verschiedene Studien beschrieben eine Anreicherung von Bakterien in Mitteldarmdrüsen, Hämolymphe, Kiemen oder bestimmten Geweben von Fischen und Meeresfrüchten (Töbe *et al.*, 2004; Johne *et al.*, 2011).

Beschrieben wurden solche Anreicherungen bei *M. edulis* im Darmtrakt (Töbe *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2010) und der Mitteldarmdrüse (Johne *et al.*, 2011). In Fischen findet man sie in Hämolymphe, Hepatopankreas, auf der Haut, in den Kiemen und im Darm (Thaithongnum *et al.*, 2006). Auch bei Schrimps, z. B. *Penaeus* spp., sind bakterielle Anreicherungen im Hepatopankreas, der Hämolymphe und dem Verdauungstrakt zu finden (Lightner und Redman, 1981; Gomez-Gil *et al.*, 1998). Des Weiteren können sie im Hepatopankreas, dem Mantel und den Kiemen von Venusmuscheln (Yue *et al.*, 2011) sowie in der Hämolymphe von Krabben (Sizemore *et al.*, 1975; Tubiash *et al.*, 1975; Brandin und Pistole, 1985) und Hummern (Hitchner und Snieszko, 1947; Raissy *et al.*, 2011) nachgewiesen werden. Einige Studien untersuchten die Anreicherung nur in bestimmten Organen, da es in diesen zu einer stärkeren Anreicherung gegenüber dem übrigen Gewebe kommt, so z. B. in den Mitteldarmdrüsen bei Muscheln (Johne *et al.*, 2011). Andere Studien zeigten dagegen eine gleichmäßige Verteilung von *V. vulnificus* in Kiemen-Gewebe, Mantel-Gewebe und Mitteldarmdrüse von Austern (Froelich *et al.*, 2010). Für Austern, die häufig roh verzehrt werden, wurde nach Kontamination mit *V. vulnificus* eine Konzentrierung im Verdauungstrakt nach drei Tagen beschrieben (Tamplin und Capers, 1992). Da Vibrionen den Abwehrmechanismen von Muscheln größtenteils entgehen, können sie in Muschelgewebe und Hämolymphe verbleiben (Hubert *et al.*, 1996; Croci *et al.*, 2002; Pruzzo *et al.*, 2005; Defer *et al.*, 2009).

## 2.4 Studien nach artifizierter Kontamination von Muscheln und Meeresfrüchten mit *Vibrio* spp. und / oder anderen Bakterien

### 2.4.1 Kontaminationsstudien

Im folgenden Abschnitt wurden Studien zur artifizierten Kontamination von Muscheln und Meeresfrüchten mit *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* und / oder anderen Bakterien zusammengetragen.

#### *V. cholerae*

Kontaminationsversuche mit *V. cholerae* non-O1 in *Mytilus (M.) galloprovincialis* zeigten eine rasche Akkumulation der Bakterien in den Muscheln mit Erreichen der höchsten Konzentration nach einer Stunde (Marino *et al.*, 2005). Die maximale Konzentration von *V. cholerae* non-O1 reichte von  $5 \times 10^6$  KbE/g bis  $1 \times 10^7$  KbE/g bei Temperaturen von ca. 14 °C bzw. 21 °C.

Dass es zu unterschiedlichen Akkumulationskonzentrationen innerhalb einer Spezies kommen kann, wiesen Collin *et al.* (2012) nach. Sie kontaminierten *M. edulis* mit drei verschiedenen *V. cholerae*-Stämmen und zeigten, dass marine Stämme schneller und besser akkumuliert wurden als klinische, aber auch schneller ausgeschieden wurden als die klinischen Stämme.

#### *V. parahaemolyticus*

Shen *et al.* (2009) kontaminierten Austern mit *V. parahaemolyticus* und detektierten die höchste *V. parahaemolyticus*-Konzentration nach 32 Stunden bei 32 °C mit  $4,6 \times 10^6$  MPN/g. Die Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass die Akkumulation von *V. parahaemolyticus* in Austern temperaturabhängig zu sein scheint, denn je höher die Temperatur lag, desto mehr *V. parahaemolyticus* konnte in den Austern detektiert werden. Die ebenfalls bestehende Möglichkeit einer temperaturabhängigen Vermehrung der Bakterien in der Muschel bzw. im Wasser wurde in diesem Zusammenhang nicht diskutiert.

In einer Studie von Wang *et al.* (2010) in der ebenfalls Austern mit *V. parahaemolyticus* inkubiert wurden, wurde die höchste Vibriolen-Konzentration nach 24 Stunden in den Mitteldarmdrüsen mit  $2,8 \times 10^4$  KbE/g nachgewiesen, gefolgt von der Konzentration in den Kiemen mit  $8,9 \times 10^3$  KbE/g.

In homogenisierten *Arcidae* (Archenmuscheln) zeigte *V. parahaemolyticus* eine Akkumulation in den ersten 12 Stunden mit Anreicherungsichten von  $1,1 \times 10^3$  MPN/g bei 9 °C bis zu  $1,9 \times 10^5$  MPN/g bei 33 °C (Liu *et al.*, 2010). Bis zu 48 Stunden blieben die Konzentrationen bei Temperaturen über 16 °C konstant, während die *V. parahaemolyticus*-Zellzahl bei 9 °C um  $1,8 \times 10^2$  MPN/g abnahm.

Lopez-Joven *et al.* (2011) zeigten, dass in zwei Stunden in *Ruditapes* spp. *V. parahaemolyticus*-Konzentrationen von  $10^5$  KbE/ml bis  $10^6$  KbE/ml erreicht wurden.

### **Andere Bakterienspezies**

Die Kontamination von *M. edulis* mit *E. coli*, zeigte eine Akkumulation von *E. coli* innerhalb der ersten halben Stunde (Mesquita, 1988).

Marino *et al.* (2005) führten Kontaminationsversuche mit *E. coli* und *Enterococcus (En.) durans* in *M. galloprovincialis* durch und zeigten hierbei ebenfalls eine rasche Akkumulation der Bakterien in den Muscheln mit Erreichen der höchsten Konzentration nach einer Stunde. Die maximale Konzentration von *E. coli* betrug  $6 \times 10^6$  KbE/g bei 14 °C und  $4 \times 10^5$  KbE/g bei 21 °C. *En. durans* erreichte Konzentrationen von  $5 \times 10^6$  KbE/g bis  $1 \times 10^7$  KbE/g bei Temperaturen von ca. 14 °C bzw. 21 °C.

Diese angeführten Studien zeigen, dass Muscheln und Austern, Vibrionen und / oder andere Bakterien sehr schnell durch Filtration aus kontaminiertem Seewasser aufnehmen können und eine Akkumulation in verschiedenen Organen stattfinden kann. Die detaillierten Ergebnisse der beschriebenen Studien wurden in Tabelle 8 zusammengefasst.

Tabelle 8: Akkumulationsstudien von *Vibrio* spp. und / oder anderen Bakterien in Muscheln und Meeresfrüchten

Spezies	Meeresfrüchte	Inokulum	Temperaturbedingungen	Akkumulation	Referenz
<i>V. cholerae</i> non-O1, <i>E. coli</i> , <i>En. durans</i>	<i>M. galloprovincialis</i>	5x10 <sup>10</sup> KbE/ml in 200 Litern	14 °C, 21 °C	<ul style="list-style-type: none"> <li>1 h <i>E. coli</i> 14 °C 6x10<sup>6</sup> KbE/g, 21 °C 4x10<sup>5</sup> KbE/g</li> <li>1 h <i>V. cholerae</i> non-O1 u. <i>En. durans</i> 14 °C und 21 °C 5x10<sup>6</sup> KbE/g bis 1x10<sup>7</sup> KbE/g</li> </ul>	Marino <i>et al.</i> (2005)
drei verschiedene <i>V. cholerae</i>	<i>M. edulis</i>	5x10 <sup>5</sup> Bakterien/ml in 2,5 Litern	18 °C	<ul style="list-style-type: none"> <li>Akkumulation mariner <i>V. cholerae</i> Stämme schneller und stärker, als die Akkumulation klinischer Stämme</li> <li>Ausscheidung mariner Stämme schneller, als die klinischer St.</li> </ul>	Collin <i>et al.</i> (2012)
	Austern	10 <sup>4</sup> KbE/ml in 50 Litern	16 °C, 20 °C, 26 °C, 32 °C	<ul style="list-style-type: none"> <li>32 h bei 32 °C 4,6x10<sup>6</sup> MPN/g</li> </ul>	Shen <i>et al.</i> (2009)
	Austern	10 <sup>6</sup> KbE/ml in ca. 67 Litern	17 °C bis 19 °C	<ul style="list-style-type: none"> <li>24 h in MDD 2,8x10<sup>4</sup> KbE/g, in Kiemen 8,9x10<sup>3</sup> KbE/g</li> </ul>	Wang <i>et al.</i> (2010)
<i>V. parahaemolyticus</i>	homogenisierte Ar- chenmuscheln	10 <sup>4</sup> KbE/ml in 50 Litern	9 °C, 16 °C, 23 °C, 27 °C, 33 °C	<ul style="list-style-type: none"> <li>stärkste Akkumulation in 12 h bei 33 °C</li> <li>bei 16 °C, 23 °C, 27 °C, 33 °C blieben Konzentrationen bis zu 48 h konstant</li> <li>bei 9 °C sank die Zellzahl um 1,8x10<sup>2</sup> MPN/g</li> </ul>	Liu <i>et al.</i> (2010)
	<i>Ruditapes</i> spp.	10 <sup>5</sup> KbE/ml bis 10 <sup>6</sup> KbE/ml Tankwasser	16 °C bis 18 °C	<ul style="list-style-type: none"> <li>innerhalb von 2 h</li> </ul>	Lopez-Joven <i>et al.</i> (2011)
<i>E. coli</i>	<i>M. edulis</i>	10 <sup>2</sup> / 10 <sup>4</sup> bis 10 <sup>6</sup> KbE pro 100 ml in 150 Litern	15 °C	<ul style="list-style-type: none"> <li>innerhalb der ersten 30 min</li> </ul>	Mesquita (1988)

*E. coli*: *Escherichia coli*; *En. durans*: *Enterococcus durans*; MDD: Mitteldarmdrüsen, St.: Stämme

## 2.4.2 Hälterungsstudien

Studien zur Hälterung von Muscheln und Meeresfrüchten nach artifizieller Kontamination mit *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* und / oder anderen Bakterien wurden im folgenden Abschnitt zusammengetragen.

### *V. cholerae*

Marino *et al.* (2005) untersuchten die Hälterung von *M. galloprovincialis*, die mit *V. cholerae* kontaminiert waren. In 168 Stunden verringerte sich die Anzahl der Bakterien langsam aber kontinuierlich. Bei der alleinigen Kontamination mit *V. cholerae* non-O1 wurde *V. cholerae* nach 144 Stunden bei 14 °C nicht mehr nachgewiesen, während der Erreger bei 21 °C zu diesem Zeitpunkt noch in niedriger Konzentration nachweisbar war.

In einer 44 Stunden andauernden Hälterung von *M. galloprovincialis* zeigte *V. cholerae* eine wesentlich langsamere, geringere Reduktion (ca. 1 log) gegenüber *E. coli* (ca. 3 log) (Crocchi *et al.*, 2002).

### *V. parahaemolyticus*

Wang *et al.* (2010) kontaminierten Austern mit *V. parahaemolyticus* und hielten diese für 14 Tage. Dabei detektierten sie die höchste Vibriolen-Konzentration in den Mitteldarmdrüsen. Nach 14 Tagen lagen noch 0,5 log bis 1,0 log KbE/g vor.

Liu *et al.* (2010) untersuchten zusätzlich zur Akkumulation von *V. parahaemolyticus* in homogenisierten Archenmuscheln auch den Hälterungsprozess, der nach Kontamination über zehn Tage stattfand. Bei 0 °C und 5 °C sank die Anzahl KbE schnell. Während bei Temperaturen um -18 °C ab dem 15. Tag und bei -30 °C ab dem 30. Tag dagegen keine KbE von *V. parahaemolyticus* mehr detektiert werden konnten.

In der Untersuchung von Crocchi *et al.* (2002), in der *M. galloprovincialis* für 44 Stunden gehältert wurden, zeigte *V. parahaemolyticus* eine wesentlich langsamere und geringere Reduktion (ca. 1 log) gegenüber *E. coli* (ca. 3 log).

### Andere Bakterienspezies

Aus *M. edulis* wurde *E. coli* während einer 72-stündigen Hälterung schneller eliminiert als *Streptococcus* spp. (Mesquita, 1988).

Töbe *et al.* (2004) zeigten eine rasche 87 % umfassende Abnahme der Konzentration von *Alteromonas* spp. und *Roseobacter* spp. in *M. edulis* innerhalb von 30 Minuten. Daraufhin stagnierte die Abnahme.

Marino *et al.* (2005) untersuchten die Hälterung von *M. galloprovincialis*, die mit *E. coli* und / oder *En. durans* kontaminiert waren. Innerhalb von 168 Stunden verringerte sich die Anzahl der Bakterien langsam aber kontinuierlich. *E. coli* wurde bereits nach 72 Stunden bei 14 °C



und 21 °C nicht mehr detektiert, *En. durans* war auch nach 168 Stunden in den Muscheln nachweisbar.

In den beschriebenen Studien konnte gezeigt werden, dass Vibrionen und andere Bakterien in Muscheln, Austern und Meeresfrüchten während der Hälterung unterschiedlich lange persistieren können. Die detaillierten Ergebnisse der beschriebenen Studien wurden in Tabelle 9 zusammengefasst.

**Tabelle 9: Hälterungsstudien von Meeresfrüchten**Nach artifizieller Kontamination mit *Vibrio* spp. und / oder anderen Bakterien.

<i>Spezies</i>	<i>Meeresfrüchte</i>	<i>Inokulum</i>	<i>Temperaturbedingungen</i>	<i>Hälterungs-Effekt</i>	<i>Referenz</i>
<i>V. cholerae</i> , <i>E. coli</i> , <i>En. durans</i>	<i>M. galloprovincialis</i>	5x10 <sup>10</sup> KbE/ml in 200 Litern	14 °C, 21 °C	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 14 °C nach 168 h nicht mehr nachweisbar</li> <li>▪ 21 °C <i>E. coli</i> nach 72 h nicht mehr nachweisbar</li> <li>▪ 21 °C <i>V. cholerae</i> non-O1 und <i>En. durans</i> nach 168 h noch nachweisbar</li> </ul>	Marino <i>et al.</i> (2005)
<i>V. cholerae</i> O1, <i>E. coli</i> , <i>V. parahaemolyticus</i>	<i>M. galloprovincialis</i>	<i>E. coli</i> 10 <sup>9</sup> KbE/ml, <i>Vibrio</i> spp. 10 <sup>10</sup> KbE/ml bis 10 <sup>11</sup> KbE/ml in 250 Litern	16 °C bis 18 °C	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ in 44 h schnellere Reduktion von <i>E. coli</i> (ca. 3 log) gegenüber <i>V. cholerae</i> und <i>V. parahaemolyticus</i> (ca. 1 log)</li> </ul>	Croci <i>et al.</i> (2002)
<i>V. parahaemolyticus</i>	Austern	10 <sup>6</sup> KbE/ml in ca. 67 Litern	17 °C bis 19 °C	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ höchste Konzentration in MDD gefolgt von Kiemen</li> <li>▪ nach 14 d 3,2x10<sup>0</sup> KbE/g bis 1,0x10<sup>1</sup> KbE/g noch nachweisbar</li> </ul>	Wang <i>et al.</i> (2010)
	homogenisierte Archenmuscheln	10 <sup>4</sup> KbE/ml in 50 Litern	0 °C, 5 °C	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ in 10 d: signifikantes Absinken (p &lt; 0,05)</li> </ul>	Liu <i>et al.</i> (2010)
<i>E. coli</i> , <i>Streptococcus</i> spp.	<i>M. edulis</i>	10 <sup>2</sup> bzw. 10 <sup>4</sup> - 10 <sup>6</sup> KbE/100 ml in 150 Litern	15 °C	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ in 72 h schnellere Elimination von <i>E. coli</i> als von <i>Streptococcus</i> spp.</li> </ul>	Mesquita (1988)
<i>Alteromonas</i> spp., <i>Roseobacter</i> spp.	<i>M. edulis</i>	10 <sup>7</sup> KbE/ml in 1 Liter	12 °C	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 87 % Abnahme der Bakterienkonzentration innerhalb von 30 min</li> </ul>	Töbe <i>et al.</i> (2004)

*E. coli*: *Escherichia coli*; *En. durans*: *Enterococcus durans*; MDD: Mitteldarmdrüsen

### 2.4.3 Lagerungsstudien

Studien zur Lagerung von Muscheln und Meeresfrüchten nach artifizieller Kontamination mit *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* und / oder anderen Bakterien wurden im folgenden Abschnitt zusammengetragen.

#### *V. cholerae*

*V. cholerae* kann in Krabben-, Austern- und Schrimp-Homogenaten für mehr als 14 Tage persistieren (Reily und Hackney, 1985). Nach 21 Tagen wurde *V. cholerae* noch in allen Homogenaten detektiert, in gefrorenen Schrimps noch nach 40 Tagen. Kühlung bei 7 °C bewirkte eine stärkere Reduktion der *V. cholerae*-Konzentration.

Im Gegensatz dazu untersuchten Corrales *et al.* (1994) das Überleben von *V. cholerae* O1 in Milch, Fisch, Rind- und Hühnerfleisch. Sie zeigten, dass *V. cholerae* in Milch am besten überlebt und bei Kühlung bei ca. -5 °C ab dem 34. Tag und bei -25 °C erst ab dem 150. Tag nicht mehr nachweisbar war.

#### *V. parahaemolyticus*

Goatcher *et al.* (1974) beschrieben für Austern nach Kontamination mit  $10^6$  KbE von *V. parahaemolyticus*, dass eine Lagerung für drei bis fünf Tage bei 5 °C ausreichte, um die Bakterien-Konzentration zu senken. Dabei wurden mittels direktem Plattierungsverfahren keine *V. parahaemolyticus* mehr detektiert, während mittels MPN-Methode *V. parahaemolyticus* bis zum 13. Tag nachweisbar war.

Shen *et al.* (2009) haben in Austern mit Schale und Austern-Fleisch, die mit  $10^4$  KbE/ml *V. parahaemolyticus* kontaminiert waren, das Überleben von *V. parahaemolyticus* untersucht. *V. parahaemolyticus* zeigte in Austern bzw. Austernfleisch, bei einer Lagerung ab 10 °C, Wachstum. Bei 0 °C und 5 °C sank die *V. parahaemolyticus*-Konzentration nach 96 Stunden um  $2,5 \times 10^1$  MPN/g bis  $2,5 \times 10^2$  MPN/g. Während der Lagerung bei -18 °C und -30 °C wurden Konzentrationssenkungen bis zum 60. Tag registriert. Bei -18 °C konnten ab dem 60. Tag keine KbE von *V. parahaemolyticus* mehr detektiert werden.

Bei einer Lagertemperatur von ca. 4 °C zeigte *V. parahaemolyticus* in Austern über drei Wochen keine Reduktion (Johnson *et al.*, 1973). Während der Lagerung für zwei bis drei Tage bei 35 °C kam es dagegen zu einer Vermehrung.

Eine 2-wöchige Lagerung von Austern-, Garnelen- und Krabbenfleisch-Homogenaten, die mit  $2 \times 10^8$  KbE/g *V. parahaemolyticus* kontaminiert waren, bei 4 °C und -20 °C führte dazu, dass 90 % der KbE nicht mehr detektiert wurden (Ray *et al.*, 1978).

In *Crassostrea gigas* wurde die *V. parahaemolyticus*-Konzentration während eines schnellen Einfrierprozesses, innerhalb von zwölf Minuten bei -95,5 °C, geringfügig um 0,22 log MPN/g reduziert (Liu *et al.*, 2009). Während der anschließenden Lagerungen bei -10 °C, -20 °C und

auch -30 °C für sechs Monate war die Lagerung bei -10 °C mit der stärksten Reduktion ( $3,5 \times 10^4$  MPN/g) verbunden.

Vanderzant und Nickelson (1972) beschrieben für die Überlebensfähigkeit von *V. parahaemolyticus* in ganzen, geschälten, entdarmten Schrimps einen geringen Unterschied zu Schrimp-Homogenaten. In ganzen Garnelen wurde nach Inokulation mit  $10^5$  KbE von *V. parahaemolyticus* pro Schrimp in den ersten zwei Tagen eine 1-2 log-Stufen Abnahme auf  $10^3$  KbE von *V. parahaemolyticus* pro Schrimp registriert. Die Konzentration blieb daraufhin in den folgenden sechs Tagen ungefähr gleich. In Schrimp-Homogenaten hingegen nahm die Bakterienkonzentration während der ersten zwölf Stunden um ungefähr 0,5 log zu, bevor zwischen dem vierten und achten Tag eine ähnliche Konzentrationsabnahme wie bei ganzen Schrimps registriert wurde. Die Überlebensrate der Bakterien war bei den Lagertemperaturen 3 °C und -18 °C am geringsten.

Vasudevan *et al.* (2002) beimpften Fischfilets mit drei *V. parahaemolyticus*-Stämmen, so dass Konzentrationen von  $10^3$ - $10^4$  KbE/Filet vorlagen. Bei 4 °C und 8 °C sank die Konzentration von *V. parahaemolyticus* bis zum neunten Tag hin langsam ab. Bei -18 °C hingegen kam es zwischen dem ersten und fünften Tag zu einer schnellen *V. parahaemolyticus*-Konzentrationsabnahme, dennoch blieben bis zum 49. Tag KbE von *V. parahaemolyticus* detektierbar.

### ***V. vulnificus***

In Austern, die mit je  $10^6$  KbE *V. vulnificus* inokuliert waren, wurde während einer Lagerung bei 0,5 °C eine allmähliche Vibrionen-Reduktion registriert (Oliver, 1981). Bei 4 °C gelagerten Austern-Homogenaten nahm die Dichte von *V. vulnificus* innerhalb von 24 Stunden rapide um  $10^5$  KbE/g ab. Oliver *et al.* (1981) beschrieben dabei, dass das Austern-Homogenat allein nicht zur letalen Zellzerstörung führte, weil eine anschließende Lagerung des Homogenates bei 25 °C Wachstum von *V. vulnificus* herbeiführte. Außerdem beobachteten sie eine schnellere Inaktivierung von *V. vulnificus* im Vergleich zu *V. parahaemolyticus*.

Vibrionen scheinen bei Lagertemperaturen von -18 °C bis -25 °C in Muscheln, Austern und Meeresfrüchten länger persistieren zu können als bei wärmeren Temperaturen von -10 °C bis 5 °C. Die detaillierten Ergebnisse der beschriebenen Studien wurden in Tabelle 10 zusammengefasst.

**Tabelle 10: Lagerungsstudien von Lebensmitteln**Nach artifizierter Kontamination mit *Vibrio* spp. und / oder anderen Bakterien.

<i>Spezies</i>	<i>Lebensmittel</i>	<i>Inokulum</i>	<i>Lagertemperatur</i>	<i>Persistenz / Nachweisbarkeit</i>	<i>Referenz</i>
<i>V. cholerae</i>	Krabben- Austern- und Schrimp-Homogenat	10 <sup>6</sup> KbE/g Homogenat	7 °C, -20 °C	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Krabben u. Austern nach 21 d nicht mehr nachweisbar</li> <li>▪ Schrimps nach 40 d nicht mehr nachweisbar</li> </ul>	Reily u. Hackney (1985)
<i>V. cholerae</i> O1	Milch, Fische, Rindfleisch und Hühnerfleisch	3x10 <sup>8</sup> KbE/ml, so dass 10 <sup>6</sup> KbE/ml / 10 <sup>6</sup> KbE/g in 25 g LM	-5 °C, -25 °C, 7 °C, 20 °C, 35 °C, 11 °C bis 22 °C	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ in Milch am besten überlebt, bei -5 °C nach 34 d und bei -25 °C nach 150 d nicht mehr nachweisbar</li> </ul>	Corrales <i>et al.</i> (1994)
	Austern	10 <sup>6</sup> , 10 <sup>4</sup> u. 10 <sup>2</sup> KbE/g in 1000 g Auster	5 °C	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ plattiert 3 d bis 5 d</li> <li>▪ MPN-Methode 7 d (9,3 MPN/g) bis 13 d (24 MPN/g)</li> </ul>	Goatcher <i>et al.</i> (1974)
<i>V. parahaemolyticus</i>	Austern mit Schale u. Austern-Fleisch	10 <sup>4</sup> KbE/ml in 50 Litern	-30 °C, -18 °C, 0 °C, 5 °C, 10 °C, 15 °C	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 10 °C Wachstum</li> <li>▪ 0 °C u. 5 °C Reduktion in 96 h um 2,5x10<sup>1</sup> MPN/g bis 2,5x10<sup>2</sup> MPN/g; -18 °C nach 60 d nicht mehr nachweisbar, -30 °C bis nach 60 d nachweisbar</li> </ul>	Shen <i>et al.</i> (2009)
	Forellen-, Austern-, Garnelen- und Krabben-Homogenat	2x10 <sup>8</sup> KbE/g in 100g Homogenat	4 °C, -20 °C	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 90 % Detektionsverlust in 2 Wochen</li> </ul>	Ray <i>et al.</i> (1978)
	Austern		4 °C, 35 °C	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 4 °C keine Reduktion in 3 Wochen</li> <li>▪ 35 °C Wachstum in 2 d bis 3 d</li> </ul>	Johnson <i>et al.</i> (1973)
	ganze Schrimps und Schrimp-Homogenat	10 <sup>3</sup> KbE pro Schrimp	3 °C, 7 °C, 10 °C, -18 °C	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ ganze Schrimps: in 2 d Reduktion, dann 6 d stabil</li> <li>▪ Homogenat: in 12 h Zunahme, 4 d bis 8 d Abnahme</li> </ul>	Vanderzant u. Nickelson (1972)
<i>C. gigas</i>	Fischfilets	10 <sup>3</sup> KbE bis 10 <sup>4</sup> KbE pro Filet	4 °C, 8 °C -18 °C	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 4 °C u 8 °C über 9 d nachweisbar</li> <li>▪ -18 °C über 49 d nachweisbar</li> </ul>	Vasudevan <i>et al.</i> (2002)
		3,5x10 <sup>5</sup> MPN/g	12 min: -95 °C 6 Monate: -10 °C, -20 °C, -30 °C	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Reduktion -95 °C: 1,7x10<sup>0</sup> MPN/g</li> <li>▪ Reduktion: -10 °C: 3,5x10<sup>4</sup> MPN/g -20 °C: 1,3x10<sup>4</sup> MPN/g; -30 °C: 3,4x10<sup>2</sup> MPN/g</li> </ul>	Liu <i>et al.</i> (2009)
	Austern und Austern-Homogenat	10 <sup>6</sup> KbE pro Auster	0,5 °C, 4 °C	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 0,5 °C in Austern allmähliche Reduktion</li> <li>▪ 4 °C in Homogenat Abnahme um 10<sup>5</sup> KbE/g in 24 h → 25 °C Wachstum</li> </ul>	Oliver (1981)

*C. gigas*: *Crassostrea gigas*; Konz: Konzentration; St.: Stämme; LM: Lebensmittel; Abn.: Abnahme

## 2.5 Ziel dieser Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Anreicherung, Lokalisation und Persistenz von *Vibrio* spp. in artifiziell kontaminierten Miesmuscheln, die in Deutschland häufig verzehrt werden, zu untersuchen.

Zu diesem Zweck wurden Kontaminations-, Hälterungs- und Lagerungsversuche mit Vibrionen durchgeführt. In Kontaminationsversuchen wurde die Anreicherung der Vibrionen in unterschiedlichen Muschelkompartimenten untersucht. In anschließenden einwöchigen Hälterungsversuchen wurde die Klärungskinetik von *V. cholerae*, *V. vulnificus* und *V. parahaemolyticus* in *Mytilus edulis* ermittelt. Weiterhin wurden die kontaminierten Miesmuscheln, in gängigen Verpackungen, unter gebräuchlichen Temperaturbedingungen bei 3 °C (in schmelzendem Eis) und bei 15 °C über zehn Tage gelagert. In allen Versuchen wurden verschiedene Probensegmente der Muscheln präpariert, in denen die Anreicherungs-dichten, Wachstums- und Auswaschraten der verschiedenen *Vibrio* spp. miteinander verglichen und ausgewertet werden konnten.

### 3 Materialien

#### 3.1 *Vibrio* spp.

Die *V. cholerae*- und *V. parahaemolyticus*-Stämme wurden im Rahmen einer Untersuchung von Handelsprodukten aus Miesmuscheln (*M. edulis*) isoliert (Randt *et al.* 2010) (Tab. 11). Dabei erfolgte die primäre Isolierung in Anlehnung an die ISO/TS 21872.

Bei dem verwendeten *V. vulnificus*-Stamm handelte es sich um ein klinisches Human-Isolat.

**Tabelle 11: Herkunft und Virulenzfaktoren der *Vibrio* spp. dieser Studie**

<i>Stämme</i>	<i>Virulenzfaktoren und Herkunft</i>
<i>V. cholerae</i> SR12	Serotyp non-O1/non-O139; <i>tcpA</i> (-), <i>Mytilus edulis</i> , Dänemark, Wildfang
<i>V. parahaemolyticus</i> SR3	<i>tdh/trh</i> (-); <i>Mytilus edulis</i> , Deutschland, Kieler Förde, Wildfang
<i>V. vulnificus</i> V57/10	Biotyp 1; Humanisolat, Deutschland, BfR; Wundinfektion

*tdh*: thermostable direct hemolysin; *trh*: thermostable direct hemolysin-related hemolysin

#### 3.2 *Mytilus edulis*

Für die Kontaminationsversuche mit *V. parahaemolyticus* wurden die Miesmuscheln von Bodenmuschelfeldern der westlichen Ostsee aus der Region Kiel gesammelt. Für die Kontaminationsversuche mit *V. vulnificus* wurden Miesmuscheln aus der gleichen Region genutzt, die jedoch nicht von Bodenmuschelfeldern, sondern von Hängekulturen stammten. In den Kontaminationsversuchen mit *V. cholerae* wurden im Handel erworbene, dänische Miesmuscheln von Bodenmuschelfeldern verwendet, die aus der Nordsee stammten.

Für die drei Hälterungsversuche wurden Miesmuscheln von Bodenmuschelfeldern der westlichen Ostsee aus der Region Kiel genutzt.

Für die Lagerungsversuche mit *V. cholerae* und *V. parahaemolyticus* wurden die Miesmuscheln von Bodenmuschelfeldern der westlichen Ostsee aus der Region Kiel gesammelt. Für die Lagerungsversuche bei denen mit *V. vulnificus* kontaminiert wurde, wurden Miesmuscheln aus der gleichen Region genutzt, die jedoch nicht von Bodenmuschelfeldern, sondern von Hängekulturen stammten. In Tabelle 12 ist die Herkunft der *M. edulis* beschrieben.

Tabelle 12: Herkunft der *Mytilus edulis* dieser Studie

<i>Versuchsart</i>	<i>Vibrio spp.</i>	<i>Herkunft der Mytilus edulis</i>
Kontaminationsversuche	<i>V. cholerae</i>	Bodenmuschelfelder, Nordsee, Insel Rømø; aus Berliner Handel; 6,90 cm ± 0,55 cm
	<i>V. parahaemolyticus</i>	Bodenmuschelfelder, westliche Ostsee, Kieler Förde; 5,4 cm ± 1,2 cm
	<i>V. vulnificus</i>	Hängekulturen, westliche Ostsee, Kieler Förde; 5,4 cm ± 1,2 cm
Lagerungsversuche	<i>V. cholerae</i>	Bodenmuschelfelder, westliche Ostsee, Kieler Förde; 5,4 cm ± 1,2 cm
	<i>V. parahaemolyticus</i>	Hängekulturen, westliche Ostsee, Kieler Förde; 5,4 cm ± 1,2 cm
	<i>V. vulnificus</i>	Hängekulturen, westliche Ostsee, Kieler Förde; 5,4 cm ± 1,2 cm
Hälterungsversuche	<i>V. cholerae</i>	Bodenmuschelfelder, westliche Ostsee, Kieler Förde; 5,4 cm ± 1,2 cm
	<i>V. parahaemolyticus</i>	Hängekulturen, westliche Ostsee, Kieler Förde; 5,4 cm ± 1,2 cm
	<i>V. vulnificus</i>	Hängekulturen, westliche Ostsee, Kieler Förde; 5,4 cm ± 1,2 cm

In thermoelektrischen Kühlboxen wurden die Muscheln ins Bundesinstitut für Risikobewertung transportiert, gereinigt und an eine Wassertemperatur von 15 °C adaptiert. Die Muscheln wurden nach dem Transport bis zu 14 Tage in separaten Quarantänebecken gehältert. In den Versuchen wurden ausschließlich Muscheln verwendet, die an die Bedingungen der Anlage adaptiert waren. Während dieser Haltungsperiode erfolgte einmal täglich eine Fütterung der Muscheln mit einer Algenmischung, bestehend aus der Grünalge *Tetraselmis suecica* und der Kieselalge *Phaeodactylum tricornutum* in einer Endkonzentration von  $10^4$  bis  $10^5$  Algenzellen/ml Salzwasser.

### 3.3 Puffer

Nachfolgend sind alle Puffer zusammengestellt, die im Rahmen aller unter Kapitel 4 beschriebenen Methoden zur Anwendung kamen.

#### 1x TE-Puffer

<i>Produkt</i>	<i>Konzentration</i>	<i>Firma</i>
Tris HCl	1 M	Roth, Karlsruhe, D
EDTA	0,25 M	Roth, Karlsruhe, D
Aqua dest.	990 ml	



**1x Tris Borate EDTA (TBE)-Puffer**

<i>Produkt</i>	<i>Konzentration</i>	<i>Firma</i>
Tris-borate	90 mM, pH 8,0	Roth, Karlsruhe, D
EDTA	2 mM, pH 8,0	Roth, Karlsruhe, D

**Rotiphorese® 10x TBE-Puffer**

(Tris-Borat-EDTA-Puffer)

<i>Produkt</i>	<i>Konzentration</i>	<i>Firma</i>
TRIS-Borat (pH 8,3)	1 M	Roth, Karlsruhe, D
EDTA	20 mM	Roth, Karlsruhe, D
Aqua dest.	ad 5 l	

**3.4 Nährmedien**

Nachfolgend sind alle Nährmedien zusammengestellt, die im Rahmen aller unter Kapitel 4 beschriebenen Methoden zur Anwendung kamen.

**Alkalisches Peptonwasser**

(APW)

<i>Produkt</i>	<i>Menge [g/l]</i>	<i>Firma</i>
Pepton	10,0	Thermo Fisher Scientific (Oxoid), Hampshire, UK
Natriumchlorid	20,0	
	pH 8.6 ± 0.2, 25 °C	

**Escherichia-coli-Direkt-Agar**

(ECD)

<i>Produkt</i>	<i>Menge [g/l]</i>	<i>Firma</i>
Pepton aus Casein	20,0	Merck, Darmstadt, D
Lactose	5,0	
Natriumchlorid	5,0	
Gallensalzmischung	1,5	
di-Kaliumhydrogenphosphat	4,0	

Die Tabelle wird auf nachfolgender Seite fortgesetzt.

## Materialien

---

Zu: Escherichia-coli-Direkt-Agar

<i><b>Produkt</b></i>	<i><b>Menge [g/l]</b></i>	<i><b>Firma</b></i>
Kaliumdihydrogenphosphat	1,5	
Agar-Agar	15,0	
Tryptophan	1,0	
4-Methylumbelliferyl- $\beta$ -D-gluconid	0,07	

## **Kristallviolett-Neutralrot-Galle-Glucose-Agar**

nach MOSSEL (VRBD)

<i><b>Produkt</b></i>	<i><b>Menge [g/l]</b></i>	<i><b>Firma</b></i>
Pepton aus Gelatine	7,0	
Hefeextrakt	3,0	
Natriumchlorid	5,0	Merck, Darmstadt, D
D(+)-Glucose	10,0	
Gallesalzmischung	1,5	
Neutralrot	0,03	
Kristallviolett	0,002	
Agar-Agar	13,0	

## **Kristallviolett-Neutralrot-Galle-Lactose-Agar**

(VRB)

<i><b>Produkt</b></i>	<i><b>Menge [g/l]</b></i>	<i><b>Firma</b></i>
Pepton aus Fleisch	7,0	
Hefeextrakt	3,0	
Natriumchlorid	5,0	
Lactose	10,0	Merck, Darmstadt, D
Neutralrot	0,33	
Gallesalzmischung	1,5	
Kristallviolett	0,002	
Agar-Agar	13,0	

**Peptonwasser**  
(PW)

<i>Produkt</i>	<i>Menge [g/l]</i>	<i>Firma</i>
Pepton aus Casein	10,0	
Natriumchlorid	5,0	
di-Natriumhydrogenphosphat dodecahydrat	9,0	Merck, Darmstadt, D
Kaliumdihydrogenphosphat	1,5	

**Plate-Count-Agar**

Caseinpepton-Glucose-Hefeextrakt-Agar (PC)

<i>Produkt</i>	<i>Menge [g/l]</i>	<i>Firma</i>
Pepton aus Casein	5,0	
Hefeextrakt	2,5	
D(+)-Glucose	1,0	Merck, Darmstadt, D
Agar-Agar	14,0	

**Pseudomonas-Aeromonas-Selektivagar**

nach KIELWEIN (GSP)

<i>Produkt</i>	<i>Menge [g/l]</i>	<i>Firma</i>
Natrium-L(+)-glutamat	10,0	
Stärke, löslich	20,0	
Kaliumdihydrogenphosphat	2,0	Merck, Darmstadt, D
Magnesiumsulfat	0,5	
Phenolrot	0,36	
Agar-Agar	12,0	

**Thiosulfate-Zitrat-Gallensalz Saccharose-Agar**

(TCBS) - CHOLERA MEDIUM TCBS

<i>Produkt</i>	<i>Menge [g/l]</i>	<i>Firma</i>
Hefeextrakt	0,5	
Bakteriologisches Pepton Konzentrat	10,0	

Die Tabelle wird auf nachfolgender Seite fortgesetzt.

## Materialien

---

Zu: Thiosulfate-Zitrat-Gallensalz Saccharose-Agar

<i><b>Produkt</b></i>	<i><b>Menge [g/l]</b></i>	<i><b>Firma</b></i>
Natriumthiosulfat	10,0	
Natriumcitrat	10,0	
Gallesalzmischung	8,0	Thermo Fisher Scientific (Oxoid),
Sucrose	20,0	Hampshire, UK
Natriumchlorid	10,0	
Eisencitrat	1,0	
Bromthymolblau	0,04	
Thymolblau	0,04	
Agar	14,0	
	pH 8.6 ± 0.2 at 25 °C	

---

### 3.5 Instrumente / Geräte

Nachfolgend sind alle Instrumente und Geräte zusammengestellt, die im Rahmen aller unter Kapitel 4 beschriebenen Methoden zur Anwendung kamen.

<i><b>Produkt</b></i>	<i><b>Firma</b></i>
Abflammgerät, fireboy S1000	Trecomara, Wallisellen, CH
Bag-Mixer Modell: VW 110222147	Interscience, Saint Nom, F
Biometra Power Pack P25, 0...200V	Biometra, Jena, D
Chirurgische Pinzette	Bayer Health Care, Leverkusen, D
ECOLOG Temperaturmessung	ELPRO GmbH, Schorndorf, D
Einschweißgerät WEBO MATLC®	WEBO, Bochum, D
Eismaschine Typ: ice line MIGEL, KF 85	Migel, Mailand, I
Eppendorf Research Pipetten 10 µl, 100 µl, 1000 µl	Eppendorf, Hamburg, D
Gel-Dokumentationsgerät Multimage™	Alpha Innotech. San Leandro, USA
Light Cabinet AlphaImager®	
Gelelektrophorese-System Biometra Analytik Jena	Biometra, Jena, D
Magnetrührer IKA-COMBIMAG RCO	Eppendorf, Hamburg, D
pH-Meter Schott CG 842	Schott Glas, Mainz, D
Photometer Cecil CE 1011, 1000 Serie 5	Cecil Instruments, Cambridge, GB
Pipetboy	Eppendorf, Hamburg, D
Präzisionswaage Typ: EW 2200-2NM	Kern & Sohn, Balingen, D

---

Die Tabelle wird auf nachfolgender Seite fortgesetzt.

Zu: Instrumente / Geräte

<b>Produkt</b>	<b>Firma</b>
Schüttelinkubator Unimax 1010, Inkubator 1000	Heidolph, Schwabach, D
Skalpellhalter	Bayer Health Care, Leverkusen, D
Thermo-Cycler C1000 <sup>TM</sup> oder S1000 <sup>TM</sup>	BioRad, München, D
Thermomixer Kompakt Eppendorf m-Thermoblock; Serie 5350YO	Eppendorf, Hamburg, D
Vortexer IKA-Werk	Janke & Kunkel, Staufen i. Br., D
Vortexer G560E	Scientific Industries Inc, New York, USA
Wasserbad Köttermann 3043	Köttermann, Hänigsen, D
Zentrifuge Eppendorf 5418	Eppendorf, Hamburg, D
Rotor FA-45-18-11	
Zentrifuge neolab mit 6400 rpm = 2000 x g	Neolab, Heidelberg, D

### 3.6 Verbrauchsmaterialien

Nachfolgend sind alle Verbrauchsmaterialien zusammengestellt, die im Rahmen aller unter Kapitel 4 beschriebenen Methoden zur Anwendung kamen.

<b>Produkt</b>	<b>Firma</b>
Eppendorf Tips Standard 10 µl, 100 µl, 1000 µl	Eppendorf, Hamburg, D
Filterspitzen 10 µl; 100 µl; 1000 µl	Peqlab, Erlangen, D
Impfösen	VWR, Dresden, D
Parafilm	Bemis Company Inc., Chicago, USA
Reaktionsgefäß 0,5 ml; 1,5 ml; 2 ml	Eppendorf, Hamburg, D
Reaktionsgefäß safelock 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg, D
Skalpellklingen c-Stahl NO: 20 und NO: 11	Schreiber®, Fridingen, D
Single Cap8-Streifen	Biozym, Hessisch-Oldendorf, D
Stomacherbeutel 80 ml und 400 ml	Interscience, Saint Nom, F
Zentrifugenröhrchen 50 ml	BD Biosciences, Heidelberg, D

### 3.7 Reagenzien

Nachfolgend sind alle Reagenzien zusammengestellt, die im Rahmen aller unter Kapitel 4 beschriebenen Methoden zur Anwendung kamen.

---

<i><b>Produkt</b></i>	<i><b>Firma</b></i>
Agarose peqGold Universal	peq Lab, Erlangen, D
Chelex 100 Resin-Lösung 5 %	BioRad, München, D
CoralLoad 10 x Puffer	Qiagen, Hilden, D
dNTP Set 100 mM Lösung	Thermo Fisher, St. Leon Rot, D
Ethanol 99,8 %	Th. Geyer, Berlin, D
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe, D
GeneRuler 100 bp	Thermo Fisher, St. Leon Rot, D
HyperLadder <sup>TM</sup> IV	Bioline, Luckenwalde, D
MgCl <sub>2</sub> [25 mM]	Qiagen, Hilden, D
Taq-Polymerase [5 U/μl]	Qiagen, Hilden, D
Tropic-Marin	Tropic-Marin, Wartenberg, D

---

### 3.8 Primer und Adapter

Nachfolgend sind alle Primer und Adapter zusammengestellt, die für die Speziesdetektion und Genotypisierung verwendet wurden (Tab. 13-16).

**Tabelle 13: Primer für mPCR zur Speziesdetektion**

<i>Spezies mPCR</i>	<i>Primer</i>	<i>Gen</i>	<i>GenBank Referenz- nummer</i>	<i>Sequenz (5'-3')</i>	<i>Amplikon- länge [bp]</i>	<i>Konzentration</i>	<i>Referenz</i>
<i>V. alginolyticus</i>	<i>VA-F</i>	collagenase	E03106	CGA GTA CAG TCA CTT GAA AGC C	737	[50 µM]	Di Pinto <i>et al.</i> (2005)
	<i>VA-R</i>			CAC AAC AGA ACT CGC GTT ACC		[50 µM]	
<i>V. cholerae</i>	<i>Vc.sodB-F</i>	<i>sodB</i>	AAKJ02000019.1	AAG ACC TCA ACT GGC GGT A	248	[0,5 µM]	Tarr <i>et al.</i> (2007)
	<i>Vc.sodB-R</i>			GAA GTG TTA GTG ATC GCC AGA GT		[0,5 µM]	
<i>V. mimicus</i>	<i>Vm.sodB-F</i>	<i>sodB</i>	AB05800.1	CAT TCG GTT CTT TCG CTG AT	121	[0,75 µM]	
	<i>Vm.sodB-R</i>			GAA GTG TTA GTG ATT GCT AGA GAT		[0,75 µM]	
<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>Vp.FlaE-79F</i>	<i>flaE</i>	AAD42915.1	GCA GCT GAT CAA AAC GTT GAG T	897	[1 µM]	
	<i>Vp.FlaE-934R</i>			ATT ATC GAT CGT GCC ACT CAC		[1 µM]	
<i>V. vulnificus</i>	<i>Vv.hsp326F</i>	hsp60	FJ646619.1	GTC TTA AAG CGG TTG CTG C	410	[0,25 µM]	
	<i>Vv.hsp697R</i>			CGC TTC AAG TGC TGG TAG AAG		[0,25 µM]	

**Tabelle 14: fAFLP spezifische Oligonukleotid-Adapter für Ligationen**

<i>Adapter</i>	<i>Erkennungs-Sequenz</i>
<i>TaqIad 1</i>	5' - GAC GAT GAG TCC TGA C - 3'
<i>TaqIad 2</i>	5' - CGG TCA GGA CTC AT- 3'
<i>HindIIIad 1</i>	5' - CTC GTA GAC TGC GTA CC - 3'
<i>HindIIIad 2</i>	5' - AGC TGG TAC GCA GTC - 3'

**Tabelle 15: fAFLP Primer für präselektive PCR**

<i>Primer</i>	<i>Erkennungs-Sequenz</i>
<i>Taqpre</i>	5' - CGA TGA GTC CTG ACC GA - 3'
<i>Hindpre</i>	5' - GAC TGC GTA CCA GCT T - 3'

**Tabelle 16: fAFLP Primer für selektive PCR**

<i>Primer</i>	<i>Erkennungs-Sequenz</i>
<i>Taqsel</i>	5' - CGA TGA GTC CTG ACC GAG - 3'
<i>Hindsel</i>	5' - GAC TGC GTA CCA GCT TA - 3'

### 3.9 Software

Nachstehend sind alle Software-Produkte zusammengestellt, die in dieser Arbeit zur Anwendung kamen.

- AlphaImager (Alpha Innotec, San Leandro, CA)
- BioRad CFX Manager (BioRad, München, D)
- BioNumerics (Applied-Maths, Sint-Martens-Latem, Be)
- EndNote X3 und X5 (Thomson Reuters, Carlsbad, USA)
- Microsoft Office Edition 2003 und 2010 (Microsoft, Redmond, USA)
- Microsoft Windows 7 (Microsoft, Redmond, USA).



## 4 Methoden

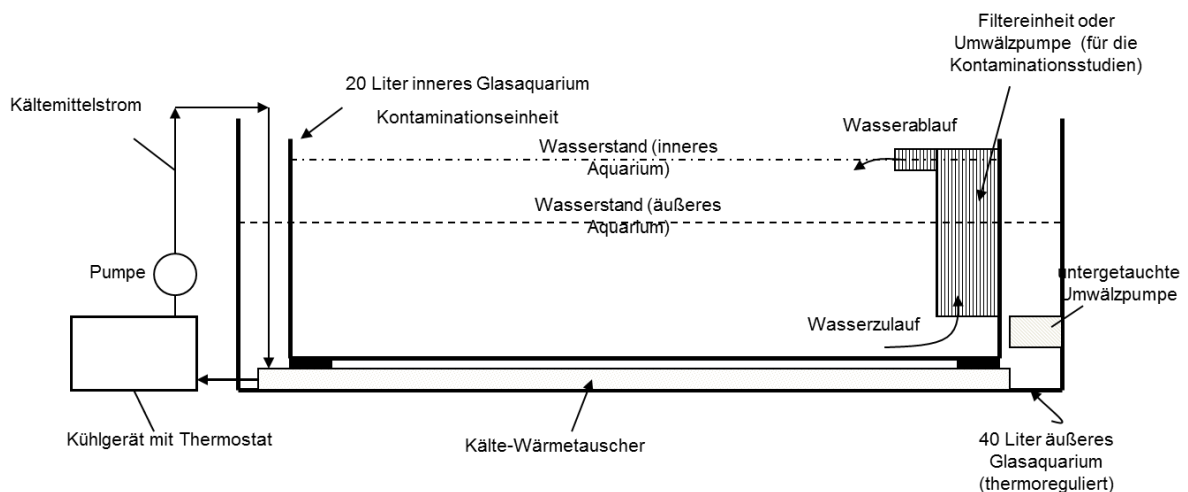
### 4.1 Versuchsaufbau

#### 4.1.1 Aufbau der Versuchsanlage

Die Kontamination und Hälterung der Miesmuscheln wurden in der Versuchsanlage des Bundesinstitutes für Risikobewertung (BfR) Marienfelde durchgeführt. Die Versuchsanlage (Abb. 3) setzte sich aus zwei mit artifiziellem Seewasser gefüllten 20 Liter-Glasbecken zusammen, die unter einer sterilen Werkbank standen. Die Glasbecken bildeten die inneren Untersuchungsaquarien (Abb. 4).



**Abbildung 3: Versuchsanlage**  
Kontaminationsbecken (rechts) und Hälterungsbecken (links), am BfR, Marienfelde



**Abbildung 4: Graphische Darstellung eines Beckens**  
(mit freundlicher Genehmigung von Dr. Pund, BfR)

Diese Untersuchungsbecken standen jeweils in einem 40 Literbecken. Die Außenbecken dienten zur Temperierung der Innenbecken auf  $15 \pm 1$  °C Wassertemperatur. Beide Außenbecken wurden von Styroporboxen umgeben, um durch zusätzliche Isolation konstante Temperatur-

bedingungen zu schaffen. In den inneren Becken wurden Standardbedingungen hergestellt, indem die Becken mit artifiziellem Seewasser (ASW), bestehend aus destilliertem Wasser und 15 g Tropic-Marine-Meersalz für Aquarien (Wartenberg) gefüllt wurden. Dadurch stellte sich eine Salinität von  $15 \pm 0,5$  ‰ ein. Die Sauerstoffsättigung betrug 94-96 %. Das ASW wurde mit einem Vakuum-Filtrationsgerät und Einwegfiltern filtriert.

### 4.1.2 Herstellung der Kontaminationssuspensionen

Für die Kontaminationssuspensionen wurde Material aus dem Stammhaltungssystem zur Langzeitlagerung von Mikroorganismen (Cryobank) auf TCBS-Agar ausplattiert und für 24 Stunden im Brutschrank bei 37 °C inkubiert.

#### ***V. cholerae*-Lösung für Kontaminationsversuche**

Für die Kontaminationsversuche wurde Koloniematerial mit Hilfe einer Einmalimpföse von einer mit *V. cholerae* bewachsenen TCBS-Platte entnommen. Das Koloniematerial wurde in 6 x 50 ml sterilen Zentrifugenröhrchen mit jeweils 30 ml APW über Nacht in einem Schüttelinkubator (Heidolph, Deutschland) bei 200 rpm und 37 °C kultiviert. Nach einer Inkubationszeit von 12-16 Stunden (über Nacht) wurden die Zentrifugenröhrchen bei 3.200 x g für 10 Minuten bei Raumtemperatur (RT) zentrifugiert. Der Überstand jedes Zentrifugenröhrchens wurde dekantiert und das Pellet im verbliebenen Überstand (7-10 ml) resuspendiert. In einem Zentrifugenröhrchen wurden alle resuspendierten Zellen vereinigt. Diese Suspension stellte die Kontaminationslösung dar. Mit einem 1 ml-Aliquot wurde eine serielle Verdünnungsreihe hergestellt und von jeder Verdünnungsstufe 10 µl auf TCBS ausgestrichen. Die beimpften TCBS-Platten wurden für 24 Stunden bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Am Folgetag wurden die KbE bestimmt, um die Kontaminationsdichte zu ermitteln. Dazu wurden die gewachsenen Kolonien der verschiedenen Verdünnungssektoren ausgezählt.

#### ***V. cholerae*-Suspension für Hälterungs- und Lagerungsversuche**

Für die Hälterungs- und Lagerungsversuche mit *V. cholerae* wurde mit Hilfe einer Einmalimpföse Koloniematerial von einer mit *V. cholerae* bewachsenen TCBS-Platte abgenommen und über Nacht in 500 ml sterilem APW im Brutschrank bei 37 °C inkubiert.

Am Morgen der Kontamination wurde die Kultur auf Zentrifugenröhrchen aufgeteilt und bei 3.200 x g für 10 Minuten bei RT zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand dekantiert und die pelettierten Zellen im restlichen Überstand (2,5 ml bis 5 ml) resuspendiert und in einem 50 ml-Zentrifugenröhrchen vereinigt. Mit einem 1 ml-Aliquot wurde eine serielle Verdünnungsreihe angefertigt. Von den verschiedenen Verdünnungsstufen wurden 10 µl auf TCBS-Platten ausplattiert. Die Kontaminationsdichte wurde nach Inkubation der TCBS-Platten bei 37 °C für 24 Stunden bestimmt, indem die gewachsenen Kolonien auf den verschiedenen Verdünnungssektoren ausgezählt wurden.

### ***V. parahaemolyticus*- und *V. vulnificus*-Suspension für Kontaminations-, Hälterungs- und Lagerungsversuche**

Nach der 24-stündigen Inkubation der TCBS-Platten bei 37 °C wurden 6 x 50 ml fassende sterile Zentrifugenröhrchen, die jeweils mit 30 ml sterilem APW gefüllt waren, mit Koloniematerial beimpft und in einem Schüttelinkubator bei 37 °C über Nacht (12-16 Stunden) bei 200 rpm inkubiert. Die Kulturen wurden bei RT mit 3.200 x g für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und die pelletierten Zellen im verbliebenen Überstand (10-12 ml) resuspendiert. Alle resuspendierten Zellen wurden in einem Zentrifugenröhrchen vereinigt. Ein 1 ml-Aliquot wurde seriell verdünnt und jeweils 10 µl auf TCBS-Platten ausplattiert. Anhand des Koloniewachstums konnte die Dichte der jeweiligen *Vibrio* spp. in der Kontaminationslösung in KbE absolut bestimmt werden.

## **4.2 Isolierung und Quantifizierung von *Vibrio* spp.**

### **4.2.1 Isolierung von *Vibrio* spp.**

Während der Kontaminationsversuche wurden bei jeder Probenentnahme fünf Muscheln aus dem Kontaminationsbecken entnommen und in eine sterile Glaspetrischale gelegt. Die Miesmuscheln wurden einzeln präpariert.

Während der Hälterungsversuche wurden jeweils sechs Muscheln untersucht, die aus dem Hälterungsbecken in eine Glaspetrischale transferiert und dann einzeln präpariert wurden.

Bei den Lagerungsversuchen wurden die entsprechenden Verpackungen (Jutesack und Vakuumbbeutel) geöffnet und die jeweils fünf verpackten Muscheln präpariert.

Dabei wurde mit einem sterilen Skalpell der hintere Adduktor der Miesmuscheln durchtrennt (Abb. 5). Das Muschel-Lumen-Wasser (MLW) wurde in einem 50 ml-Zentrifugenröhrchen aufgefangen. Nach dem Durchtrennen der *Musculi retractores bysso-pedales* wurden diese zusammen mit dem Muschelfuß nach oben geklappt. Die nun freiliegende Mitteldarmdrüse (MDD) konnte präpariert werden und mit den anderen MDD einer Probe in einem kleinen Stomacherbeutel (80 ml) mit Kompletfilter vereinigt werden. Das restliche Muschelfleisch, genannt Muschel-Geweberest (MR), wurde in einen Stomacherbeutel (400 ml) mit Seitenfilter gegeben.

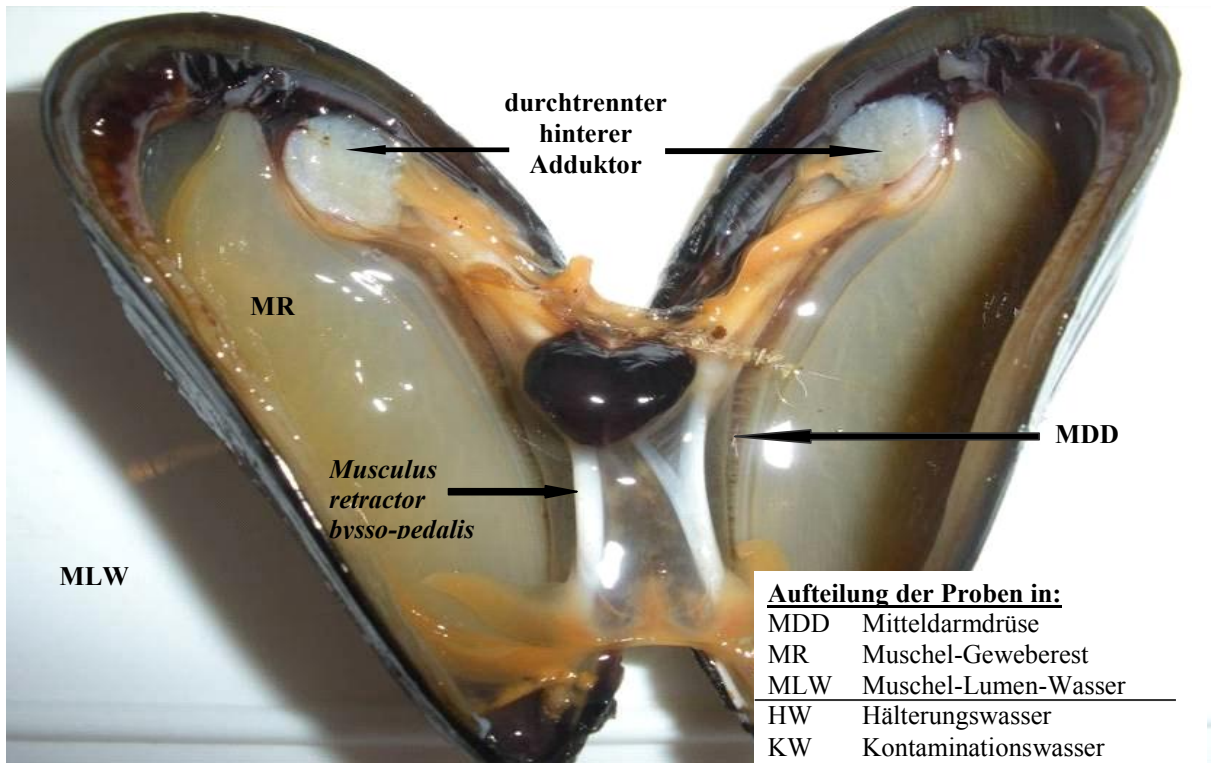
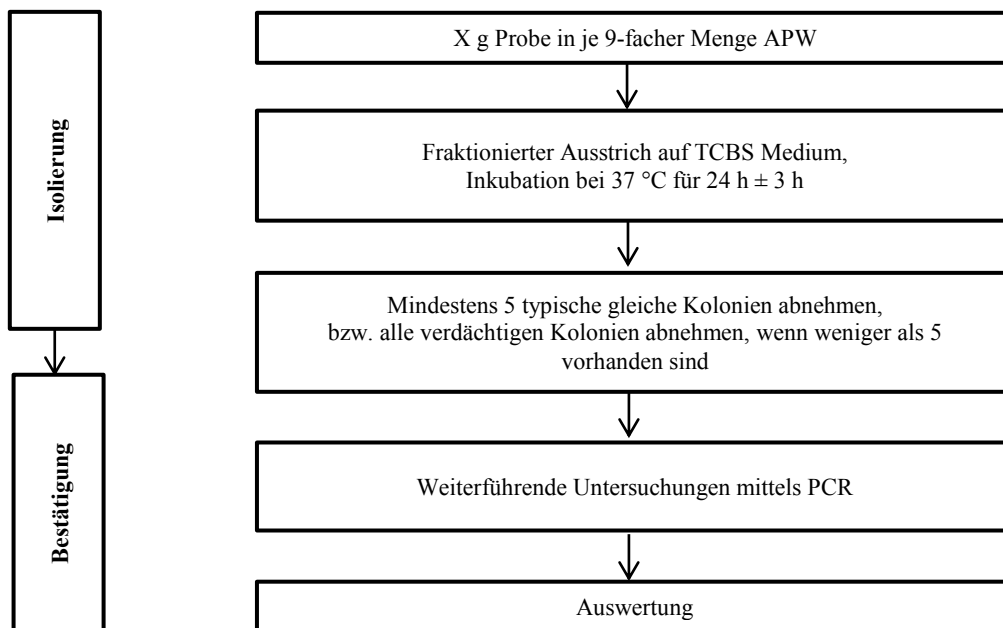


Abbildung 5: geöffnete *Mytilus edulis* mit Probenbeschriftung

Bei jeder Probenentnahme wurden ein 4,5 ml- und ein 2 ml-Aliquot Wasser aus den Kontaminations- bzw. Hälterungsbecken entnommen. Das 4,5 ml-Aliquot wurde direkt untersucht, das 2 ml-Aliquot wurde als Rückstellprobe bei -18 °C tiefgefroren.

Die Probenbearbeitung erfolgte in Anlehnung an die ISO/TS 21872 (Abb. 6).



**Abbildung 6: Fließschema zur Isolierung von *Vibrio* spp.**  
(modifiziert nach ISO/TS 21872-2:2007)

Die Abweichungen von der Vorgehensweise des ISO-Standards bestanden darin, dass eine Anreicherung mit APW nicht erfolgte, sondern nur eine Verdünnung zur Anfertigung einer seriellen Verdünnungsreihe stattfand. Ein weiteres Selektivnährmedium wurde nicht genutzt. Die verschiedenen Probensegmente wurden gewogen und mit der 9-fachen Menge an APW (pH 8,5) verdünnt und für 2 Minuten auf höchster Stufe in einem Stomacher homogenisiert. Zu den 4,5 ml Beckenwasser-Proben wurde ebenfalls die 9-fache Menge an APW hinzugegeben und durch manuelles Invertieren gemischt.

#### 4.2.2 Quantifizierung von *Vibrio* spp.

Nach dem Homogenisieren der 9-fach verdünnten Proben wurde für die mikrobiologische Untersuchung eine serielle Verdünnungsreihe mit einem 1 ml-Aliquot hergestellt. Ausgehend davon wurden mit einer Pipette, 10 µl Probenmaterial auf TCBS-Agar aufgebracht und mit einer Einmalimpföse ausplattiert. Das Ausplattieren fand im Doppelansatz statt. Die TCBS-Platten wurden anschließend im Brutschrank bei 37 °C für 24 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Kolonien der jeweiligen *Vibrio* sp. gezählt. Die Zellzahl pro Gramm bzw. Milliliter wurde nach folgender Formel berechnet:

$$CFU/ml = c \times 10 \times 100$$

c	gezählte Kolonien des letzten Verdünnungssektors auf dem Kolonien wuchsen und eine dekadische Abstufung erkennbar war
Faktor 100	Hochrechnung der Koloniezahl auf 1 ml
Faktor 10	Hochrechnung der Koloniezahl auf 1 ml unter Berücksichtigung der 9-fachen Verdünnung in Stufe $10^0$

Für die graphische Darstellung wurden alle errechneten Koloniezahlen der 2-fach durchgeführten Versuche (mit jeweiligem Doppelansatz) gemittelt. Von heranwachsenden Kolonien wurde die DNA isoliert und mittels PCR die Spezies verifiziert. Der Rest der verschiedenen Probensegmente wurde als Rückstellprobe für weiterführende Untersuchungen bei  $-80\text{ °C}$  tiefgefroren.

## 4.3 Speziesdetektion

### 4.3.1 PCR-Systeme

#### mPCR-Systeme zur Speziesdetektion

Vor Versuchsbeginn erfolgte die Charakterisierung der in die Versuche eingesetzten *Vibrio* spp. mittels multiplex Polymerase-Kettenreaktion (mPCR). Während der Versuche wurde die jeweils eingesetzte *Vibrio* sp. bestätigt und das eventuelle Vorhandensein weiterer *Vibrio* spp. überprüft. Die von uns getesteten mPCR-Systeme sind in Tabelle 17 dargestellt. Dabei wurden die verschiedenen Systeme so abgebildet wie sie von Espineira *et al.* (2010), Bauer und Rorvik (2007), Tarr *et al.* (2007) und Di Pinto *et al.* (2005) in ihren Veröffentlichungen beschrieben worden sind.

Die in dieser Studie eingesetzte mPCR, die die Systeme von Tarr *et al.* (2007) und Di Pinto *et al.* (2005) miteinander kombiniert, erlaubte die Identifikation von fünf verschiedenen *Vibrio* spp. (*V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae*, *V. vulnificus* und *V. mimicus*). Das mPCR-System nach Tarr *et al.* (2007) beinhaltet keine Primer für die Identifikation von *V. alginolyticus*. Da diese Spezies häufig in Meeresfrüchten nachgewiesen wird, sollte das hier angewendete mPCR-System diese detektieren. Im mPCR-System von Di Pinto *et al.* (2005) sind Primer-Sequenzen für die Detektion von *V. alginolyticus* enthalten, die in Kombination mit dem mPCR-System nach Tarr *et al.* (2007) bei der gelelektrophoretischen Auftrennung eine sichtbare Abgrenzung zwischen den verschiedenen Amplikon-Banden erkennen ließen.

**Tabelle 17: mPCR-Systeme zur Speziesdetektion**

Die mPCR-Systeme zur Identifikation von *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae*, *V. vulnificus* und *V. mimicus* wurden so dargestellt, wie sie in den jeweiligen Veröffentlichungen beschrieben worden sind.

<i>Vibrio</i> spp.	Zielgen	Primer	Fragment [bp]	Referenz	Konditionen	Programm
<i>V. cholerae</i>	ctxA	ctxA94F (5'-cgg gca gat tct aga cct cct g-3')	564	Espineira <i>et al.</i>	1. 2,5 µl 10x Puffer	initiale Denaturierung: 94 °C, 2 min
		ctxA614R (5'-cga tga tct tgg agc att ccc ac-3')				
<i>V. parahaemolyticus</i>	tlh	L-tl (5'-aaa gcg gat tat gca gaa gca ctg-3')	450	(2010)	2. 1 mM MgCl <sub>2</sub>	30 Zyklen
		R-tl (5'-gct act ttc tag gat ttt ctc tgc-3')				
<i>V. vulnificus</i>	dnaJ	VM-F (5'-cag gtt tgy tgc acg gcg aag a-3')	412		3. 1 µl 100 mM dNTP	Denaturierung: 94 °C, 1 min
		VV-Rmm (5'-agc agc tta tga cca ata cgc c-3')				
<i>V. alginolyticus</i>	dnaJ	VM-F (5'-cag gtt tgy tgc acg gcg aag a-3')	144		4. 0,5 U Taq-Polymerase Bioline)	Annealing: 60-70 °C, 1 min
		V.al2-MmR (5'-tgc gaa gaa agg ctc atc aga-3')				
Positiv-Kontrollen	16S (rRNA)	16SFa (5'-gct cag att gaa cgc tgg-3')	320		5. 100 ng DNA template	finale Elongation: 72 °C, 3 min
		16SFb (5'-gct cag gay gaa cgc tgg-3')				
		16SR (5'-tac tgc tgc ctc ccg ta-3')				
<i>Vibrio</i> spp.	toxR	UtoxF (5'-gas ttt gtt tgg cgy gar caa ggt t-3')		Bauer u.	1. 2,5 µl 10x Puffer	initiale Denaturierung: 95 °C, 4 min
<i>V. cholerae</i>		vctoxR (5'-ggt tag caa cga tgc gta ag-3')	640	Rorvik	2. 1 mM MgCl <sub>2</sub>	25 Zyklen
<i>V. parahaemolyticus</i>		vptoxR (5'-ggt tca acg att gcg tca gaa g-3')	297	(2007)	3. 0,24 mmol/l dNTP	Denaturierung: 95 °C, 30 s
<i>V. vulnificus</i>		vvtoxR (5'-aac gga act tag act ccg ac-3')	435		4. 1,5 U/µl dynamize II- Polymerase (Finnzymes, Finnland)	Annealing: 55 °C, 30 s Elongation: 72 °C, 30 s
					5. 2 µl DNA	finale Elongation: 72 °C, 7 min
					6. 30 pmol Vorwärtsprimer und 20 pmol Rückwärtsprimer	50 µl Reaktionsansatz

Die Tabelle wird auf der folgenden Seite fortgeführt.

Zu: mPCR-Systeme zur Speziesdetektion

<i>Vibrio spp.</i>	Zielgen	Primer	Fragment [bp]	Referenz	Konditionen	Programm
<i>V. cholerae</i>	<i>sodB</i>	Vc. <i>sodB</i> -F (5'-aag acc tca act ggt a-3')	248	Tarr <i>et al.</i>	1. 2 µl 10x Puffer 2. 1,2 µl MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	initiale Denaturierung: 93 °C, 15 min 35 Zyklen
		Vc. <i>sodB</i> -R (5'-gaa gtg tta gtg atc gcc aga gt-3')		(2007)		
<i>V. mimicus</i>	<i>sodB</i>	Vm. <i>sodB</i> -F (5'-cat tgc gtt ctt tgc ctg at-3')	121	(2007)	3. 2 µl dNTP (2 mM von jedem) 4. 0,2 µl AmpliTaq Gold-Polymerase (Applied Biosystems, Foster City, CA)	Denaturierung: 92 °C, 40 s Annealing: 57 °C, 60 s
		Vm. <i>sodB</i> -R2 (5'-gaa gtg tta gtg att gct aga gat-3')				
<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>flaE</i>	Vp. <i>flaE</i> -79F (5'-gca gct gat caa aac gtt gag t-3')	897			Elongation: 72 °C, 90 s finale Elongation: 72 °C, 7 min
		Vp. <i>flaE</i> -934R (5'-att atc gat cgt gcc act cac-3')				
<i>V. vulnificus</i>	<i>hsp</i>	Vv. <i>hsp</i> -326F (5'-gtc tta aag cgg ttg ctg c-3')	410		5. 1,5 µl DNA 6. 10 µM Primer (1 µl <i>V. cholerae</i> Primer, 1,5 µl <i>V. mimicus</i> Primer, 2 µl <i>V. parahaemolyticus</i> Primer; 0,5 µl <i>V. vulnificus</i> Primer)	20 µl Reaktionsansatz
		Vv. <i>hsp</i> -697R (5'-cgc ttc aag tgc tgg tag aag-3')				
<i>V. alginolyticus</i>	collagenase	VA-F (5'-cga gta cag tca ctt gaa agc c-3')	737	Di Pinto <i>et al.</i>	1. 12,5 µl HotStarTaq Master Mix Qiagen	initiale Denaturierung: 95 °C, 15 min 35 Zyklen
<i>V. cholerae</i>		VA-R (5'-cac aac aga act cgc gtt acc-3')	389	(2005)	2. 1xPCR Puffer (1,5 mM MgCl <sub>2</sub> ) 3. 0,2 mM von jedem dNTP	Denaturierung: 94 °C, 30 s Annealing: 57 °C, 30 s
		VC-F (5'-cgg cgt ggc tgg ata cat tg-3')				
<i>V. parahaemolyticus</i>		VC-R (5'-gtc aca ctt aaa tag tag cgt cc-3')	271		4. 0,2 µl AmpliTaq Gold Polymerase (Applied Biosystems, Foster City, CA)	Elongation: 72 °C, 60 s finale Elongation: 72 °C, 5 min 25 µl Reaktionsansatz
		VP-F (5'-gaa agt tga aca tca tca gca cga-3')				
		VP-R (5'-ggg cag aat caa acg cgg-3')			5. 1 µl DNA 6. 0,5 µM von jedem Primer	

*ctxA*: Cholera Toxin Untereinheit A; *flaE*: Untereinheit E des Flagellen-Apparates; *hsp*: Hitze-Schock-Protein; *tlh*: thermolabile hemolysin Gen; *dnaJ*: Hitze-Schock-Protein; *toxR*: Signaltransduktionsprotein; *sodB*: Superoxiddismutase



**mPCR zur Identifikation von Serovaren und Virulenzgenen**

Mittels mPCR erfolgte für *V. cholerae* eine Unterscheidung zwischen den Serovaren O1 und O139. Anhand des Systems von Rivera *et al.* (2003) fand die Detektion auf An- oder Abwesenheit dieser O-Antigene über das *wbeO*-Gen (O-Antigen Tetronat-Biosynthese) statt (Yamasaki *et al.*, 1999). Verschiedene *V. cholerae*-Stämme wurden für die vorliegende Arbeit zusätzlich zu ihren Serovaren (O1 / O139) auch in Biotypen oder Biovarien unterschieden. Im Fall von *V. cholerae* O1 wurde in „Klassisch“ und „El Tor“ unterschieden. Das angewandte PCR-System stammte von Rivera *et al.* (2001).

Die Unterscheidung in pathogene bzw. nicht pathogene *V. parahaemolyticus*-Isolate erfolgte durch die Detektion der Hämolysin-Gene *tdh* (thermostable direct hemolysin) und *trh* (thermostable direct hemolysin-related hemolysin) (Bej *et al.*, 1999). Die zuvor benannten PCR-Systeme sind nachfolgend dargestellt (Tab. 18).

Tabelle 18: PCR-Systeme zur Unterscheidung von Serovaren und Virulenzgenen

<i>Vibrio spp.</i>	Biovar / Serovar	Zielgene	Primer	Fragment [bp]	Referenz	Konditionen	Programm
<i>V. cholerae</i>	O1	<i>wbeO</i>	VCO1F2 (5'-caa cag aat aga ctc aag aa-3')	647	Rivera	1. 0,5 x Master <i>Taq</i> kit (Eppendorf) 2. 1x PCR Puffer (2,0 mM MgCl <sub>2</sub> ) 3. 200 µM von jedem dNTP 4. 0,625 U <i>Taq</i> -Polymerase (Applied Biosystems, Foster City, CA) 5. 1 µl DNA 6. 800 nM von jedem Primer	initiale Denaturierung: 94 °C, 2 min
	O139	<i>wbeO</i>	VCO1R2 (5'-tat ctt ctg ata ctt ttc tac-3') VCO139F2 (5'-tta cca gtc tac att gcc-3') VCO139R2 (5'-cgt ttc ggt agt ttt tct gg-3')	741	<i>et al.</i> (2003)		35 Zyklen Denaturierung: 94 °C, 30 s Annealing: 55 °C, 3 min Elongation: 72 °C, 60 s finale Elongation: 72 °C, 5 min 25 µl Reaktionsansatz
<i>V. cholerae</i>	O1 / El Tor O1 / Klassisch	<i>tcpA</i>	tcpA72F (5'-cac gat aag aaa acc ggt caa gag-3') tcp477R (5'-cga aag cac ctt ctt tca cgt tg-3') tcp647R (5'-tta cca aat gca acg ccg aat g-3')	451 620	Rivera <i>et al.</i> (2001)	1. 2,5 µl 10x Amplifikationspuffer A (100 mM Tris-HCL [pH 8,3], 500 mM KCL, 15 mM MgCl <sub>2</sub> , 0,01 % [wt/vol] gelatin) (Promega, Madison, Wis.) 2. 0,5 µl (2,5 mM) dNTP (Promega) 3. 1,0 Primer (20 µM) 4. 0,125 µl <i>Taq</i> DNA Polymerase (5 U/µl) (Promega) 5. 1 µl (ca. 0,10 µg) DNA	35 Zyklen Denaturierung: 94 °C, 2 min Annealing: 60 °C, 1 min Elongation: 72 °C, 1 min finale Elongation: 72 °C, 10 min 25 µl Reaktionsansatz

Die Tabelle wird auf der folgenden Seite fortgeführt.

Zu: PCR-Systeme zur Unterscheidung von Serovaren und Virulenzgenen

<i>Vibrio spp.</i>	Biovar / Serovar	Zielgene	Primer	Fragment [bp]	Referenz	Konditionen	Programm
<i>V. parahaemolyticus</i>		<i>tdh</i>	L- <i>tdh</i> (5'-gta aag gtc tct gac ttt tgg ac-3') R- <i>tdh</i> (5'-tgg att aga acc ttc atc ttc acc-3')	269	Bej <i>et al.</i> (1999)	1. 0,5 x Master <i>Taq</i> kit (Eppendorf)	initiale Denaturierung: 94 °C, 3 min
		<i>trh</i>	L- <i>trh</i> (5'-ttg gct tcg ata ttt tca gta tct-3') R- <i>trh</i> (5'-cat aac aaa cat atg ccc att tcc g-3')	500		2. 0,5 µl 10x PCR Puffer (500 mM Tris-Cl pH 8,9; 500 mM KCl und 25 mM, 30 mM oder 40 mM MgCl <sub>2</sub> ; Endkonzentration von 1x)	30 Zyklen Denaturierung: 94 °C, 1 min Annealing: 58 °C, 1 min Elongation: 72 °C, 1 min finale Elongation: 72 °C, 5 min
						3. 200 µM von allen dNTP (8 µl [5 mM dNTP]) (Pharmacia)	50 µl Reaktionsansatz
						4. 2,5 U <i>AmpliTaq</i> DNAPolymerase (Perkin Elmer)	
						5. 0,5 µg genomische DNA	
						6. 1 µM Primer ( <i>tdh</i> , <i>trh</i> ) (2,5 µl Primer (20 µM))	

*wbeO*: O-Antigen Tetronat-Biosynthese; *tcpA*: Pathogenitätsinsel; *tdh*: thermostable direct hemolysin; *trh*: thermostable direct hemolysin-related hemolysin

### 4.3.2 Wachstumsversuche

Um die Wachstumsgeschwindigkeit der einzelnen *Vibrio* sp. analysieren zu können wurden Wachstums-Eichkurven ausgehend von Extinktionswerten der optischen Dichte (OD) bei 600 nm (OD<sub>600</sub>) angefertigt. Die OD der Bakteriensuspension wurde direkt nach Versuchsbeginn und danach alle 30 min über einen Zeitraum von sieben Stunden gegen alkalisches Peptonwasser (APW) als Null-Wert gemessen. Die Inkubationstemperatur betrug über den gesamten Zeitraum 37 °C. Alle Messungen erfolgten im Doppelansatz mittels biologischen Replikats. Während der photometrischen Messung wurde stündlich mit einem 1 ml-Aliquot eine serielle Verdünnungsreihe angefertigt, auf Thiosulfate-Zitrat-Gallensalz Saccharose-Agar (TCBS-Agar) ausplattiert und die Anzahl an KbE ermittelt.

## 4.4 Versuchsdurchführung

In dieser Studie wurden *M. edulis* mit *Vibrio* spp. kontaminiert und Anreicherungs-, Kultivierungs- und Persistenz-Daten gesammelt.

Drei *Vibrio* spp. (*V. cholerae* non-O1/non-O139, *V. parahaemolyticus* und *V. vulnificus*) wurden für die Experimente eingesetzt.

Die Anzahl an Miesmuscheln, die für die jeweiligen Versuche verwendet wurde, wurde zeitversetzt (20 Stück täglich) in das Kontaminationsbecken eingebracht. Direkt vor Versuchsbeginn wurden die Muscheln für 48 Stunden einer Hungerperiode unterzogen. Am Kontaminationstag wurde eine erste Kontrollprobe im Umfang von fünf bis sechs Muscheln entnommen, bevor die entsprechende Kontaminationslösung in das Kontaminationsbecken gegeben wurde. Die Aquarien wurden mit Plexiglasscheiben abgedeckt, um Tröpfchen-Kontaminationen durch Aerosolbildung zu vermeiden. Eine 24-stündige Kontamination wurde durchgeführt.

Lediglich lebende Muscheln wurden für die weitere Untersuchung verwendet. Die Vitalität wurde zuvor überprüft. Entweder waren die Muscheln verschlossen oder schlossen sich nach leichter Berührung bzw. dem Klopfest von selbst.

Die gesamte Muschelbearbeitung wurde unter aseptischen Bedingungen durchgeführt. Alle Gerätschaften, die in unmittelbaren Kontakt mit den Muscheln gelangten, wurden zuvor sterilisiert oder abgeflammt.

### 4.4.1 Kontrollprobe und Kontamination

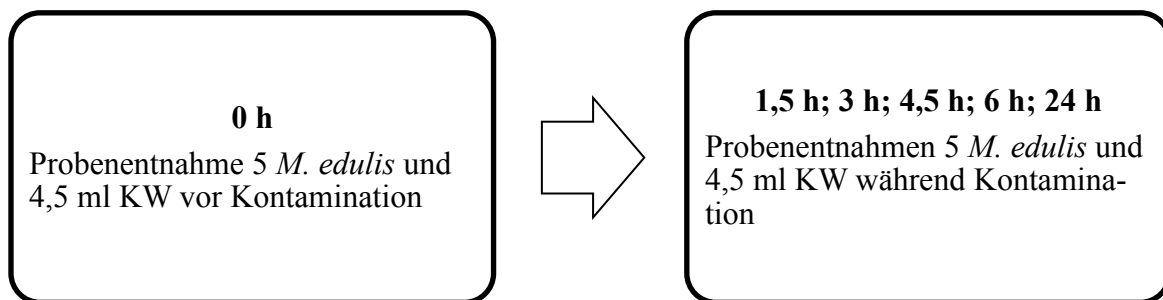
Vor der Kontamination wurden bei den Kontaminations- und Lagerungsversuchen fünf, bei den Hälterungsversuchen sechs *M. edulis* als Null-Probe entnommen, um die bereits vorhandene Begleitflora zu erfassen. Die mesophile aerobe Gesamtkeimzahl, *Aeromonas* spp., Coliforme, *E. coli*, *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* spp. sowie eine mögliche natürliche Kontamination mit *Vibrio* spp. wurde untersucht.

Nach der ersten Probenentnahme erfolgte zum Zeitpunkt 0 h die Kontamination. Das Kontaminationsbecken beinhaltete 20 Liter ASW und die für die Versuche bestimmte Menge Muscheln. Die Temperatur von  $15,0 \pm 1,0$  °C und der Salzgehalt von  $15,0 \pm 0,5$  ‰ wurden eingestellt. Der pH-Wert, die Ammonium- und Ammoniak-Gehalte sowie die Nitrit- und Nitrat-Gehalte wurden gemessen.

#### 4.4.2 Kontaminationsversuche

Während der Kontaminationsversuche erfolgte zum Zeitpunkt Null eine Probenentnahme, bevor die jeweils ca. 42 Miesmuscheln für 24 Stunden mit den verschiedenen *Vibrio* spp. im Kontaminationsbecken kontaminiert wurden.

Probenentnahmen erfolgten zu den Zeitpunkten 1,5; 3; 4,5; 6 und 24 Stunden während der Kontamination. Eine Umsetzung in das Hälterungsbecken erfolgte nicht. Eine Übersicht zu den Probenentnahmen gibt Abbildung 7.

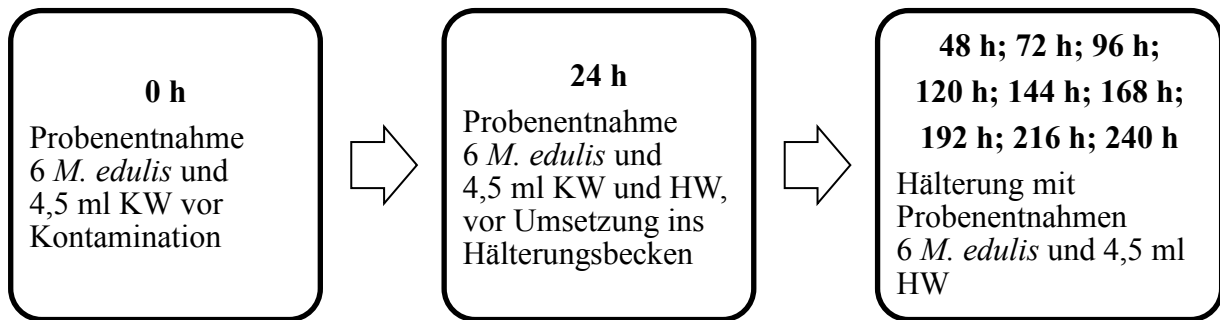


**Abbildung 7: Probenahmezeitpunkte während der Kontamination**

KW: ASW aus Kontaminationseinheit

#### 4.4.3 Hälterungsversuche

Für die Hälterungsversuche wurden jeweils ca. 100 Miesmuscheln für 24 Stunden mit der jeweiligen *Vibrio* sp. im Kontaminationsbecken kontaminiert. Die Umsetzung vom Kontaminationsbecken in das Hälterungsbecken erfolgte mit einer sterilen Schöpfkelle, damit kontaminiertes Wasser vor dem Umsetzen ablaufen konnte. Im Hälterungsbecken wurden die Muscheln bei 15 °C Wassertemperatur über sieben bis neun Tage gehalten bzw. gehältert und täglich gefüttert. Alle zwei Tage fand ein 50 % Wasseraustausch statt, um toxische Nebenwirkungen sich anhäufender Metabolite zu vermeiden. Zur Probenuntersuchung gelangten nur lebende Muscheln. Eine Übersicht zu den Probenentnahmen ist in Abbildung 8 dargestellt.



**Abbildung 8: Probenahmezeitpunkte während der Hälterung**

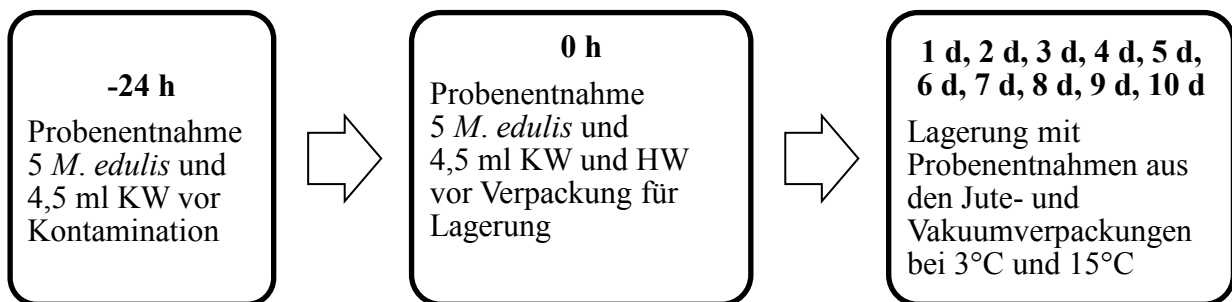
KW: ASW aus Kontaminationseinheit

HW: ASW aus Hälterungseinheit

#### 4.4.4 Lagerungsversuche

Für die Lagerungsversuche wurden jeweils ca. 200 Miesmuscheln mit der entsprechenden *Vibrio* sp. im Kontaminationsbecken kontaminiert. Nach 24-stündiger Kontamination wurden die Muscheln verpackt. Dabei wurden jeweils fünf Muscheln in Jutesäcke bzw. Vakuumbbeutel mit 200 ml ASW eingebracht. Die verpackten Muscheln wurden bei 3 °C in schmelzendem Eis und bei 15 °C im Klimaschrank gelagert. Die Temperatur-Kontrolle erfolgte mit einem Temperatur-Messgerät (ECOLOG, Schorndorf, D).

Nur lebende Muscheln wurden verpackt. Eine Übersicht zu den Probenentnahmen gibt Abbildung 9.



**Abbildung 9: Probenahmezeitpunkte während der Lagerung**

KW: ASW aus Kontaminationseinheit, HW: ASW für Vakuumverpackung

## 4.5 Molekularbiologische Untersuchung

### 4.5.1 DNA-Isolation

Für die Speziesidentifikation wurde Koloniematerial von der kleinsten und größten Verdünnungsstufe vom TCBS-Agar entnommen, um die DNA zu isolieren. Das Koloniematerial wurde in 400 µl, 0,1 % Tris-EDTA-Puffer gewaschen und für vier Minuten bei 4 °C und 16.873 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert. Das Pellet wurde mit 400 µl, 5 % Chelex<sup>®</sup> 100 Resin-Lösung, die kontinuierlich gerührt wurde, resuspendiert. Anschließend

wurde das Gemisch für eine Stunde bei 56 °C und 700 rpm und danach für 15 Minuten bei 95 °C und 700 rpm im Thermomixer (Eppendorf, Hamburg, D) inkubiert. Danach erfolgte ein 10-minütiger Zentrifugations-Schritt bei 4 °C und 16.873 x g. Der Überstand der die DNA enthält, wurde in 0,5 ml Reaktionsgefäße überführt und bei 7 °C im Kühlschrank gelagert, bis zeitnah die Überprüfung mittels mPCR stattfand.

#### 4.5.2 Multiplex Polymerase-Kettenreaktion

Die jeweilig in die Versuche eingesetzte *Vibrio* sp. wurde mittels mPCR bestätigt. Des Weiteren konnte eine Unterscheidung zwischen *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. vulnificus*, *V. cholerae* und *V. mimicus* getroffen werden. Eventuell vorhandene Feldkontaminationen durch eine dieser fünf Spezies konnten so ebenfalls erfasst werden.

Die Durchführung der mPCR erfolgte in Anlehnung an Di Pinto *et al.* (2005) und Tarr *et al.* (2007). Die verschiedenen *Vibrio* spp. wurden durch folgende Zielgene detektiert: *V. cholerae* - *sodB*, *V. parahaemolyticus* - *flaE*, *V. mimicus* - *sodB*, *V. vulnificus* - *hsp* nach Tarr *et al.* (2007) und *V. alginolyticus* - collagenase nach Di Pinto *et al.* (2005).

Für die PCR wurde 1 µl Überstand aus der DNA-Isolation eingesetzt.

Für die Reaktion wurden die Ansätze nach dem Schema aus den Tabellen 19 und 20 in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert und mit spezifischen Primern (Tab. 21) durchgeführt:

**Tabelle 19: Reaktionsansatz für mPCR**

<b>Mastermix für x Proben</b>	<b>1x [µl]</b>
10x Puffer	2
MgCl <sub>2</sub> [25 mM]	2,4
dNTPs [10 mM]	2
Taq-Pol [5 U/µl]	0,1
DNA	1
Primer Mix	2,5
H <sub>2</sub> O	10
Σ	20

**Tabelle 20: Primer-Konzentrationen für mPCR**

<b>Primer Mix aus F- und R-Primer</b>	<b>1x [µl]</b>	<b>F+R [µl]</b>	<b>Fragment [bp]</b>
<i>Vc.sodB</i> [0,5 µM]	0,2	0,4	248 <i>V. cholerae</i>
<i>Vm.sodB</i> [0,75 µM]	0,35	0,7	121 <i>V. mimicus</i>
<i>Vp.FlaE</i> [1 µM]	0,4	0,8	897 <i>V. parahaemolyticus</i>
<i>Vv.hsp</i> [0,25 µM]	0,1	0,2	410 <i>V. vulnificus</i>
<i>VA</i> [50 µM]	0,2	0,4	737 <i>V. alginolyticus</i>
Σ	1,25	2,5	

Tabelle 21: Primer-Sequenzen der mPCR

<i>Vibrio spp.</i>	Primer	GenBank Nummer	Referenz
<i>V. c. (sodB)</i>	Vc.sodB-F (5'-aag acc tca act ggt a-3')	AAKJ02000	Tarr <i>et al.</i> (2007)
	Vc.sodB-R (5'-gaa gtg tta gtg atc gcc aga gt-3')	019.1	
<i>V. m. (sodB)</i>	Vm.sodB-F (5'-cat tcg gtt ctt tcg ctg at-3')	AB05800.1	
	Vm.sodB-R2 (5'-gaa gtg tta gtg att gct aga gat-3')		
<i>V. p. (flaE)</i>	Vp.flae-79F (5'-gca gct gat caa aac gtt gag t-3')	AAD42915.1	
	Vp.flae-934R (5'-att atc gat cgt gcc act cac-3')		
<i>V. v. (hsp)</i>	Vv.hsp-326F (5'-gtc tta aag cgg ttg ctg c-3')	FJ646619.1	
	Vv.hsp-697R (5'-cgc ttc aag tgc tgg tag aag-3')		
<i>V. a. (collagenase)</i>	VA-F (5'-cga gta cag tca ctt gaa agc c-3')	E03106	Di Pinto <i>et al.</i> (2005)
	VA-R (5'-cac aac aga act cgc gtt acc-3')		

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

Die PCR wurde im BioRad Thermal Cycler (C1000TM, CFX96TM, Real-Time System) mit einem Volumen von 20 µl durchgeführt. Die initiale Denaturierung erfolgte bei 95 °C für 5 Minuten. Daraufhin schlossen sich 30 Zyklen mit Denaturierung bei 92 °C für 40 Sekunden, dem Annealing bei 62 °C für 1 Minute und einer Elongation bei 72 °C für 1 Minute an. Abschließend fand eine finale Elongation bei 72 °C für 7 Minuten statt, bevor der Cycler auf 12 °C herunterkühlte.

Als Positivkontrolle diente DNA des eingesetzten sequenzierten Kontaminationsstammes sowie ein DNA-Mix aus *V. alginolyticus*, *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* und *V. vulnificus*.

### Gelelektrophorese

Die Unterscheidung in *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. vulnificus*, *V. cholerae* und *V. mimicus* fand anschließend in der gelelektrophoretischen Auftrennung in einem 2 % Agarosegel statt. Für einen Agarose-Gelansatz von 400 ml wurden 8 g Agarose in ca. 400 ml Tris-Borat-EDTA-Puffer (TBE-Puffer) aufgekocht, bis die Lösung klar erschien. In einem Wasserbad wurde das Gemisch bei 60 °C bis zur Verwendung temperiert. Das Gel wurde ca. 0,5 cm hoch in eine Gelkammer (Biometra, Deutschland), die zuvor mit Kämmen ausgestattet worden war, gegossen und bis zur Aushärtung des Gels inkubiert. Nach Aushärtung wurde das Gel in eine Elektrophorese-Kammer mit TBE als Laufpuffer überführt und die Kämmen entfernt. In einem 0,5 ml Reaktionsgefäß wurden 98 µl CoralLoad PCR-Puffer mit 2 µl Ethidiumbromid (EtBr) gemischt. In eine 96-well Mikrotiterplatte wurden 2 µl dieses Ansatzes, je nach Anzahl der PCR-Reaktionen plus weiteren für die Marker, vorgelegt. Aus jedem PCR-Reaktionsgefäß wurden daraufhin 5 µl PCR-Produkt mit dem vorgelegten Ansatz gemischt und in die Geltaschen eingebracht. Von dem Marker Gene Ruler 100 bp (Thermo Fisher, St. Leon Rot, D) wurden je Geltasche 2 µl mit Ladepuffer und EtBr gemischt und in das Gel ge-



bracht. Die Gelelektrophorese-Kammern wurden entsprechend ihrer Größe für ca. eine Stunde mit 80 V (Kammergröße S) bzw. 140 V (Kammergröße L) betrieben.

### PCR Dokumentation

Die verschiedenen *Vibrio* spp., zeigten aufgrund verschieden großer PCR-Produkte unterschiedlich hohe Amplikon-Banden. Mit Hilfe des Computerprogramms AlphaImager (San Leandro, San Leandro, CA) wurde das Gel ausgewertet.

### 4.5.3 Genotypisierung

Die Genotypisierung, der nach 10-tägiger Lagerung isolierten *Vibrio* sp., erfolgte mit der fluorescent Amplified Fragment Length Polymorphism (fAFLP) in Anlehnung an die Methode von Duim *et al.* (1999) und Kokotovic *et al.* (1999). Diese Typisierungsmethode wird in vier Schritte unterteilt:

#### 1. Restriktion der DNA

Der erste Schritt dient dem DNA-Verdau mittels bakterieller Restriktionsenzyme. Die Restriktion der DNA erfolgte mit den beiden Endonukleasen *TaqI* und *HindIII* in folgendem Restriktionsansatz.

#### Restriktionsansatz

<i>TaqI</i> [10.000 U/ml]	0,4 µl
<i>HindIII</i> [10.000 U/ml]	0,2 µl
Aqua bidest.	7,4 µl
Puffer [Tango 10x]	1,0 µl
DNA-Template	1,0 µl
Σ	10,0 µl

Die Erkennungssequenz der Restriktionsenzyme wurde nachfolgend dargestellt:

#### Erkennungssequenz der Restriktionsenzyme

<i>Enzym</i>	<i>Erkennungs-Sequenz</i>
<i>TaqI</i>	5' - T ▼ C G A - 3' 3' - A G C ▲ T - 5'
<i>HindIII</i>	5' - A ▼ A G C T T - 3' 3' - T T C G A ▲ A - 3'

Die Restriktion der DNA wurde bei 37 °C für 60 Minuten durchgeführt. Die schwarzen Dreiecke verdeutlichen die Schnittstellen des Enzyms.

## 2. Ligation spezifischer Oligonukleotid-Adapter

Als zweiter Schritt der fAFLP erfolgte eine Ligation spezifischer Oligonukleotid-Adapter an die Restriktionsfragmente. Dabei wurde die Sequenz so gewählt, dass die ursprünglichen Erkennungssequenzen für die Restriktionsenzyme nicht mehr hergestellt werden und somit die um den Adapter verlängerten Fragmente nicht erneut gespalten werden können. Daher ist es möglich, Schritt eins und zwei auch parallel ablaufen zu lassen.

Für die Ligationen mussten die Oligonukleotid-Adapter *TaqIad 1*, *TaqIad 2*, *HindIIIad 1* und *HindIIIad 2* in einem spezifischen Adapteransatz eingesetzt werden. Die Tabelle stellt die Zusammensetzung des Adapter-Mixes dar, der in der Ligation eingesetzt wurde.

### Oligonukleotid-Adapteransatz

<i>TaqIad 1</i> [100 pmol/ $\mu$ l]	20 $\mu$ l	<i>HindIIIad 1</i> [100 pmol/ $\mu$ l]	2 $\mu$ l
<i>TaqIad 2</i> [100 pmol/ $\mu$ l]	20 $\mu$ l	<i>HindIIIad 2</i> [100 pmol/ $\mu$ l]	2 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	60 $\mu$ l	H <sub>2</sub> O	96 $\mu$ l
$\Sigma$	100 $\mu$ l	$\Sigma$	100 $\mu$ l

Alle Ansätze wurden für fünf Minuten bei 95 °C erhitzt, für zwei Minuten bei RT abgekühlt und für 15 Sekunden mit bis zu 2300 x g bei RT zentrifugiert.

Modifizierte Konzentrationen der Adapter stammten von Messens *et al.* (2009).

Die Ligation wurde in folgendem Ansatz durchgeführt und anschließend für 120 Minuten bei 37 °C inkubiert.

### Ansatz für die Ligation der Oligonukleotid-Adapter

H <sub>2</sub> O	10,3 $\mu$ l
Ligase [5 U/ $\mu$ l]	0,2 $\mu$ l
Puffer T4 DNA Ligase 1x	2,5 $\mu$ l
<i>TaqIad</i>	1,0 $\mu$ l
<i>HindIIIad</i>	1,0 $\mu$ l
Restriktionsansatz	10,0 $\mu$ l
$\Sigma$	25,0 $\mu$ l

### 3. Präselektive PCR

Als dritter Schritt der fAFLP wurde eine präselektive PCR mit folgendem Mastermix-Ansatz durchgeführt:

#### Mastermix-Ansatz für Präselektive PCR

ReddyMix PCR Master Mix (Abgene)	20 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub> [25 mM]	1 $\mu$ l
Taqpre [10 pmol/ $\mu$ l]	1 $\mu$ l
Hindpre [1 pmol/ $\mu$ l]	2 $\mu$ l
Ligationsansatz	1 $\mu$ l
$\Sigma$	25 $\mu$ l

Die Inkubation erfolgte wie im Inkubationsprotokoll beschrieben.

#### Inkubationsprotokoll für Präselektive PCR

Temperatur	Zeit	Zyklen
95 °C	3 min	} 20x
94 °C	20 s	
56 °C	30 s	
72 °C	2 min	

### 4. Selektive PCR

Als vierter Schritt der fAFLP wurde eine selektive PCR durchgeführt, bei der das Produkt der präselektiven PCR das Template bildete. Diese wurde mit folgendem Mastermix-Ansatz durchgeführt:

#### Mastermix-Ansatz für Selektive PCR

ReddyMix PCR Master Mix (Abgene)	18,0 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub> [25 mM]	0,8 $\mu$ l
Taqsel [100 pmol/ $\mu$ l]	0,2 $\mu$ l
FAM Hindsel [10 pmol/ $\mu$ l]	0,3 $\mu$ l
Präselektives PCR Produkt	0,7 $\mu$ l
$\Sigma$	20,0 $\mu$ l

<i>Temperatur</i>	<i>Zeit</i>	<i>Zyklen</i>
95 °C	3 min	
94 °C	20 s	
66 °C	30 s	}10x
72 °C	2 min	
94 °C	20 s	
56 °C	30 s	
72 °C	2 min	}20x
60 °C	30 min	

Die verwendeten Primer hatten exakt die gleiche Sequenz, waren jedoch an ihren 3'-Enden nochmals um ein, zwei bzw. drei Nukleotide verlängert. Dies hatte zur Folge, dass in diesem letzten Schritt nur jedes vierte Fragment vervielfacht wurde. Somit wurde die Vielzahl der Fragmente auf ein gut auswertbares Maß (max. 100 Banden) reduziert. Anschließend wurden die PCR-Produkte sequenziert. Mittels Kapillar-Gelelektrophorese, die mit Polyacrylamidgel gefüllt war, wurden die fAFLP-Produkte elektrophoretisch aufgetrennt und gegen den Standardmarker, Genscan 500, der mit dem Farbstoff Rox markiert wurde, gemessen. Nach Erhalt der chromatographischen Darstellung wurde mit Hilfe des Computerprogramms BioNumerics (Sint-Martens-Latem, Belgien) das erhaltene Bandenmuster ausgewertet.

## **4.6 Bestimmung der Begleitflora**

### **4.6.1 Standard-Prüfmethoden**

Folgende Standard-Prüfmethoden fanden für die Bestimmung der Begleitflora Anwendung (Tab. 22).

**Tabelle 22: Bestimmung der Begleitflora**

Anhand der Standard-Prüfmethoden nach der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB

<i>Method</i>	<i>Zielerreger</i>	<i>Nährmedium</i>	<i>Bebrütungs-temperatur [°C]</i>	<i>Bebrütungs-dauer [h]</i>	<i>Atmosphäre</i>	<i>Koloniemorphologie</i>
L 06.00-19 <sup>1</sup>	mesophile aerobe GKZ	PC-Agar	30	72±2	aerob	alle
Kielwein (1969)	<i>Aeromonas</i> spp.	GSP- Agar	30	48±2	aerob	große, gelbe Kolonien mit gelber Umgebung
L 01.00-3 <sup>1</sup>	Coliforme	VL-Agar	30	48±2	anaerob	rote Kolonien (Ø 1-2 mm) mit rötlichem Präzipitationshof
L 06.00-36 <sup>1</sup>	<i>Escherichia</i> <i>coli</i>	ECD- Agar (fluor.- opt. Verf.)	44	16 bis 18	aerob	Kolonien, die durch Spal- tung von 4- Methylumbelliferyl-β-D- Glucuronid (MUG) bei UV-Licht mit Wellenlänge 360 <sub>nm</sub> oder 366 <sub>nm</sub> blau- fluoreszierend erscheinen, im Indol-Test bestätigt
L 06.00-25 <sup>1</sup>	<i>Entero- bacteriaceae</i>	VG-Agar	30	48±2	anaerob	rote Kolonien mit rötli- chem Präzipitationshof
Kielwein (1969, 1971)	<i>Pseudo- monas</i> spp.	GSP- Agar	30	48±2	aerob	große Kolonien mit bläu- lich schimmernder Ober- fläche und rotvioletter Umgebung

ECD: Escherichia-coli-Direkt-Agar; GKZ: Gesamtkeimzahl; VG: Kristallviolett-Neutralrot-Galle-Glucose-Agar; VL: Kristallviolett-Neutralrot-Galle-Lactose-Agar; PC: Plate-Count-Agar; GSP: Pseudomonas-Aeromonas-Selektivagar;

<sup>1</sup> nach § 64 Lebensmittel-, Bedarfsgegenstände- und Futtermittelgesetzbuch

#### 4.6.2 Isolierung und Quantifizierung der Begleitflora

Während der Kontaminationsversuche wurde die Begleitflora direkt vor der Kontamination sowie 24 Stunden nach der Kontamination bestimmt. Während der Hälterungsversuche fand die Bestimmung der Begleitflora ebenfalls vor der Kontamination und nach 24-stündiger Kontamination statt sowie am Ende der Hälterungszeiträume nach sieben Tagen. Über den gesamten Zeitraum der Lagerungsversuche wurde täglich die Begleitflora in allen Geweberesten aus allen Lagerungsbedingungen bestimmt.

Nachdem die Proben der Muschel-Gewebereste (MR) aufgearbeitet worden waren, fand die Bestimmung der Begleitflora über eine serielle Verdünnung mit gepuffertem Peptonwasser bis zur Verdünnung 10<sup>-4</sup> statt.

Mit einer sterilen Pipette wurden 50 µl unverdünnte homogenisierte Probe und jeweils 50 µl der Probe aus den hergestellten Verdünnungsstufen auf einen zuvor eingeteilten Sektor der

jeweiligen Nährböden aufgetropft. Mit der Pipetten-Spitze wurde das Inokulum gleichmäßig auf der Sektorfläche verteilt.

Aus den Koloniezahlen der niedrigsten und der nächsthöheren auswertbaren Verdünnungsstufe wurde der gewichtete Mittelwert  $\bar{c}$  berechnet.

Der Berechnung lag die Farmiloe'sche Formel zugrunde (Farmiloe *et al.*, 1954).

$$\bar{c} = \frac{\sum c}{n_1 \times 1 + n_2 \times 0,1} \times d$$

$\bar{c}$	gewogenes arithmetisches Mittel der Koloniezahlen
$\sum c$	Summe der Kolonien aller Sektoren, die bei der Berechnung herangezogen wurden (niedrigste und nächst höhere auswertbare Verdünnungsstufe)
$n_1$	Anzahl der Sektoren der niedrigsten auswertbaren Verdünnungsstufe
$n_2$	Anzahl der Sektoren der nächst höheren auswertbaren Verdünnungsstufe
$d$	Verdünnungsfaktor der niedrigsten ausgewerteten Verdünnungsstufe

Die Keimzahl je g oder ml der Probe wurde durch Multiplikation mit dem Verdünnungsfaktor erhalten.

### 4.6.3 Mesophile aerobe Gesamtkeimzahl

Die Bestimmung der mesophilen aeroben Gesamtkeimzahl erfolgte per Tropfplatten-Verfahren nach der Methode L 06.00–19 der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB.

Danach wurden zur mesophilen aeroben Gesamtkeimzahl alle Kolonien gezählt, die nach festgelegtem Verfahren auf dem Plate-Count-Agar (PC-Agar) makroskopisch zählbar waren.

Die Platten wurden mit dem Boden nach oben unter aeroben Bedingungen im Brutschrank bei 30 °C für 72±2 Stunden bebrütet. Nach der Bebrütung wurden alle auf den jeweiligen Sektoren gewachsenen Kolonien gezählt.

Bei der Auswertung wurden nur Sektoren berücksichtigt, bei denen zwischen fünf bis 50 Kolonien vorlagen. Die untere Nachweisgrenze lag bei <10<sup>2</sup> KbE/g.

### 4.6.4 *Aeromonas* spp.

Die Bestimmung der Aeromonaden erfolgte per Tropfplatten-Verfahren nach der Methode von Kielwein (1969).

Danach wurden unter Aeromonaden Oxidase- und Katalase-positive Bakterien verstanden, die nach festgelegtem Verfahren auf Pseudomonas-Aeromonas-Selektivagar (GSP-Selektivagar) große, gelbe Kolonien mit gelber Umgebung bilden.

Die Platten wurden mit dem Boden nach oben unter aeroben Bedingungen im Brutschrank bei 30 °C für 48±2 Stunden bebrütet. Nach der Bebrütung wurden alle charakteristischen Kolonien (gelb mit gelber Umgebung, Durchmesser 1,5-2,5 mm) der jeweiligen Sektoren gezählt. Bei der Auswertung wurden nur Sektoren berücksichtigt, bei denen zwischen fünf bis 50 Kolonien vorlagen.

Die Kolonien wurden dem Katalase- und Oxidase-Test unterzogen. Für den Katalase-Test wurde mit einer sterilen Platindrahtöse ein Teil der zu prüfenden Kolonie aufgenommen und auf einen trockenen Glasobjektträger aufgetragen. Ein Tropfen Katalase-Reagenz (3 % wässrige H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung) wurde auf die Bakterienmasse gegeben. Eine positive Reaktion lag bei sofortiger und intensiver Gasbildung vor.

Für den Oxidase-Test wurde mit einer sterilen Platindrahtöse ein Teil der zu prüfenden Kolonie aufgenommen, auf die Reaktionszone des Teststäbchens aufgebracht und dort mit der Impföse verrieben. Nach 45 Sekunden wurde die Farbe der Reaktionszone mit der Farbskala verglichen. Eine positive Reaktion lag bei einer blauen bis violetten Verfärbung der Reaktionszone vor.

Bei der Berechnung der Keimzahl von Aeromonaden wurde der prozentuale Anteil der im Katalase- und Oxidase-Test positiven Kolonien berücksichtigt. Wenn mindestens 80 % der ausgewählten typischen Kolonien eines Sektors Katalase- und Oxidase-positiv waren, wurden die nach Auszählung ermittelten Zahlen der typischen Kolonien als Anzahl der Aeromonaden-Kolonien gewertet. In allen anderen Fällen wurde die Anzahl der Aeromonaden-Kolonien eines Sektors nach dem prozentualen Anteil der positiven Katalase- und Oxidase-Tests berechnet.

Aus den Koloniezahlen der niedrigsten und der nächsthöheren auswertbaren Verdünnungsstufe wurde das gewogene arithmetische Mittel  $\bar{c}$  berechnet (siehe 4.6.2). Die untere Nachweisgrenze lag bei  $<10^2$  KbE/g.

#### 4.6.5 Coliforme Bakterien

Die Bestimmung coliformer Keime erfolgte per Tropfplatten-Verfahren nach der Methode L 01.00–3 der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB.

Coliforme Keime waren im Sinne der Methode L 01.00–3 Mikroorganismen die sich als rote Kolonien mit einem Durchmesser von 1 mm bis 2 mm und rötlichem Präzipitationshof auf Kristallviolett-Neutralrot-Galle-Lactose-Agar (VRB-Agar) darstellen. Auch Kolonien ohne Präzipitat können bisweilen Coliforme-Kolonien sein. Kolonien ohne Präzipitat wurden stichprobenweise mittels Enterotube II einer Speziesdifferenzierung unterzogen.

Die Platten wurden mit dem Boden nach oben unter anaeroben Bedingungen im Brutschrank bei 30 °C für 48±2 Stunden bebrütet. Nach der Bebrütung wurden alle charakteristischen Kolonien (rötlich mit rötlichen Präzipitationshöfen) der jeweiligen Sektoren gezählt. Auch solche Kolonien die atypisch erschienen, nach Enterotube II aber als Coliforme-Kolonien identifiziert wurden, wurden berücksichtigt.

Bei der Auswertung wurden nur Sektoren berücksichtigt, bei denen zwischen fünf bis 50 Kolonien vorlagen.

Aus den Koloniezahlen der niedrigsten und der nächsthöheren auswertbaren Verdünnungsstufe wurde das gewogene arithmetische Mittel  $\bar{c}$  berechnet (siehe 4.6.2). Die untere Nachweisgrenze lag bei  $<10^2$  KbE/g.

### 4.6.6 *E. coli*

Die Bestimmung von *E. coli* erfolgte per fluoreszenzoptischem Verfahren nach der Methode L 06.00–36 der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB.

Unter *E. coli* wurden im Sinne der Methode L 06.00–36 gram-negative Bakterien verstanden, die nach festgelegtem Verfahren durch Spaltung von 4-Methylumbelliferyl- $\beta$ -D-Glucuronid (MUG) bei Anregung durch UV-Licht bei einer Wellenlänge von 360 nm oder 366 nm als blau-fluoreszierende Kolonien erschienen und im Indol-Test positiv reagierten.

Für die Bestimmung von *E. coli* wurde das Wiederbelebungsverfahren angewendet, bei dem mit einer sterilen Pinzette ein Cellulose-Acetat-Membranfilter auf die getrocknete Oberfläche des Glutamat-Agars gelegt wurde. Nachfolgend wurde 1 ml der unverdünnten homogenisierten Probe auf den Membranfilter gegeben. Mit der Pipetten-Spitze wurde dann das Inokulum gleichmäßig über die Membranoberfläche verteilt.

Die beimpften Platten wurden mit dem Boden nach unten für vier Stunden im Brutschrank bei 37 °C unter aeroben Bedingungen vorbebrütet.

Der beimpfte und vorbebrütete Membranfilter wurde dann auf den *Escherichia-coli*-Direkt-Agar (ECD-Agar) überführt. Die Platten wurden mit dem Boden nach unten bei 44 °C im Brutschrank für 16-18 Stunden unter aeroben Bedingungen bebrütet.

Unter der UV-Lampe, mit Licht einer Wellenlänge von 360 nm oder 366 nm, erscheinen die  $\beta$ -D-Glucuronidase-positiven Kolonien blau-fluoreszierend. Diese wurden, wenn vorhanden, gekennzeichnet und gezählt.

Zur Bestätigung der blau-fluoreszierenden Kolonien wurde ein Indol-Test durchgeführt. Auf einen Objektträger wurde ein Tropfen Indol-Reagenz mit einem Teil der Kolonie vermischt. Eine positive Indol-Reaktion wurde durch Rosa- bzw. Rotfärbung innerhalb von zehn Sekunden angezeigt. Bei der Auswertung muss der Anteil der im Indol-Test positiven Kolonien berücksichtigt werden. Erweisen sich alle getesteten Kolonien als Indol-positiv, werden zur Berechnung der Anzahl an *E. coli* alle blau-fluoreszierenden Kolonien zugrunde gelegt. Reagieren weniger Kolonien positiv, wird die Anzahl an *E. coli* nach dem prozentualen Anteil der positiven Indol-Nachweisreaktionen berechnet.

Beim Zählen wurden nur solche Platten berücksichtigt, auf denen eine bis 150 Kolonien vorlagen.

Aus den Koloniezahlen der niedrigsten und der nächsthöheren auswertbaren Verdünnungsstufe wurde das gewogene arithmetische Mittel  $\bar{c}$  berechnet (siehe 4.6.2). Die untere Nachweisgrenze lag bei  $<10^1$  KbE/g.



#### 4.6.7 *Enterobacteriaceae*

Die Bestimmung der *Enterobacteriaceae* erfolgte per Tropfplatten-Verfahren nach der Methode L 06.00–25 der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB.

Unter *Enterobacteriaceae* wurden im Sinne der Methode L 06.00–25 Mikroorganismen verstanden, die nach festgelegtem Verfahren anaerob Säure aus Glucose bilden und als rote Kolonien mit rötlichem Präzipitationshof auf dem Kristallviolett-Neutralrot-Galle-Glucose-Agar nach MOSSEL (VRBD-Agar) erschienen. Die Platten wurden mit dem Boden nach oben unter anaeroben Bedingungen im Brutschrank bei 30 °C für 48±2 Stunden bebrütet. Nach der Bebrütung wurden alle charakteristischen roten Kolonien mit Präzipitationshöfen der jeweiligen Sektoren gezählt.

Bei der Auswertung wurden nur Sektoren berücksichtigt, bei denen zwischen fünf bis 50 Kolonien vorlagen.

Aus den Koloniezahlen der niedrigsten und der nächsthöheren auswertbaren Verdünnungsstufe wurde das gewogene arithmetische Mittel  $\bar{c}$  berechnet (siehe 4.6.2). Die untere Nachweisgrenze lag bei  $<10^2$  KbE/g.

#### 4.6.8 *Pseudomonas* spp.

Die Bestimmung der Pseudomonaden erfolgte per Tropfplatten-Verfahren nach der Methode von Kielwein (1969; 1971).

Nach der Methode L 06.00–43 wurden unter Pseudomonaden Oxidase- und Katalase-positive Bakterien verstanden, die nach festgelegtem Verfahren auf Pseudomonas-Aeromonas-Selektivagar (GSP-Selektivagar) große Kolonien mit bläulich schimmernder Oberfläche und rotvioletter Umgebung bildeten.

Die Platten wurden mit dem Boden nach oben unter aeroben Bedingungen im Brutschrank bei 30 °C für 48±2 Stunden bebrütet. Nach der Bebrütung wurden alle charakteristischen Kolonien mit bläulichem Schimmer und rotvioletter Umgebung sowie einem Durchmesser von 1,5-2,5 mm gezählt.

Bei der Auswertung wurden nur Sektoren berücksichtigt, bei denen fünf bis 50 Kolonien vorlagen.

Die ausgewählten Kolonien wurden dem Katalase- und Oxidase-Test unterzogen (vgl. Abschnitt 3.7.4). Bei der Berechnung der Keimzahl an Pseudomonaden wurde der prozentuale Anteil der im Katalase- und Oxidase-Test positiven Kolonien berücksichtigt. Wenn mindestens 80 % der ausgewählten typischen Kolonien eines Sektors Katalase- und Oxidase-positiv waren, wurden die nach Auszählung ermittelten Zahlen der typischen Kolonien als Anzahl der Pseudomonaden-Kolonien gewertet. In allen anderen Fällen wurde die Anzahl der Pseudomonaden-Kolonien eines Sektors nach dem prozentualen Anteil der positiven Katalase- und Oxidase-Tests berechnet.

Aus den Koloniezahlen der niedrigsten und der nächsthöheren auswertbaren Verdünnungsstufe wurde das gewogene arithmetische Mittel  $\bar{c}$  berechnet (siehe 4.6.2). Die untere Nachweisgrenze lag bei  $<10^2$  KbE/g.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Wachstumsverhalten von *Vibrio* spp.

Das Wachstumsverhalten von *V. parahaemolyticus* (SR3) und *V. cholerae* (SR12) wurde im biologischem Replikate untersucht. Dabei wurde die Zunahme der optischen Dichte bei 600 nm ( $OD_{600}$ ) während der ersten acht Stunden in APW gemessen.

Das Wachstumsverhalten der beiden Stämme wurde in OD-Zeitdiagrammen dargestellt (Abb. 10 A-B).

Über die ersten vier Stunden befand sich *V. parahaemolyticus* (SR3) in der Wachstumsphase, ein linearer Anstieg der OD wurde aufgezeichnet (Abb. 10 A). Ab der vierten Stunde erreichte das Wachstum die stationäre Phase / Plateauphase. *V. cholerae* (SR12) zeigte eine 2-stündige lag-Phase, bevor es zur logarithmischen Zunahme der Zelldichte in der exponentiellen Phase kam. *V. cholerae* erreichte die Plateauphase nach fünf Stunden (Abb. 10 B). *V. parahaemolyticus* (SR3) erreichte insgesamt eine höhere optische Dichte als *V. cholerae* (SR12).

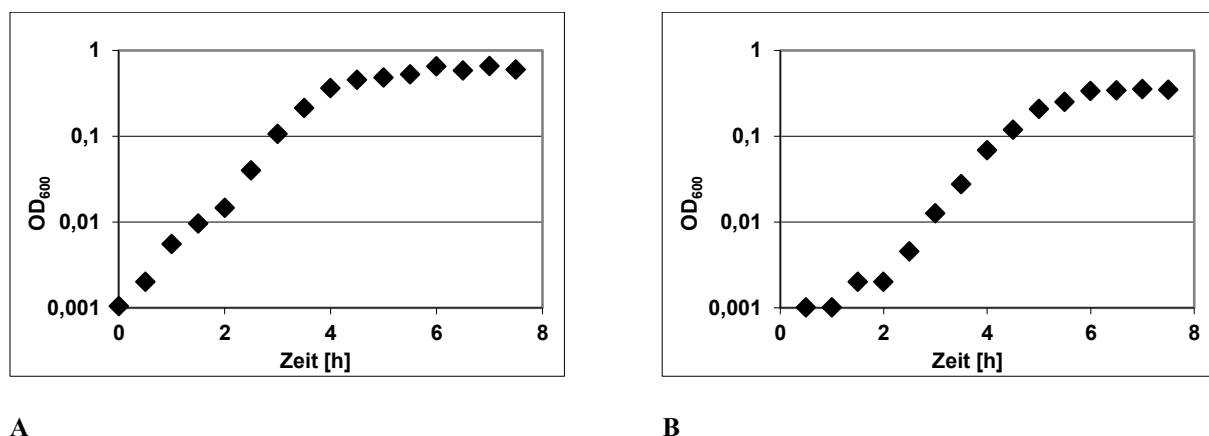


Abbildung 10 A-B: Wachstumskurven von *Vibrio* spp.

*V. parahaemolyticus* (A);

*V. cholerae* (B)

Darstellung der optischen Dichte bei 600 nm.

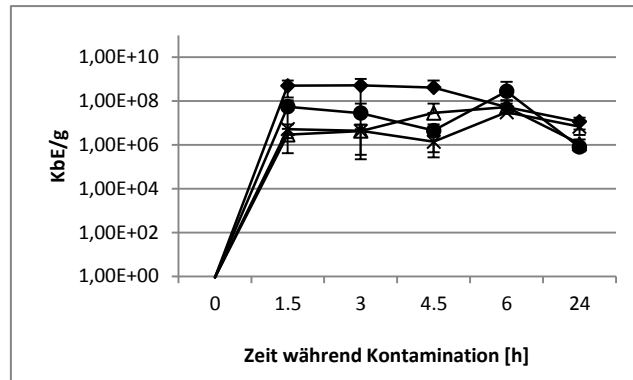
Mittelwert von zwei biologischen Replikaten während der ersten acht Stunden bei 37 °C.

### 5.2 Kontaminations-, Hälterungs- und Lagerungsversuche mit *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* oder *V. vulnificus* kontaminierten *M. edulis*

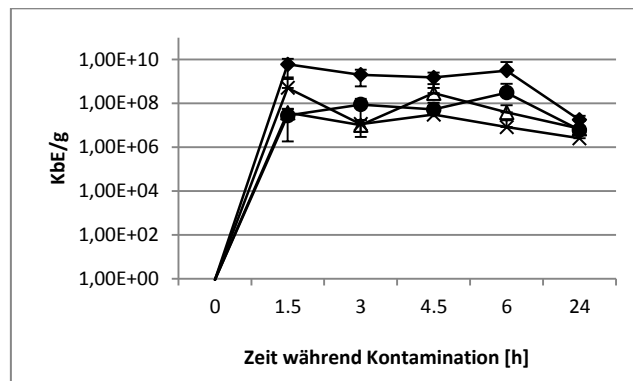
#### 5.2.1 Kontaminationsversuche

In einzeln durchgeführten Kontaminationsversuchen, in denen *M. edulis* mit einer der drei *Vibrio* spp. kontaminiert wurden, konnte eine Akkumulation von *V. parahaemolyticus* (SR3), *V. cholerae* (SR12) und *V. vulnificus* (V57/10) über einen Zeitraum von 24 Stunden beobach-

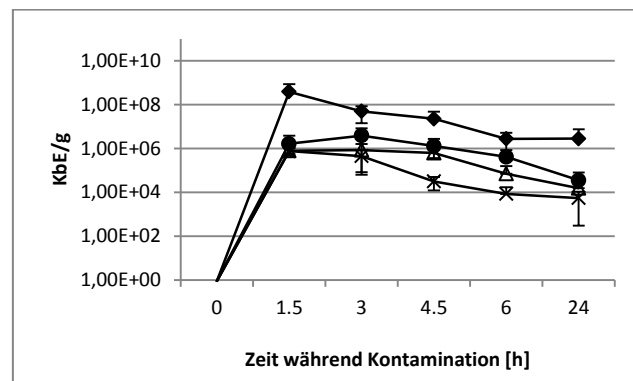
tet werden (Abb. 11 A-C)). Während der gesamten Studiendauer wurde die höchste Konzentration an *Vibrio* spp. in den Mitteldarmdrüsen (MDD), im Vergleich zu den anderen Probensegmenten, detektiert.



A



B



C

Abbildung 11 A-C: *Vibrio* spp. in *M. edulis* während der Kontamination;

*V. cholerae* in *M. edulis* (A); *V. parahaemolyticus* in *M. edulis* (B); *V. vulnificus* in *M. edulis* (C); Zellzahlen von *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* und *V. vulnificus* in verschiedenen Probensegmenten der *M. edulis* während der 24-stündigen Kontamination bei 15 °C.

◆ MDD: Mitteldarmdrüsen; ● MR: Muschel-Gewebereste; Δ MLW: Muschel-Lumen-Wässer;  
x TW-K: Tankwasser Kontaminationsbecken

### 5.2.1.1 Kontamination mit *V. cholerae*

Die Kontamination von *M. edulis* wurde im ersten Versuchsdurchgang mit einer Kontaminationsdichte von  $4,7 \times 10^{11}$  KbE<sub>(absolut)</sub> [KbE<sub>(abs.)</sub>] *V. cholerae* durchgeführt. In dem 20 Liter umfassenden Kontaminationsbecken entsprach dies einer Kontaminationsdosis von  $2,4 \times 10^7$  KbE/ml. Im zweiten Versuchsdurchgang wurde mit einer Kontaminationsdichte von  $4,6 \times 10^9$  KbE<sub>(abs.)</sub> *V. cholerae* kontaminiert. Dies entsprach einer Kontaminationsdosis von  $2,3 \times 10^5$  KbE/ml.

Die Kontamination von *M. edulis* mit *V. cholerae* (SR12) über einen Zeitraum von 24 Stunden zeigte nach 1,5 Stunden eine Anreicherung von *V. cholerae* in den Mitteldarmdrüsen (MDD) mit  $5,0 \times 10^8$  KbE/g (Abb. 11 A). Bis zu 4,5 Stunden wurde keine Reduktion der *V. cholerae*-Konzentration detektiert,  $4,1 \times 10^8$  KbE/g wurden zu diesem Zeitpunkt nachgewiesen.

Im Zeitraum zwischen 4,5 bis 6 Stunden reduzierte sich die Vibrionen-Konzentration auf  $5,3 \times 10^7$  KbE/g. Nach 24 Stunden war die Anzahl von *V. cholerae* (SR12) auf  $1,1 \times 10^7$  KbE/g innerhalb der MDD abgesunken. In den Muschel-Geweberesten (MR) und den Muschel-Lumen-Wässern (MLW) konnte ein ähnlicher Verlauf beobachtet werden. Nach einer schnellen Akkumulation von *V. cholerae* (SR12) innerhalb von 1,5 Stunden konnten Konzentrationen von  $5,5 \times 10^7$  KbE/g in den MR und  $2,9 \times 10^6$  KbE/ml in den MLW detektiert werden. Nach 24 Stunden sank die *V. cholerae* (SR12)-Konzentration in allen Probensegmenten um ca. 1 bis 2 log. Im Tankwasser des Kontaminationsbeckens (TW-K) wurden nach 1,5 Stunden  $5,3 \times 10^6$  KbE/ml *V. cholerae* detektiert. Nach 24 Stunden konnte im TW-K ein leichter Anstieg der Vibrionen-Konzentration detektiert werden.

### 5.2.1.2 Kontamination mit *V. parahaemolyticus*

Die Kontamination mit *V. parahaemolyticus* erfolgte im ersten Versuchsdurchgang mit einer Kontaminationsdichte von  $4,2 \times 10^{12}$  KbE<sub>(abs.)</sub> *V. parahaemolyticus*. In dem Kontaminationsbecken mit 20 Litern entsprach dies einer Kontaminationsdosis von  $2,1 \times 10^8$  KbE/ml.

Im zweiten Versuchsdurchgang wurden die *M. edulis* mit einer Kontaminationsdichte von  $4,0 \times 10^{12}$  KbE<sub>(abs.)</sub> *V. parahaemolyticus* kontaminiert. Dies entsprach einer Kontaminationsdosis von  $2,0 \times 10^8$  KbE/ml.

Im Zeitraum der 24-stündigen Kontamination von *M. edulis* erreichte *V. parahaemolyticus* nach 1,5 Stunden eine maximale Anreicherung in den MDD mit einer Konzentration von  $6,0 \times 10^9$  KbE/g (Abb. 11 B).

Die Dichte von *V. parahaemolyticus* in den MDD blieb in den ersten sechs Stunden nach der Inokulation annähernd gleich. Nach sechs Stunden wurden  $3,1 \times 10^9$  KbE/g detektiert. Die Konzentration von *V. parahaemolyticus* (SR3) in den MDD wurde im Zeitraum von sechs bis 24 Stunden auf  $1,8 \times 10^7$  KbE/g reduziert. In den Muschel-Geweberesten (MR) wurde in den

ersten sechs Stunden ein leichter Anstieg der Vibrionen-Konzentration beobachtet. Nach einer schnellen Akkumulation innerhalb der ersten 1,5 Stunden auf  $2,8 \times 10^7$  KbE/g erhöhte sich die Vibrionen-Konzentration in den MR nach sechs Stunden auf ca.  $3,1 \times 10^8$  KbE/g. Nach 24 Stunden wurden  $6,1 \times 10^6$  KbE/g detektiert. Die *V. parahaemolyticus*-Konzentration in den Muschel-Lumen-Wässern nahm im Zeitraum zwischen 1,5 Stunden mit  $3,8 \times 10^7$  KbE/g bis 4,5 Stunden mit  $2,9 \times 10^8$  KbE/g leicht zu. Die *V. parahaemolyticus*-Konzentration im Tankwasser wurde während der 24-stündigen Kontamination am stärksten reduziert. Nach 1,5 Stunden wurden  $5,1 \times 10^8$  KbE/g detektiert, nach 24 Stunden waren es  $2,6 \times 10^6$  KbE/g. Die *V. parahaemolyticus* (SR3)-Konzentration war nach 24 Stunden in allen Probensegmenten um ca. 1 bis 2 log-Stufen abgesunken.

### 5.2.1.3 Kontamination mit *V. vulnificus*

Die Kontamination mit *V. vulnificus* fand im ersten Versuchsdurchgang mit einer Kontaminationsdichte von  $4,0 \times 10^{10}$  KbE<sub>(abs.)</sub> *V. vulnificus* statt. In dem 20 Literbecken entsprach dies einer Kontaminationsdosis von  $2,0 \times 10^6$  KbE/ml. Im zweiten Versuchsdurchgang wurde mit einer Kontaminationsdichte von  $3,5 \times 10^{11}$  KbE<sub>(abs.)</sub> *V. vulnificus* kontaminiert, das entsprach einer Kontaminationsdosis von  $1,75 \times 10^7$  KbE/ml.

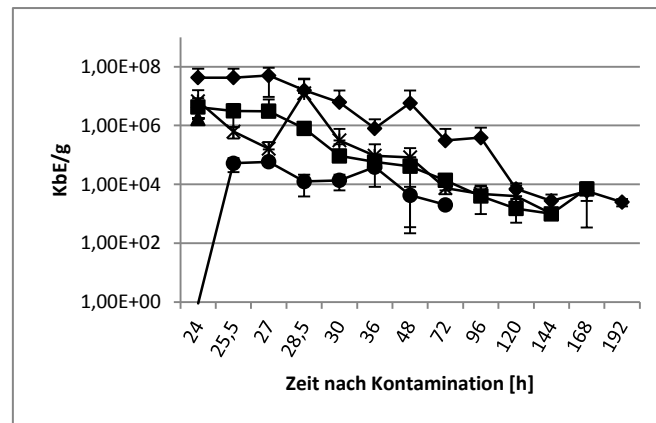
*V. vulnificus* erreichte nach 1,5 Stunden Anreicherung Werte von bis zu  $3,9 \times 10^8$  KbE/g in den MDD (Abb. 11 C). Nach dieser ersten Messung wurde eine stetige Zellzahlabnahme detektiert, wobei die *V. vulnificus*-Konzentration in den MDD nach 24 Stunden bis auf  $2,8 \times 10^6$  KbE/g zurückging. In den Muschel-Geweberesten (MR) und den Muschel-Lumen-Wässern (MLW) wurden die höchsten Vibrionen-Anreicherungen erst nach 3 Stunden beobachtet. Hierbei wurden in den MR nach 1,5 Stunden  $1,6 \times 10^6$  KbE/g und nach 3 Stunden  $3,9 \times 10^6$  KbE/g detektiert sowie in den MLW  $8,0 \times 10^5$  KbE/ml nach 1,5 Stunden und  $8,5 \times 10^5$  KbE/ml nach 3 Stunden. Nach 24 Stunden war die Vibrionen-Konzentration auf ca.  $10^4$  KbE/g in den MR bzw. ca.  $10^4$  KbE/ml in den MLW reduziert. Nach 1,5 Stunden betrug die Konzentration von *V. vulnificus* im Tankwasser  $7,5 \times 10^5$  KbE/ml. Eine langsame, aber stetige Abnahme der Vibrionen-Konzentration im Tankwasser wurde über den Zeitraum von 24 Stunden beobachtet. Die erreichte Endkonzentration betrug  $5,5 \times 10^3$  KbE/ml.

Während der Kontaminationsversuche waren nach artifizierlicher Kontamination weder auffällige sensorische noch pathologische Veränderungen in den Miesmuscheln ersichtlich.

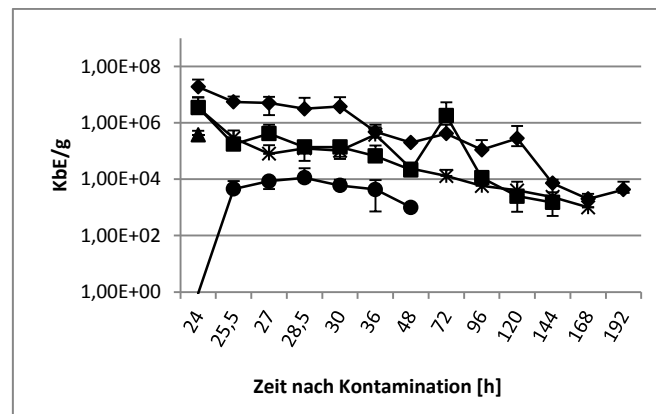
### 5.2.2 Hälterungsversuche

In den durchgeführten Hälterungsversuchen wurden mit jeweils einer *Vibrio* sp. kontaminierte *M. edulis* in einem Reinigungsbecken über einen Zeitraum von sieben Tagen gehältert (Abb. 12 A-C)

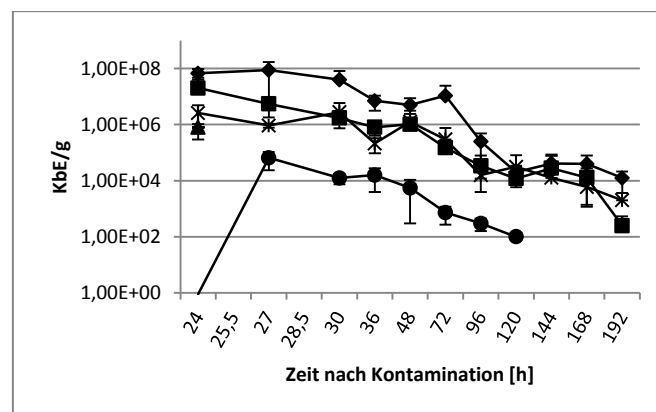
## Hälterungsversuche



A



B



C

Abbildung 12 A-C: *Vibrio* spp. in *M. edulis* während der Hälterung;

*V. cholerae* in *M. edulis* (A); *V. parahaemolyticus* in *M. edulis* (B); *V. vulnificus* in *M. edulis* (C); Zellzahlen von *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* und *V. vulnificus* nach 24-stündiger Kontamination in verschiedenen Probensegmenten der *M. edulis* während der 7-tägigen Hälterung bei 15 °C.

◆ MDD: Mitteldarmdrüsen; ■ MR: Muschel-Gewebereste; ▲ TW-K: Tankwasser Kontaminationsbecken; ● TW-H: Tankwasser Hälterungsbecken; ж MLW: Muschel-Lumen-Wässer

### 5.2.2.1 Hälterung von *M. edulis* nach Kontamination mit *V. cholerae*

Für die Hälterung von mit *V. cholerae* kontaminierten *M. edulis* wurden die Muscheln im ersten Versuchsdurchgang mit  $2,3 \times 10^{12}$  KbE<sub>(abs.)</sub> *V. cholerae* kontaminiert. Dies entsprach einer Kontaminationsdosis von  $1,2 \times 10^8$  KbE/ml. Im zweiten Versuchsdurchgang wurde mit  $4,8 \times 10^{13}$  KbE<sub>(abs.)</sub> *V. cholerae* kontaminiert, das entsprach im Kontaminationsbecken einer Kontaminationsdosis von  $2,4 \times 10^9$  KbE/ml.

Nach 24-stündiger Kontamination lagen *V. cholerae*-Konzentrationen von  $4,3 \times 10^7$  KbE/g in den MDD,  $4,3 \times 10^6$  KbE/g in den MR und  $6,8 \times 10^6$  KbE/ml in den MLW vor (Abb. 12 A). Die Konzentration im Tankwasser des Kontaminationsbeckens (TW-K) betrug nach 24 Stunden  $1,8 \times 10^6$  KbE/ml. Im Tankwasser des Hälterungsbeckens (TW-H) wurde 1,5 Stunden (auf Abb. 12 A: 25,5 Stunden) nach Umsetzung der Muscheln eine Bakterienkonzentration von  $5,3 \times 10^4$  KbE/ml detektiert. Innerhalb der ersten drei Stunden (auf Abb. 12 A: 24 bis 27 Stunden) blieben die Zellzahlen in den MDD, MR und TW-H stabil. In den MLW wurde eine sofortige Reduktion der Vibrionen-Konzentration detektiert, wobei nach 4,5 Stunden (auf Abb. 12 A: 28,5 Stunden) einmalig eine erhöhte Konzentration von  $1,3 \times 10^7$  KbE/g detektiert wurde.

Innerhalb der MDD, MR und MLW wurde die *V. cholerae*-Konzentration in den sieben Tagen der Hälterung um ca. 3-4 log reduziert. Nach 7-tägiger (192-stündiger) Hälterung wurde in den MDD eine *V. cholerae*-Konzentration von  $2,5 \times 10^3$  KbE/g detektiert. Am dritten Tag der Hälterung wurde im ersten Versuchsdurchgang zusätzlich zu *V. cholerae* auch *V. vulnificus* detektiert.

### 5.2.2.2 Hälterung von *M. edulis* nach Kontamination mit *V. parahaemolyticus*

Für die Hälterung mit *V. parahaemolyticus* kontaminierten *M. edulis* wurden die Muscheln im ersten Versuchsdurchgang mit einer Kontaminationsdichte von  $3,6 \times 10^{12}$  KbE<sub>(abs.)</sub> *V. parahaemolyticus* kontaminiert, was einer Kontaminationsdosis von  $1,8 \times 10^8$  KbE/ml entsprach. Im zweiten Versuchsdurchgang wurde mit einer Kontaminationsdichte von  $3,8 \times 10^{12}$  KbE<sub>(abs.)</sub> *V. parahaemolyticus* kontaminiert, das einer Kontaminationsdosis von  $1,9 \times 10^8$  KbE/ml entsprach.

Während der 7-tägigen Hälterung wurde der Verlauf der *V. parahaemolyticus*-Konzentration in *M. edulis* aufgezeichnet (Abb. 12 B). Nach 24-stündiger Kontamination, wurden *V. parahaemolyticus*-Konzentrationen von  $1,9 \times 10^7$  KbE/g in den MDD,  $3,4 \times 10^6$  KbE/g in den MR und  $3,4 \times 10^6$  KbE/ml in den MLW detektiert. Die Vibrionen-Konzentration im Tankwasser des Kontaminationsbeckens (TW-K) betrug nach 24 Stunden  $3,8 \times 10^5$  KbE/ml.

Nach Umsetzung der Muscheln in das Hälterungsbecken wurden im Tankwasser (TW-H) nach 1,5 Stunden (auf Abb. 12 B: 25,5 Stunden) bis zu  $4,5 \times 10^3$  KbE/ml *V. parahaemolyticus* detektiert. Bis zu 12 Stunden (auf Abb. 12 B: 36 Stunden) nach Umsetzung der Muscheln



konnten im TW-H keine Veränderungen der *V. parahaemolyticus*-Konzentration nachgewiesen werden. Nach 48 Stunden wurden letztmalig *V. parahaemolyticus* im TW-H mit  $1,0 \times 10^3$  KbE/g detektiert.

Innerhalb der MDD sank die Konzentration von *V. parahaemolyticus* in den ersten 1,5 Stunden auf  $5,5 \times 10^6$  KbE/g. Bis zu 30 Stunden blieb diese Konzentration stabil und sank dann in den folgenden 6 Stunden auf  $3,8 \times 10^5$  KbE/g. In den MR war die *V. parahaemolyticus*-Konzentration in den ersten 1,5 Stunden (auf Abb.12 B: 25,5 Stunden) der Hälterung um ca. 1 log auf  $2,9 \times 10^5$  KbE/g reduziert, blieb dann bis zu 30 Stunden stabil und sank dann bis zur 144-stündigen Hälterung auf  $2,3 \times 10^3$  KbE/g ab. Am zweiten Tag wurde in den MR einmalig ein Konzentrationspeak von  $1,8 \times 10^6$  KbE/g detektiert.

Nach sieben Tagen (192 Stunden) war die *V. parahaemolyticus*-Konzentration in den MDD auf  $4,3 \times 10^3$  KbE/g reduziert.

Vor der Kontamination mit *V. parahaemolyticus* wurde im ersten Versuchsdurchgang in der Nullprobe *V. alginolyticus* detektiert.

### 5.2.2.3 Hälterung von *M. edulis* nach Kontamination mit *V. vulnificus*

Die Kontamination und Bearbeitung der zwei Hälterungsversuche mit *V. vulnificus* wurden im Bundesinstitut für Risikobewertung von und in Zusammenarbeit mit Keike Schwartz durchgeführt.

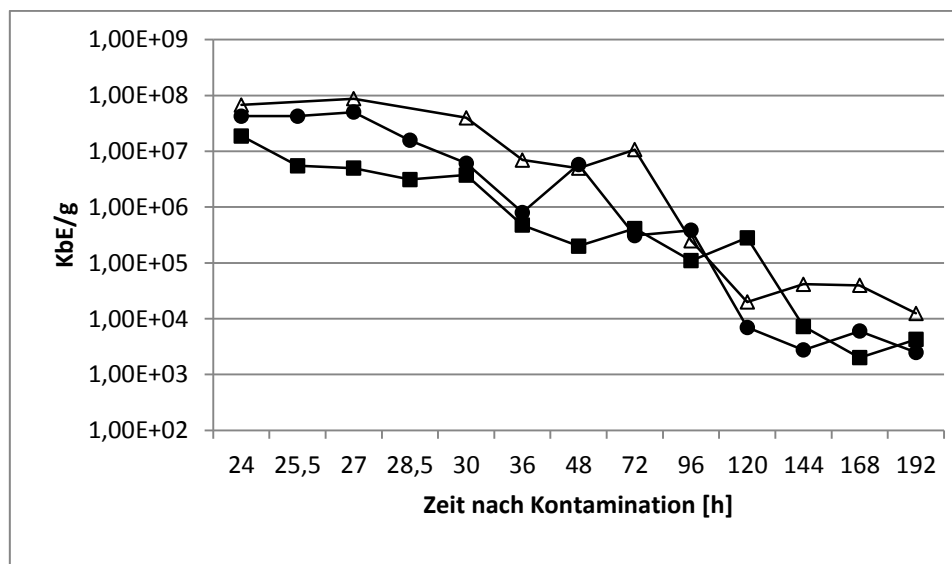
In dieser Studie wurden die Muscheln nach Umsetzung ins Hälterungsbecken nach 3, 6, 12 und 24 Stunden und daraufhin täglich untersucht.

Nach 24-stündiger Kontamination wurden *V. vulnificus*-Konzentrationen von  $6,8 \times 10^7$  KbE/g in den Mitteldarmdrüsen (MDD),  $2,0 \times 10^7$  KbE/g in den Muschel-Geweberesten (MR) und  $2,6 \times 10^6$  KbE/ml in den Muschel-Lumen-Wässern (MLW) von *M. edulis* detektiert (Abb. 12 C). Die Konzentration im Tankwasser des Kontaminationsbeckens (TW-K) betrug nach 24 Stunden  $8,0 \times 10^5$  KbE/ml. Im Tankwasser des Hälterungsbeckens (TW-H) wurde 1,5 Stunden nach Umsetzung der Muscheln (auf Abb. 12 C: 25,5 Stunden), eine *V. vulnificus*-Konzentration von  $6,5 \times 10^4$  KbE/ml detektiert. Nach 36 Stunden (12 Stunden nach Hälterungsbeginn) waren die *V. cholerae*-Konzentrationen um ca. 1 log reduziert, im TW-H auf  $1,6 \times 10^4$  KbE/ml, in den MDD auf  $7,0 \times 10^6$  KbE/g und in den MR auf  $8,0 \times 10^5$  KbE/g. Nach 192 Stunden (sieben Tagen) wurde *V. vulnificus* in den MDD mit bis zu  $1,3 \times 10^4$  KbE/g detektiert, das entsprach einer weiteren Reduktion der Zellzahlen um ca. 2 log. Nach dieser 1-wöchigen Hälterung sowie nach 9-tägiger Hälterung (250-stündiger) konnten Vibrionen in den MDD, MR und MLW detektiert werden.

#### 5.2.2.4 Vergleich der *Vibrio* spp.-Konzentrationen in den Mitteldarmdrüsen von *M. edulis* während der Hälterung

Nach Anreicherung der verschiedenen *Vibrio* spp. in *M. edulis*, durch die 24-stündige Kontamination wurden Konzentrationen im Bereich von  $1,9 \times 10^7$  KbE/g bis  $6,8 \times 10^7$  KbE/g in den Mitteldarmdrüsen detektiert (Abb. 13).

Die Kontaminationssuspensionen enthielten ca.  $10^{12}$  KbE<sub>(abs.)</sub> *Vibrio* sp., entsprechend einer Kontaminationsdosis von  $5 \times 10^8$  KbE/ml in dem 20 Liter-Hälterungsbecken. Im Zeitraum von sieben Tagen wurde eine langsame, aber kontinuierliche Reduzierung der Vibrionen-Konzentrationen aller drei Spezies beobachtet. Nach sieben Tagen wurden Konzentrationen im Bereich von  $2,5 \times 10^3$  KbE/g *V. cholerae* und  $1,3 \times 10^4$  KbE/g *V. vulnificus* detektiert. Die Konzentration von *V. parahaemolyticus* lag mit  $4,3 \times 10^3$  KbE/g zwischen denen von *V. vulnificus* und *V. cholerae*. Die Vibrionen-Konzentrationen wurden um ca. 3-4 log reduziert. Basierend auf diesen Daten wurde eine Abnahme von 0,02 log KbE/g pro Stunde berechnet.



**Abbildung 13: *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae* und *V. vulnificus* in MDD von *M. edulis* während der Hälterung;**

Zellzahlen von ● *V. cholerae*, ■ *V. parahaemolyticus* und △ *V. vulnificus* nach 24-stündiger Kontamination in den Mitteldarmdrüsen der *M. edulis* während der 7-tägigen Hälterung bei 15 °C.

Während der Hälterungsversuche waren nach artifizierlicher Kontamination weder auffällige sensorische noch pathologische Veränderungen in den Miesmuscheln ersichtlich.

#### 5.2.3 Lagerungsversuche

Für die Lagerungsstudien wurden jeweils ca. 200 Miesmuscheln mit jeweils einer *Vibrio* sp. kontaminiert. Nach 24-stündiger Kontamination wurden die Muscheln für die Lagerung in Vakuumbuteln (V) und Jutesäcken (J) verpackt. Ein Vakuum-Beutel enthielt fünf Muscheln mit 200 ml ASW (HW) und wurde nach Evakuierung verschweißt (vakuumiert). Jeder

Jutesack enthielt fünf Muscheln. Proben beider Verpackungsarten wurden zehn Tage lang bei 3 °C in schmelzendem Eis bzw. bei 15 °C im Klimaschrank gelagert. Die *Vibrio* spp.-Belastung der bei 3 °C gelagerten Miesmuscheln wurde täglich und die der bei 15 °C gelagerten Miesmuscheln alle zwei Tage untersucht.

### **5.2.3.1 Lagerung von *M. edulis* nach Kontamination mit *V. cholerae***

Für die Lagerung von *M. edulis* die mit *V. cholerae* kontaminiert waren, wurden die Muscheln im ersten Versuchsdurchgang mit einer Kontaminationsdichte von  $4,8 \times 10^{10}$  KbE<sub>(abs.)</sub> *V. cholerae* kontaminiert. Dies entsprach einer Kontaminationsdosis von  $2,4 \times 10^6$  KbE/ml. Im zweiten Versuchsdurchgang wurde mit einer Kontaminationsdichte von  $4,0 \times 10^{11}$  KbE<sub>(abs.)</sub> *V. cholerae* kontaminiert, entsprechend einer Kontaminationsdosis von  $2,0 \times 10^7$  KbE/ml.

Nach 24-stündiger Kontamination lagen *V. cholerae*-Konzentrationen von  $7,5 \times 10^6$  KbE/g in den MDD vor. In den MR wurden  $2,6 \times 10^7$  KbE/g detektiert, in den MLW  $2,6 \times 10^6$  KbE/ml und im TW-K  $7,5 \times 10^5$  KbE/ml.

Zum Zeitpunkt der Verpackung „Nullter Tag“ (nach 24-stündiger Kontamination) wurden die Muscheln in Vakuumbbeutel (V) und Jutesäcke (J) verpackt, um dann bei 3 °C in schmelzendem Eis und bei 15 °C im Klimaschrank über zehn Tage gelagert zu werden (Abb. 14 A-D).

*V. cholerae* in *M. edulis*

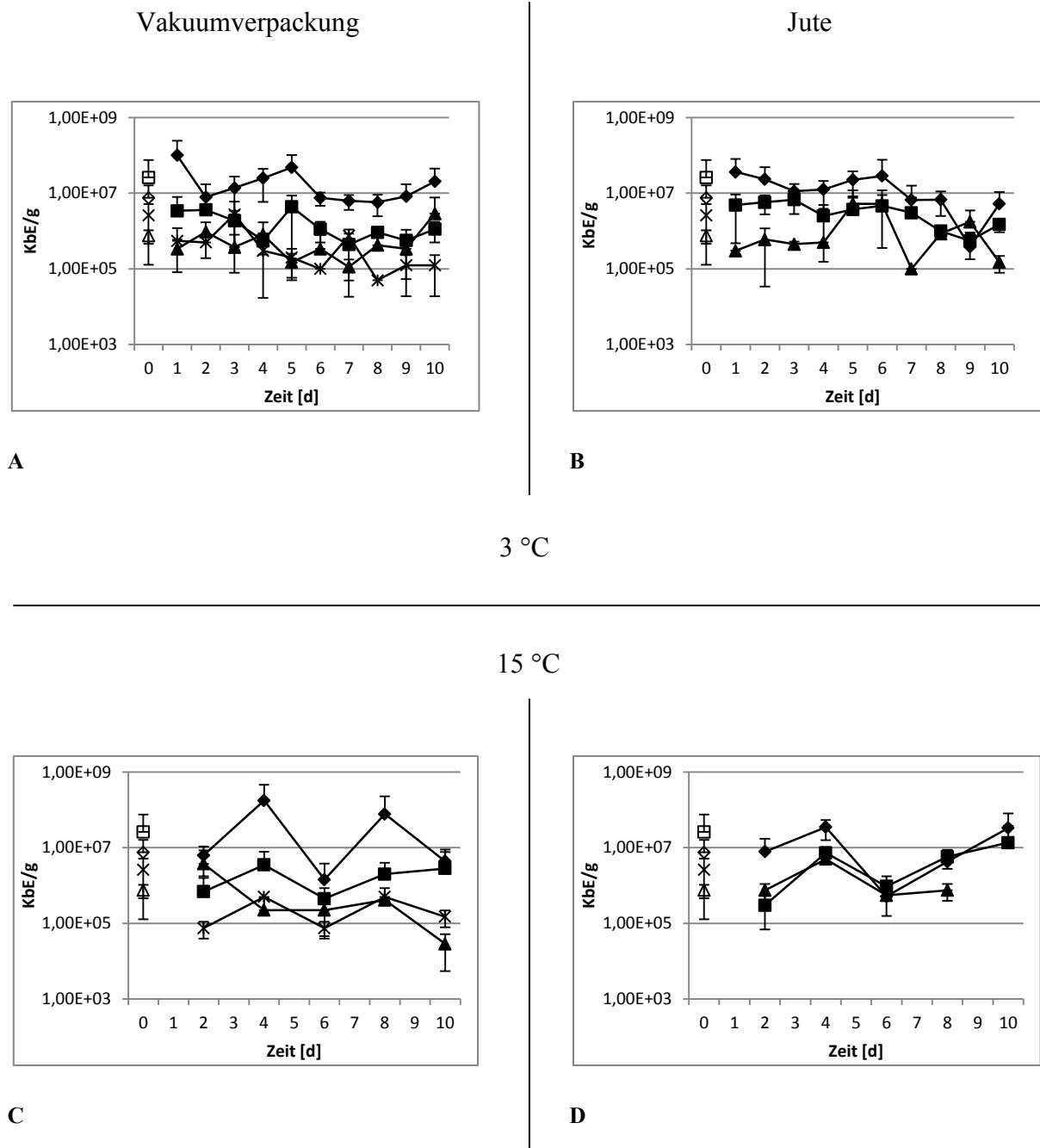


Abbildung 14 A-D: *V. cholerae* in *M. edulis* während der Lagerung;

Lagerung Vakuumpackung 3 °C (A), Lagerung Jute 3 °C (B),  
Lagerung Vakuumpackung 15 °C (C), Lagerung Jute 15 °C (D),

Zellzahlen von *V. cholerae* in verschiedenen Probensegmenten der *M. edulis*.

◇ / ◆ MDD: Mitteldarmdrüsen; □ / ■ MR: Muschel-Gewebereste; x / ж MLW: Muschel-Lumen-Wässer; Δ TW-K: Tankwasser Kontaminationsbecken; ▲ HW: Hälterungswasser aus Vakuumpackung;

Leere Symbole (◇ / □ / x / Δ) zum Zeitpunkt 0

Gefüllte Symbole (◆ / ■ / ж / ▲) während der 10-tägigen Lagerung

### Lagerung bei 3 °C in Vakuumverpackung

Während der Lagerung der Muscheln in der Vakuumverpackung bei 3 °C (V+3°C) wurde nach dem ersten Tag in den MDD *V. cholerae* in einer Dichte von  $1,0 \times 10^8$  KbE/g detektiert. Dies stellte im gesamten Studienzeitraum den höchsten Messwert dar (Abb. 14 A). Am zweiten Studientag lag die Vibrionen-Konzentration in den MDD bei  $7,9 \times 10^6$  KbE/g. Bis zum fünften Tag wurde ein Konzentrationsanstieg bis auf  $4,8 \times 10^7$  KbE/g detektiert. Am sechsten Tag lag die *V. cholerae*-Konzentration bei  $7,5 \times 10^6$  KbE/g und blieb bis zum zehnten Tag stabil. Am zehnten Tag wurden  $2,0 \times 10^7$  KbE/g *V. cholerae* in den MDD detektiert. In den MR konnten am ersten Tag  $2,6 \times 10^7$  KbE/g detektiert werden. Die *V. cholerae*-Konzentration stieg während des ersten Lagertages in den MDD der vakuumverpackten Muscheln an, während sie in den MR auf  $3,4 \times 10^6$  KbE/g abnahm. Innerhalb der 10-tägigen Studiendauer wurden *V. cholerae*-Zellzahlen in den MR im Bereich zwischen  $4,4 \times 10^6$  KbE/g (höchste Konzentration am fünften Tag) und  $4,4 \times 10^5$  KbE/g (niedrigste Konzentration am siebten Tag) detektiert. In den MLW war die Bakterienkonzentration mit  $5,5 \times 10^5$  KbE/ml nach dem ersten Tag der Lagerung um ca. 0,7 log niedriger, als sie unmittelbar nach der 24-stündigen Kontamination betrug. In diesem Probensegment nahm die Vibrionen-Konzentration über zehn Tage auf  $1,3 \times 10^5$  KbE/ml ab. Im HW der Vakuumverpackung konnten nach dem ersten Tag der Lagerung  $3,4 \times 10^5$  KbE/ml detektiert werden. Die geringste *V. cholerae*-Konzentration wurde im HW der Vakuumverpackung am siebten Tag mit  $1,1 \times 10^5$  KbE/g detektiert, danach stieg die Konzentration bis zum zehnten Tag auf  $2,9 \times 10^6$  KbE/g an. Zusätzlich zu dem zur Kontamination eingesetzten *V. cholerae* wurde im ersten Versuchsdurchgang am fünften Tag in den MDD *V. vulnificus* detektiert.

### Lagerung bei 3 °C in Jute

Nach dem ersten Lagerungstag wurden folgende Konzentrationen von *V. cholerae* in den einzelnen Probensegmenten der bei 3 °C in Jute (J+3°C) verpackten Muscheln detektiert: MDD  $3,7 \times 10^7$  KbE/g, MR  $4,9 \times 10^6$  KbE/g und MLW  $3,0 \times 10^5$  KbE/ml (Abb. 14 B).

Die höchste *V. cholerae*-Konzentration innerhalb der MDD wurde am ersten Tag detektiert. Mit  $3,8 \times 10^5$  KbE/g war die Konzentration am neunten Tag in den MDD am niedrigsten. An den anderen Tagen lag die *V. cholerae*-Konzentration in den MDD bei ca.  $1,5 \times 10^7$  KbE/g.

In den MR lag die *V. cholerae*-Konzentration durchschnittlich bei  $3,4 \times 10^6$  KbE/g. Alle Konzentrationen lagen zwischen  $6,8 \times 10^6$  KbE/g (dritter Tag) und  $5,5 \times 10^5$  KbE/g (neunter Tag). Am zehnten Tag wurden in den MR  $1,5 \times 10^6$  KbE/g *V. cholerae* detektiert.

In den MLW wurde im gesamten Studienzeitraum, mit Ausnahme an drei Tagen, die geringste *V. cholerae*-Konzentration mit  $5,0 \times 10^5$  KbE/ml bis  $1,0 \times 10^5$  KbE/g detektiert. An den Tagen fünf, sechs und neun wurden höhere Konzentrationen von *V. cholerae* gemessen, die mit Konzentrationen von  $5,3 \times 10^6$  KbE/ml (fünfter und sechster Tag) und  $1,8 \times 10^6$  KbE/ml (neunter Tag) über den Konzentrationen aus den MR lagen.

In den zehn Tagen der Lagerung konnten im zweiten Versuchsdurchgang am sechsten Tag nur vier anstelle von fünf Muscheln beprobt werden. Bei der anderen Muscheln lag aufgrund von Austrocknungsprozessen nur noch die Muschel-Schale mit stark eingetrocknetem Muschel-Rest vor.

Aus den hier beprobten *M. edulis* wurde am zehnten Tag des ersten Versuchsdurchganges in den MR *V. alginolyticus* detektiert.

### **Lagerung bei 15 °C in Vakuumverpackung**

Während der Lagerung der *M. edulis* bei 15 °C in Vakuumverpackungen (V+15°C) wurden die Miesmuscheln alle zwei Tage auf die Vibrionen-Konzentrationen hin untersucht (Abb. 14 C).

In den MDD wurden während der ersten und letzten Probenentnahmen ungefähr gleiche Konzentrationen detektiert (zweiter Lagerungstag  $6,3 \times 10^6$  KbE/g; zehnter Lagerungstag  $4,4 \times 10^6$  KbE/g). Die *V. cholerae*-Konzentrationen vom vierten und achten Tag lagen höher, mit  $1,8 \times 10^8$  KbE/g (vierter Tag) und  $7,8 \times 10^7$  KbE/g (achter Tag). Die niedrigste *V. cholerae*-Konzentration in den MDD wurde am sechsten Probenentnahmetag mit  $1,4 \times 10^6$  KbE/g detektiert.

In den MR wurden am zweiten Tag (erste Probenentnahme)  $6,9 \times 10^5$  KbE/g *V. cholerae* nachgewiesen. Zwei Tage später (vierter Tag, zweite Probenentnahme) konnte mit  $3,5 \times 10^6$  KbE/g die höchste Vibrionen-Konzentration gemessen werden. Nachdem am sechsten Tag die geringste Konzentration mit  $2,3 \times 10^5$  KbE/g gemessen wurde, zeichnete sich im weiteren Verlauf ein Anstieg ab, der bei  $2,8 \times 10^6$  KbE/g am zehnten Tag endete.

Die detektierte *V. cholerae*-Konzentration in den MLW am zweiten Tag war mit  $7,5 \times 10^4$  KbE/ml ca. 1,5 log niedriger als am Verpackungstag nach 24-stündiger Kontamination mit  $2,6 \times 10^6$  KbE/ml. Über den gesamten Studienzeitraum von zehn Tagen wurden Konzentrationen zwischen  $7,5 \times 10^4$  KbE/ml (zweiter und sechster Tag) und  $5,0 \times 10^5$  KbE/ml (vierter und achter Tag) detektiert.

Die *V. cholerae*-Konzentration im HW der Vakuumverpackung lag am ersten Probenentnahmetag bei  $3,8 \times 10^6$  KbE/ml. Am vierten und sechsten Lagerungstag wurden  $2,3 \times 10^5$  KbE/ml detektiert. Am achten Tag waren es  $4,1 \times 10^5$  KbE/ml bevor am letzten Tag der Lagerung (zehnter Tag) im HW der Vakuumverpackung die geringste *V. cholerae*-Konzentration mit  $2,9 \times 10^4$  KbE/ml detektiert wurde.

Am sechsten und achten Lagerungstag wurden in einem Versuchsdurchgang anstelle von fünf Muscheln nur zwei Muscheln untersucht, da die anderen Muscheln weitgehend lysiert waren, sodass eine Präparation und Aufteilung in verschiedene Probensegmente nicht mehr möglich war. Am zehnten Untersuchungstag konnten im ersten Versuchsdurchgang vier Muscheln untersucht werden, im Zweiten eine Muschel.

Im HW der Vakuumverpackung vom zehnten Lagerungstag wurde zusätzlich *V. vulnificus* detektiert.

Während des ersten Versuchsdurchganges fand in der Nacht vom neunten zum zehnten Tag ein Temperaturanstieg auf 29 °C statt. Der statistische Fehler wurde durch die generelle Zusammenführung der Daten aus beiden Versuchen verringert.

### **Lagerung bei 15 °C in Jute**

Während der ersten Probenentnahme (zweiter Lagerungstag) der in Jute verpackten *M. edulis* die bei 15 °C (J+15°C) gelagert wurden, konnten in den MDD  $7,9 \times 10^6$  KbE/g *V. cholerae* nachgewiesen werden (Abb. 14 D). In den MR war die Konzentration der Vibrionen mit  $3,0 \times 10^5$  KbE/g die niedrigste, die an diesem Tag nachgewiesen wurde. In den MLW wurden am ersten Probenentnahmetag  $7,5 \times 10^5$  KbE/ml detektiert. Am vierten Probenentnahmetag wurden in den MDD Konzentrationen von  $3,5 \times 10^7$  KbE/g detektiert. Am sechsten Lagerungstag wurde in den MDD die geringste *V. cholerae*-Konzentration mit  $5,1 \times 10^5$  KbE/g gemessen, die dann bis zum zehnten Lagerungstag auf  $3,3 \times 10^7$  KbE/g anstieg. Die Konzentrationen in den MR und MLW zeigten im Zeitraum vom zweiten bis zum sechsten Probenentnahmetag einen ähnlichen Verlauf. Am zweiten Tag lagen die *V. cholerae*-Konzentrationen bei ca.  $5,0 \times 10^5$  KbE/g und stiegen bis zum vierten Probenentnahmetag auf  $5,0 \times 10^6$  KbE/g an. Am sechsten Probenentnahmetag lagen alle gemessenen Konzentrationen aus MDD, MR und MLW im Bereich von  $5,5 \times 10^5$  KbE/g bis  $9,5 \times 10^5$  KbE/g. Ab dem sechsten Lagerungstag konnten Konzentrationszunahmen auf bis zu  $3,3 \times 10^7$  KbE/g in den MDD und  $1,4 \times 10^7$  KbE/g in den MR am zehnten Tag detektiert werden. Da am letzten Studientag (zehnter Lagerungstag) kein Muschel-Lumen-Wasser mehr zur Verfügung stand, endete die Messung am achten Tag mit  $7,5 \times 10^5$  KbE/ml. Im ersten Versuchsdurchgang konnten von den Muscheln am achten und zehnten Tag nur drei Muscheln, im zweiten Versuchsdurchgang nur eine Muschel präpariert werden. Die nicht präparierbaren Muscheln waren ausgetrocknet.

Da beide Verpackungsarten im selben Klimaschrank gelagert wurden, wurde auch hier während des ersten Versuchsdurchganges ein Temperaturanstieg zwischen dem neunten und zehnten Tag über Nacht beobachtet. Der statistische Fehler wurde durch die generelle Zusammenführung der Daten aus beiden Versuchen verringert.

Die höchsten *V. cholerae*-Konzentrationen über den gesamten Studienzeitraum von zehn Tagen wurden in den MDD detektiert, unabhängig von den verschiedenen Lagerungsvarianten (Vakuumverpackung 3 °C und 15 °C sowie in Jute 3 °C und 15 °C).

### **5.2.3.2 Lagerung von *M. edulis* nach Kontamination mit *V. parahaemolyticus***

Für die Lagerung von mit *V. parahaemolyticus* kontaminierten *M. edulis* wurde die 24-stündige Kontamination im ersten Versuchsdurchgang mit  $4,2 \times 10^{12}$  KbE<sub>(abs.)</sub> *V. parahaemo-*

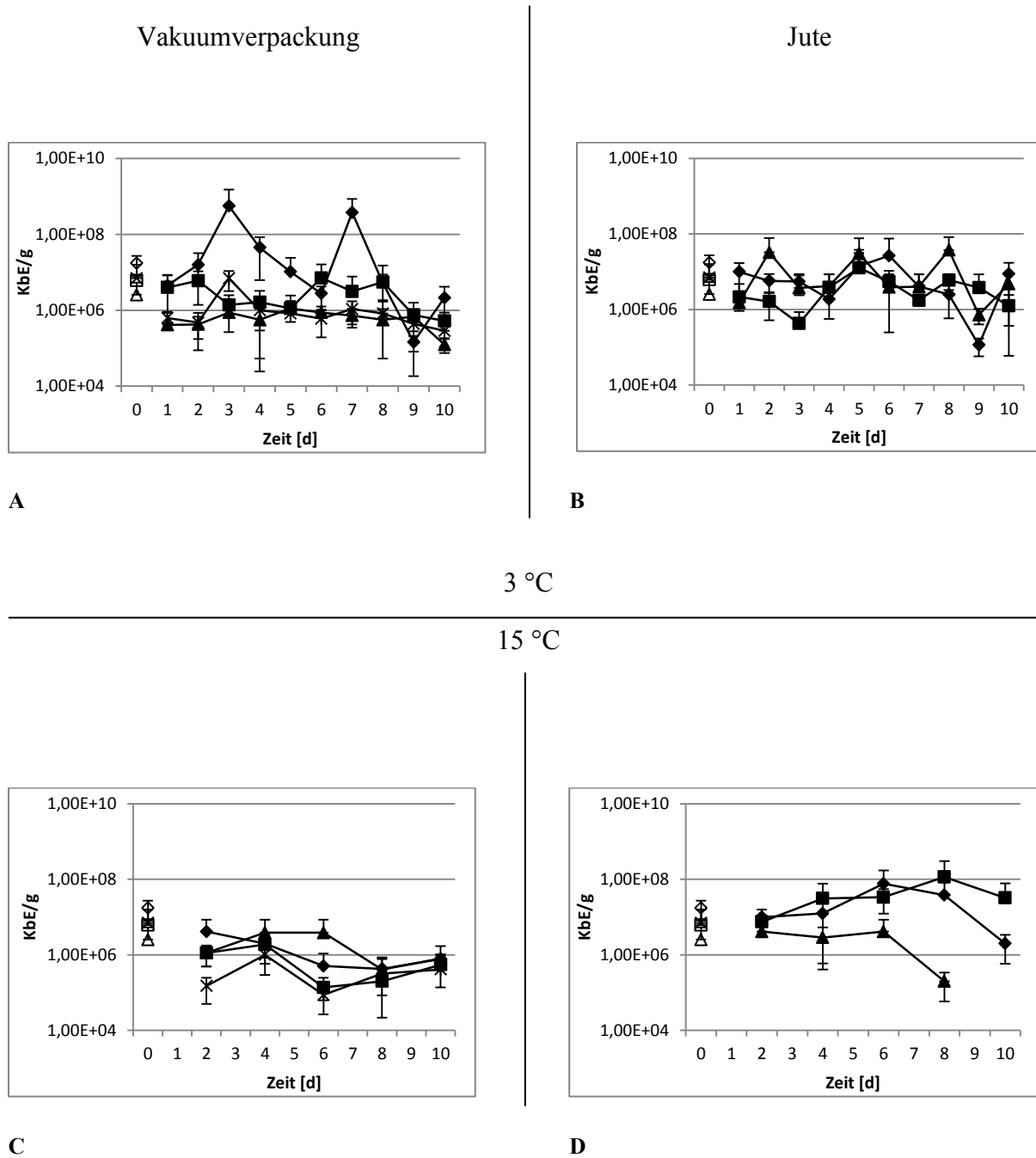
*lyticus* durchgeführt, das entsprach einer Kontaminationsdosis von  $2,1 \times 10^8$  KbE/ml im 20 Liter-Kontaminationsbecken.

Im zweiten Versuchsdurchgang wurde mit einer Kontaminationsdichte von  $4,0 \times 10^{12}$  KbE<sub>(abs.)</sub> *V. parahaemolyticus* kontaminiert, entsprechend einer Kontaminationsdosis von  $2,0 \times 10^8$  KbE/ml.

Nach 24-stündiger Kontamination wurden *V. parahaemolyticus*-Konzentrationen von  $1,8 \times 10^7$  KbE/g in den Mitteldarmdrüsen (MDD),  $6,1 \times 10^6$  KbE/g in den Muschel-Geweberesten (MR) und  $7,0 \times 10^6$  KbE/ml in den Muschel-Lumen-Wässern (MLW) detektiert. Die Konzentration im Tankwasser des Kontaminationsbeckens (TW-K) betrug nach 24-stündiger Kontamination  $2,6 \times 10^6$  KbE/ml.

Zum Zeitpunkt der Verpackung „Nullter Tag“ (nach 24-stündiger Kontamination) wurden die Muscheln in Vakuumbbeutel (V) und Jutesäcke (J) verpackt, um dann bei 3 °C in schmelzendem Eis und bei 15 °C im Klimaschrank über zehn Tage gelagert zu werden (Abb. 15 A-D).



*V. parahaemolyticus* in *M. edulis*Abbildung 15 A-D: *V. parahaemolyticus* in *M. edulis* während der Lagerung;

**Lagerung Vakuumverpackung 3 °C (E), Lagerung Jute 3 °C (F),  
Lagerung Vakuumverpackung 15 °C (G), Lagerung Jute 15 °C (H)**

Zellzahlen von *V. parahaemolyticus* in verschiedenen Probensegmenten der *M. edulis*

◇ / ◆ MDD: Mitteldarmdrüsen; □ / ■ MR: Muschel-Gewebereste; x / ж MLW: Muschel-Lumen-Wasser; Δ TW-K: Tankwasser Kontaminationsbecken; ▲ HW: Hälterungswasser aus Vakuumverpackung;

Leere Symbole (◇ / □ / x / Δ) zum Zeitpunkt 0, nach 24-stündiger Kontamination  
Gefüllte Symbole (◆ / ■ / ж / ▲) während der 10-tägigen Lagerung

### Lagerung bei 3 °C im Vakuumbbeutel

In den *M. edulis*, die mit *V. parahaemolyticus* kontaminiert waren und in Vakuumbeuteln bei 3 °C (V+3°C) gelagert wurden, konnten nach dem ersten Lagerungstag in den MDD Konzentrationen von  $4,5 \times 10^6$  KbE/g, in den MR von  $4,0 \times 10^6$  KbE/g und in den MLW von  $6,3 \times 10^5$  KbE/ml detektiert werden (Abb. 15 A). Die *V. parahaemolyticus*-Konzentration im HW der Vakuumpackung lag bei  $4,1 \times 10^5$  KbE/ml. Innerhalb des 10-tägigen Untersuchungszeitraumes wurden bei den *V. parahaemolyticus*-Konzentrationen der MLW und HW geringfügige Schwankungen im Bereich von  $\pm 0,5$  log beobachtet. Nur am dritten Tag lag die Konzentration von *V. parahaemolyticus* mit  $7,0 \times 10^6$  KbE/g in den MLW höher. In den MDD stieg die *V. parahaemolyticus*-Konzentration bis zum dritten Lagerungstag auf  $5,6 \times 10^8$  KbE/g an, im weiteren Verlauf reduzierte sie sich bis zum sechsten Tag auf  $2,8 \times 10^6$  KbE/g. Am siebten Tag wurde ein Peak von  $3,8 \times 10^8$  KbE/g gemessen. Bis zum neunten Tag nahm die *V. parahaemolyticus*-Konzentration auf  $1,5 \times 10^5$  KbE/g ab. Nach der 10-tägigen Lagerung in schmelzendem Eis wurden *V. parahaemolyticus*-Konzentrationen von  $2,1 \times 10^6$  KbE/g in den MDD,  $5,3 \times 10^5$  KbE/g in den MR,  $2,9 \times 10^5$  KbE/ml in den MLW und  $1,3 \times 10^5$  KbE/ml im HW der Vakuumpackung detektiert. Im zweiten Versuchsdurchgang konnten am achten Tag nur vier von fünf Muscheln untersucht werden, da das Muschelfleisch einer Muschel aufgrund von Gewebelyse, aufgelöst war.

### Lagerung bei 3 °C in Jute

Nach dem ersten Tag der Lagerung der *M. edulis* bei 3 °C in Jute (J+3°C) entsprachen die Vibrionen-Konzentrationen in den MDD mit  $1,0 \times 10^7$  KbE/g und MLW mit  $1,5 \times 10^6$  KbE/ml ungefähr den Konzentrationen, die am Tag der Verpackung vorlagen (Abb. 15 B). In den MR wurden nach dem ersten Lagerungstag mit Konzentrationen um  $2,1 \times 10^6$  KbE/g ca. 0,5 log weniger *V. parahaemolyticus* detektiert als zum Zeitpunkt der Verpackung. Im gesamten Studienzeitraum zeigten sich in allen Probensegmenten geringfügige Schwankungen von  $\pm 1$  log um den Bereich der Ausgangskonzentrationen, die unmittelbar nach der 24-stündigen Kontamination vorlagen. In den MDD und MLW wurden am neunten Tag die geringsten Konzentrationen von  $1,2 \times 10^5$  KbE/g in den MDD und  $7,3 \times 10^5$  KbE/g in den MLW detektiert. Nach zehn Tagen wurden in den MDD  $8,8 \times 10^6$  KbE/g, in den MR  $1,3 \times 10^6$  KbE/g und in den MLW  $4,8 \times 10^6$  KbE/ml *V. parahaemolyticus* detektiert.

Die angegebenen Konzentrationen wurden am zweiten Lagerungstag nach Präparation von vier statt fünf Muscheln gemessen, da eine Muschel durch vollständige Lyse des Muschel-Gewebes leer war.

### Lagerung bei 15 °C im Vakuumbbeutel

Die bei 15 °C im Vakuumbbeutel (V+15°C) gelagerten Proben wurden alle zwei Tage untersucht. Während der ersten Untersuchung (zweiter Lagerungstag) konnten in den MDD

$4,1 \times 10^6$  KbE/g *V. parahaemolyticus* detektiert werden (Abb. 15 C). Die Vibrionen-Konzentrationen lagen am zweiten Lagerungstag bei  $1,1 \times 10^6$  KbE/g in den MR und  $1,1 \times 10^6$  KbE/ml im HW. Als die *V. parahaemolyticus*-Konzentrationen in den MDD und MR ab dem zweiten bis hin zum vierten Tag absanken, stieg die Konzentration im HW an. Am vierten und sechsten Probenentnahmetag wurden im HW die höchsten Konzentrationen mit jeweils  $3,9 \times 10^6$  KbE/g detektiert.

Am achten und zehnten Tag bei 15 °C lagen die Konzentrationen in allen Probensegmenten nah beieinander. Am achten Tag wurden *V. parahaemolyticus*-Konzentrationen im Bereich von  $4,3 \times 10^5$  KbE/g (MDD) und  $2,0 \times 10^5$  KbE/g (MR) detektiert. Am zehnten Tag wurde die höchste Konzentrierung im HW mit  $8,0 \times 10^5$  KbE/g gemessen, direkt gefolgt von der Konzentration in den MDD mit  $7,5 \times 10^5$  KbE/g. In den MR lagen zu diesem Zeitpunkt  $5,5 \times 10^5$  KbE/g vor und in den MLW  $4,1 \times 10^5$  KbE/g.

Am letzten Probenentnahmetag standen in beiden Versuchsdurchgängen jeweils nur zwei Muscheln zur Untersuchung zur Verfügung, da das Muschel-Gewebefleisch der anderen drei entweder vollständig lysiert war oder die Muscheln soweit ausgetrocknet waren, dass eine Präparation nicht mehr möglich war. Bereits am achten Tag konnte in einem Versuchsgang nur eine Muschel anstelle von fünf untersucht werden.

### Lagerung bei 15 °C in Jute

Aus den Muscheln, die in Jutesäcken bei 15 °C (J+15°C) gelagert wurden, konnten in den MDD am ersten Probenentnahmetag (zweiter Lagerungstag)  $1,0 \times 10^7$  KbE/g *V. parahaemolyticus* detektiert werden, in den MR  $7,5 \times 10^6$  KbE/g und in den MLW  $4,1 \times 10^6$  KbE/ml (Abb. 15 D). Die Vibrionen-Konzentration in den MLW wurde über den Verlauf von zehn Tagen auf bis zu  $2,0 \times 10^5$  KbE/ml am achten Tag reduziert. Am zehnten Tag konnte weder im ersten noch im zweiten Versuchsdurchgang Muschel-Lumen-Wasser gewonnen werden. Innerhalb der MR konnten nach zehn Tagen mit  $3,2 \times 10^7$  KbE/g höhere *V. parahaemolyticus*-Konzentrationen detektiert werden, als sie in den MDD mit  $2,0 \times 10^6$  KbE/g vorlagen.

Während der Lagerung bei 15 °C unterlagen die Muscheln in den Jutesäcken bereits ab dem vierten Untersuchungstag starken Austrocknungsprozessen. Dadurch konnte am sechsten Probenentnahmetag im ersten Versuchsdurchgang nur eine Muschel präpariert und untersucht werden. Die anderen vier waren soweit ausgetrocknet, dass eine Präparation nicht mehr möglich war. Am zehnten Probenentnahmetag waren im ersten Versuchsdurchgang nur zwei Muscheln untersuchbar. Im zweiten Versuchsdurchgang war am achten Tag die Präparation von zwei Muscheln und am zehnten Tag von nur einer Muschel möglich.

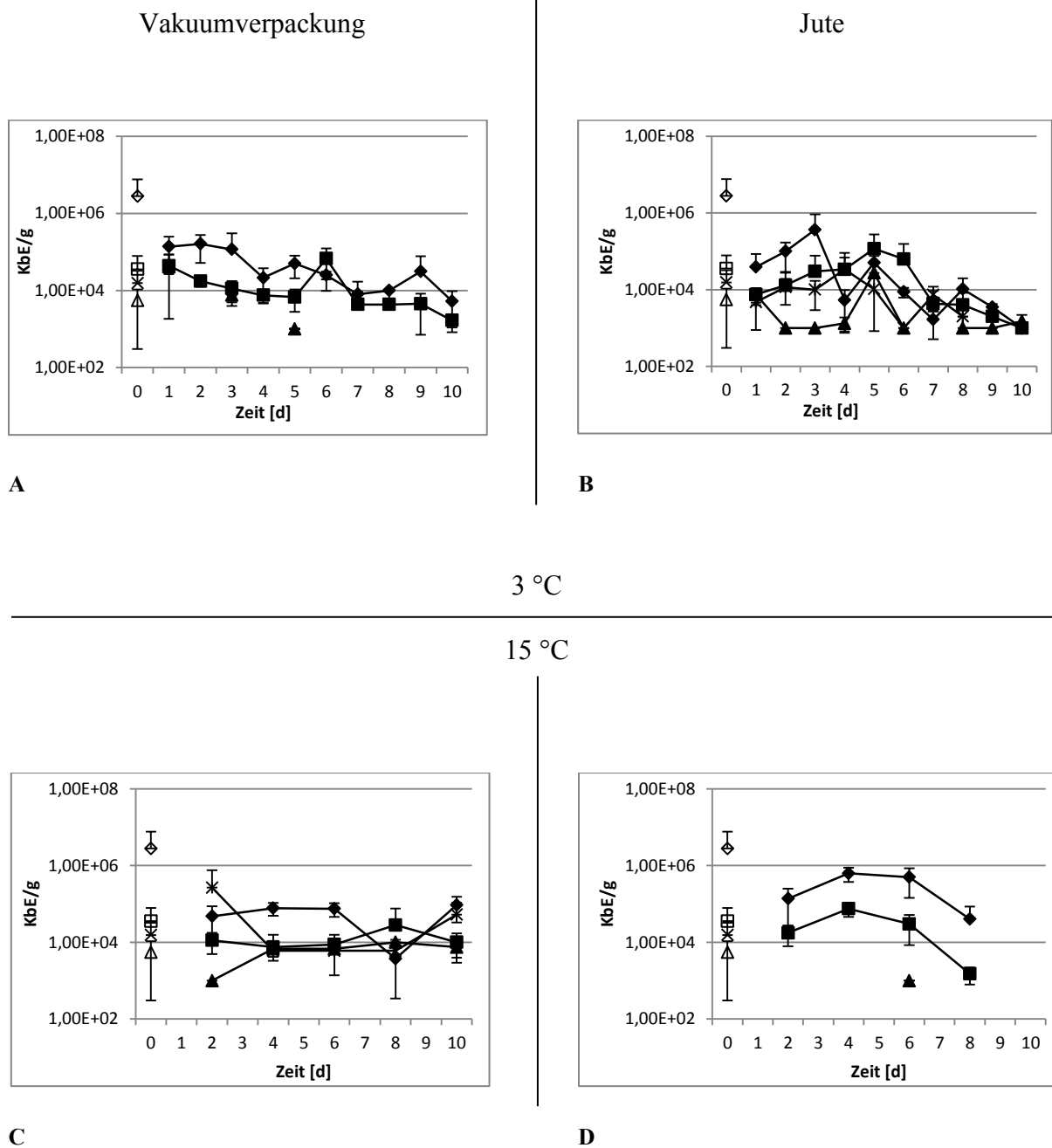
Innerhalb der 10-tägigen Lagerung von Muscheln, die mit *V. parahaemolyticus* kontaminierten waren, wurde unabhängig von Probensegment und Art der Lagerung kaum eine Reduktion der *V. parahaemolyticus*-Konzentration beobachtet.

### **5.2.3.3 Lagerung von *M. edulis* nach Kontamination mit *V. vulnificus***

Für die Lagerung von mit *V. vulnificus* kontaminierten *M. edulis* wurden die Muscheln im ersten Versuchsdurchgang mit einer Kontaminationsdichte von  $4,0 \times 10^{10}$  KbE<sub>(abs.)</sub> *V. vulnificus* kontaminiert, das entsprach im 20 Literbecken einer Dichte von  $2,0 \times 10^6$  KbE/ml. Für den zweiten Versuchsdurchgang betrug die Kontaminationsdichte  $3,5 \times 10^{11}$  KbE<sub>(abs.)</sub> *V. vulnificus*, entsprechend  $1,8 \times 10^7$  KbE/ml.

Nach 24-stündiger Kontamination wurden *V. vulnificus*-Konzentrationen von  $2,8 \times 10^6$  KbE/g in den Mitteldarmdrüsen (MDD),  $3,6 \times 10^4$  KbE/g in den Muschel-Geweberesten (MR) und  $1,6 \times 10^4$  KbE/ml in den Muschel-Lumen-Wässern (MLW) detektiert. Die *V. vulnificus*-Konzentration im Tankwasser des Kontaminationsbeckens (TW-K) betrug nach 24-stündiger Kontamination  $5,5 \times 10^3$  KbE/ml.

Zum Zeitpunkt der Verpackung „Nullter Tag“ (nach 24-stündiger Kontamination) wurden die Muscheln in Vakuumbutel (V) und Jutesäcke (J) verpackt, um dann bei 3 °C in schmelzendem Eis und bei 15 °C im Klimaschrank über zehn Tage gelagert zu werden (Abb. 16 A-D).

*V. vulnificus* in *M. edulis*Abbildung 16 A-D: *V. vulnificus* in *M. edulis* während der Lagerung;

Lagerung Vakuumverpackung 3 °C (I); Lagerung Jute 3 °C (J),  
 Lagerung Vakuumverpackung 15 °C (K), Lagerung Jute 15 °C (Abb. L),  
 Zellzahlen von *V. vulnificus* in verschiedenen Probensegmenten der *M. edulis*

◇ / ◆ MDD: Mitteldarmdrüsen; □ / ■ MR: Muschel-Gewebereste; x / ж MLW: Muschel-Lumen-  
 Wasser; Δ TW-K: Tankwasser Kontaminationsbecken; ▲ HW: Hälterungswasser aus Vakuumver-  
 packung;

Leere Symbole (◇ / □ / x / Δ) zum Zeitpunkt 0, nach 24-stündiger Kontamination  
 Gefüllte Symbole (◆ / ■ / ж / ▲) während der 10-tägigen Lagerung

**Lagerung bei 3 °C in Vakuumverpackung**

Nach dem ersten Tag der Lagerung der *M. edulis* in Vakuumbuteln bei 3 °C (V+3°C) konnte in den MDD die höchste *V. vulnificus*-Konzentration mit  $3,9 \times 10^4$  KbE/g verglichen mit den anderen Probensegmenten nachgewiesen werden (Abb. 16 A). In den MR wurden  $7,5 \times 10^3$  KbE/g *V. vulnificus* und in den MLW  $4,8 \times 10^3$  KbE/ml detektiert. Am dritten Lagerungstag wurde die höchste *V. vulnificus*-Konzentration (für den gesamten Studienzeitraum) in den MDD mit  $3,7 \times 10^5$  KbE/g detektiert. Am zehnten Tag lag die geringste *V. vulnificus*-Konzentration in den MDD mit  $1,0 \times 10^3$  KbE/g vor. Die Konzentration von *V. vulnificus* in den MR lag im Zeitraum vierter bis sechster Lagerungstag über den Konzentrationen, die in den MDD detektiert wurden. Am fünften Tag wurde in den MR die höchste Konzentration an *V. vulnificus* mit  $1,2 \times 10^5$  KbE/g detektiert. Am zehnten Tag wurde in den MR wie in den MDD die geringste *V. vulnificus*-Konzentration mit  $1,0 \times 10^3$  KbE/g detektiert. In den MLW wurde bis zum vierten Lagerungstag ein Anstieg der *V. vulnificus*-Konzentration bis auf  $3,4 \times 10^4$  KbE/ml detektiert. Am neunten Tag konnte zwar Muschel-Lumen-Wasser gewonnen, jedoch keine *V. vulnificus* detektiert werden. Am zehnten Lagerungstag lagen in den MLW  $1,0 \times 10^3$  KbE/ml *V. vulnificus* vor. Im ASW der Vakuumverpackung (HW) wurden nach dem ersten Tag der Lagerung mit  $7,5 \times 10^3$  KbE/ml ungefähr gleich viele *V. vulnificus* detektiert wie zum Verpackungszeitpunkt. Am fünften Lagerungstag, an dem die höchste Konzentration in den MR detektiert wurde, konnte auch im HW die höchste Konzentration mit  $2,8 \times 10^4$  KbE/ml im Laufe der zehn Tage detektiert werden. Am siebten Tag wurden im HW keine *V. vulnificus* nachgewiesen. Am letzten Studientag (zehnter Lagerungstag) lagen *V. vulnificus*-Konzentrationen von  $1,5 \times 10^3$  KbE/ml im HW vor. In den Vakuumverpackungen wurde während der Kühlung bei 3 °C eine langsame Reduktion der *V. vulnificus*-Konzentration detektiert.

**Lagerung bei 3 °C in Jute**

Nach dem ersten Tag der Lagerung in Jute bei 3 °C (J+3°C), lagen die *V. vulnificus*-Konzentrationen in den MDD der *M. edulis* bei  $1,4 \times 10^5$  KbE/g, in den MR bei  $4,4 \times 10^4$  KbE/g und in den MLW bei  $4,1 \times 10^4$  KbE/ml (Abb. 16 B). Über den gesamten Studienzeitraum von zehn Lagerungstagen waren die Konzentrationen in den MDD höher als in den MR. Eine Ausnahme bildete hierbei die Konzentration vom sechsten Lagerungstag. An diesem Tag wurde mit  $6,7 \times 10^4$  KbE/g eine höhere Konzentration in den MR detektiert als in den MDD mit  $2,5 \times 10^4$  KbE/g. Die höchste *V. vulnificus*-Konzentration in den MDD wurde am zweiten Lagerungstag mit  $1,6 \times 10^5$  KbE/g gemessen, diese Konzentration reduzierte sich bis zum zehnten Lagerungstag auf  $5,3 \times 10^3$  KbE/g. Muschel-Lumen-Wasser konnte am ersten Lagerungstag in beiden Versuchsdurchgängen aufgefangen werden, am zweiten und dritten Lagerungstag gelang dies nur im ersten Versuchsdurchgang. Dabei wurde am dritten Tag *V. vulnificus* mit  $7,5 \times 10^3$  KbE/ml detektiert. Am fünften Lagerungstag konnte nur im zweiten Versuchsdurchgang MLW gewonnen und *V. vulnificus* in der Höhe von  $1,0 \times 10^3$  KbE/ml de-

tektiert werden. Am sechsten und achten Tag waren nur geringe Mengen von 0,16 ml bis 0,34 ml MLW vorhanden, wobei an keinem der beiden Tage *V. vulnificus* nachgewiesen wurde.

### Lagerung bei 15 °C in Vakuumverpackung

Während der Lagerung von *M. edulis*, die mit *V. vulnificus* kontaminiert waren, bei 15 °C in Vakuumbuteln (V+15°C), wurden nach zwei Tagen der Lagerung in den MDD  $4,8 \times 10^4$  KbE/g, in den MR  $1,1 \times 10^4$  KbE/g und in den MLW  $1,0 \times 10^3$  KbE/ml *V. vulnificus* detektiert (Abb. 16 C). Die *V. vulnificus*-Konzentration befand sich über den gesamten Lagerungszeitraum in den MDD im Bereich von  $10^4$  KbE/g bis  $10^5$  KbE/g. Am achten Tag wurde die geringste Konzentration in den MDD mit  $3,8 \times 10^3$  KbE/g nachgewiesen. Dagegen wurde am zehnten Tag mit  $9,3 \times 10^4$  KbE/g die höchste *V. vulnificus*-Konzentration gemessen. Die *V. vulnificus*-Konzentrationen in den MR lagen konstant im Bereich von  $7,5 \times 10^3$  KbE/g bis  $1,1 \times 10^4$  KbE/g. Eine Ausnahme stellte der Messwert vom achten Tag dar, hier wurde in den MR mit  $2,8 \times 10^4$  KbE/g eine höhere *V. vulnificus*-Konzentration detektiert, als sie in den MDD mit  $3,8 \times 10^3$  KbE/g vorlag. In den MLW wurde am zweiten Tag mit  $2,7 \times 10^5$  KbE/ml die größte Konzentration an *V. vulnificus* detektiert. An den Tagen vier, sechs und acht blieben die Konzentrationen in den MLW mit  $6,0 \times 10^3$  KbE/ml konstant. Am zehnten Lagerungstag wurde in den MLW mit  $5,3 \times 10^4$  KbE/ml die an diesem Tag zweithöchste *V. vulnificus*-Konzentration detektiert. Im HW der Vakuumverpackung wurde vom zweiten Lagerungstag mit  $1,0 \times 10^3$  KbE/ml bis zum achten Lagerungstag mit  $1,0 \times 10^4$  KbE/ml ein stetiger Anstieg in der *V. vulnificus*-Konzentration gemessen. Am zehnten Tag wurden  $7,5 \times 10^3$  KbE/ml *V. vulnificus* im HW detektiert.

### Lagerung bei 15 °C in Jute

Die *V. vulnificus*-Konzentrationen in den MDD und in den MR der Muscheln, die in Jutesäcken bei 15 °C (J+15°C) gelagert wurden, nahm in beiden Probensegmenten den gleichen Verlauf. Dabei wurden in den MDD durchgehend mindestens 1 log-Stufe mehr *V. vulnificus* detektiert (Abb. 16 D). Am ersten Probenentnahmetag (zweiter Lagerungstag) lag die *V. vulnificus*-Konzentration in den MDD bei  $1,4 \times 10^5$  KbE/g. Am vierten und sechsten Lagerungstag wurden die höchsten Konzentrationen mit  $6,3 \times 10^5$  KbE/g am vierten Tag und mit  $5,0 \times 10^5$  KbE/g am sechsten Tag detektiert. Die geringste *V. vulnificus*-Konzentration in den MDD wurde am achten Lagerungstag mit  $4,0 \times 10^4$  KbE/g gemessen. In den MR lag am zweiten Lagerungstag eine *V. vulnificus*-Konzentration von  $1,8 \times 10^4$  KbE/g vor. Am vierten Lagerungstag wurde ein Anstieg auf  $7,5 \times 10^4$  KbE/g detektiert. Bis zum achten Lagerungstag fand eine Reduktion der *V. vulnificus*-Konzentration bis auf  $1,5 \times 10^3$  KbE/g statt. In den MLW konnte *V. vulnificus* nur am sechsten Lagerungstag mit  $1,0 \times 10^3$  KbE/ml detektiert werden. Bereits ab dem achten Lagerungstag waren bei dieser Lagervariante in beiden Versuchsdurchgängen nicht mehr alle fünf Muscheln präparierbar. Vier Muscheln konnten im

ersten Durchgang und drei Muscheln im zweiten Durchgang untersucht werden. Am zehnten Lagerungstag war die Präparation der Muscheln in nur einem Versuchsdurchgang möglich, da die Muscheln im anderen Versuchsdurchgang weitestgehend ausgetrocknet waren. In den fünf präparierbaren Muscheln wurden am letzten Studientag keine *V. vulnificus* detektiert.

#### **5.2.3.4 Vergleich der *Vibrio* spp.-Konzentrationen in den MDD von *M. edulis* während der Lagerung**

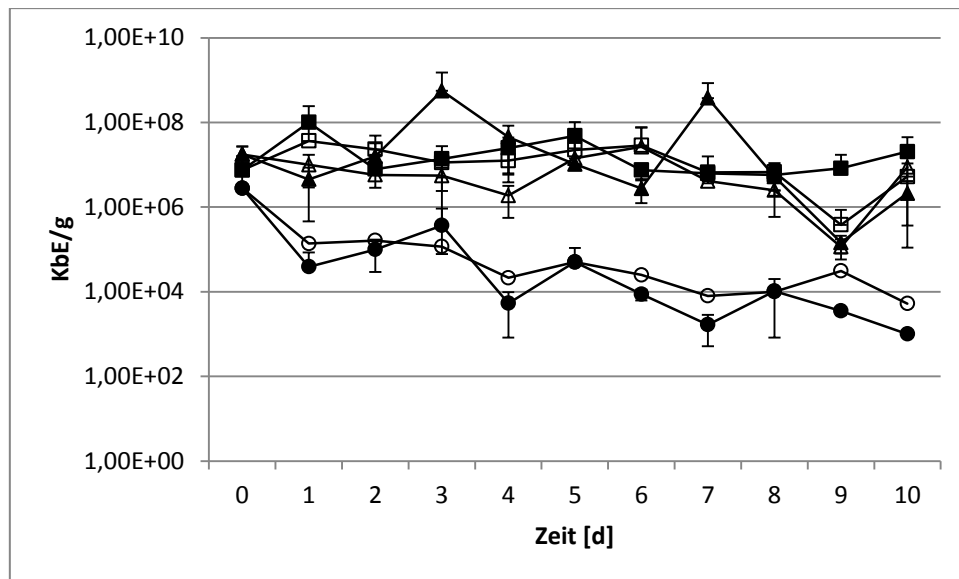
Die Konzentrationen der verschiedenen *Vibrio* spp. in den MDD der *M. edulis* nahmen, über den Studienzeitraum von zehn Tagen, in den verschiedenen Verpackungen einen geringfügig unterschiedlichen Verlauf (Abb. 17 A-B). Die Konzentrationen der Kontaminationssuspensionen lagen für *V. cholerae* bei  $4,8 \times 10^{10}$  KbE<sub>(abs.)</sub> und bei  $4,0 \times 10^{11}$  KbE<sub>(abs.)</sub>, für *V. parahaemolyticus* bei  $4,2 \times 10^{12}$  KbE<sub>(abs.)</sub> und bei  $4,0 \times 10^{12}$  KbE<sub>(abs.)</sub> sowie für *V. vulnificus* bei  $4,0 \times 10^{10}$  KbE<sub>(abs.)</sub> und bei  $3,5 \times 10^{11}$  KbE<sub>(abs.)</sub>. Das entsprach in den einzelnen Versuchsdurchgängen Kontaminations-Dosen von  $2,0 \times 10^6$  KbE/ml bis  $1,2 \times 10^8$  KbE/ml im 20 Literbecken. Nach 24-stündiger Kontamination wurden für *V. parahaemolyticus*  $1,8 \times 10^7$  KbE/g, für *V. cholerae*  $7,5 \times 10^6$  KbE/g und für *V. vulnificus*  $2,8 \times 10^6$  KbE/g detektiert.

Die Konzentrationen von *V. parahaemolyticus* und *V. cholerae* zeigten über zehn Tage hinweg einen ähnlichen Verlauf. Eine Absenkung der Vibrionen-Konzentrationen in den MDD während der Lagerung in Vakuumverpackungen bei 3 °C (V+3°C) bzw. 15 °C (V+15°C) und in Jute bei 3 °C (J+3°C) bzw. 15 °C (J+15°C) wurde nicht beobachtet.

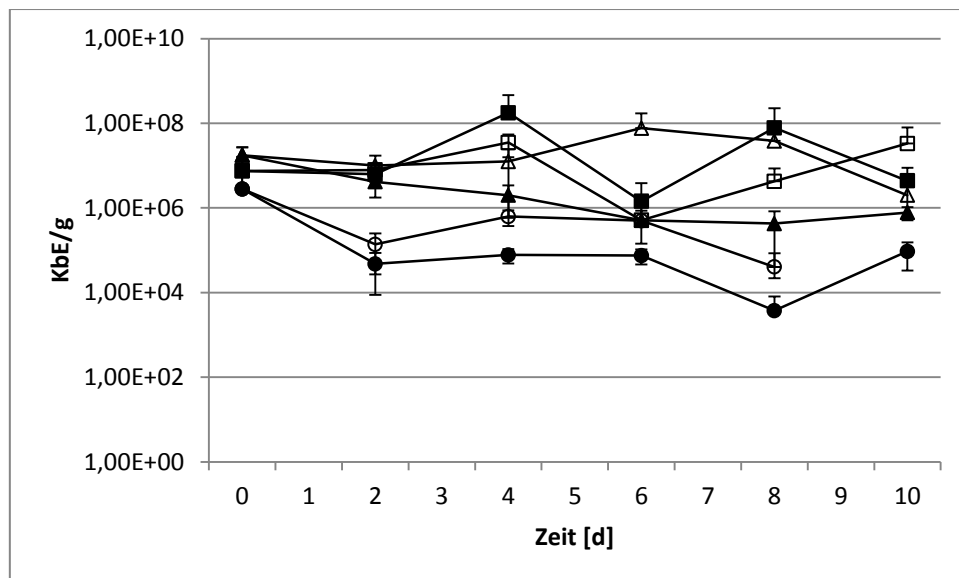
Nach zehn Lagerungstagen wurden für *V. parahaemolyticus* noch folgende Konzentrationen in den MDD der *M. edulis* detektiert: in den Vakuumverpackungen bei 3 °C  $2,1 \times 10^6$  KbE/g; in Jute bei 3 °C  $8,8 \times 10^6$  KbE/g; in den Vakuumverpackungen bei 15 °C  $7,8 \times 10^5$  KbE/g und in Jute bei 15 °C  $2,0 \times 10^6$  KbE/g. Für *V. cholerae* wurden am zehnten Lagerungstag folgende Konzentrationen in den MDD der *M. edulis* detektiert: in den Vakuumverpackungen bei 3 °C  $2,0 \times 10^7$  KbE/g; in Jute bei 3 °C  $5,3 \times 10^6$  KbE/g; in den Vakuumverpackungen bei 15 °C  $4,4 \times 10^6$  KbE/g und in Jute bei 15 °C  $3,3 \times 10^7$  KbE/g. Die Konzentrationen von *V. cholerae* und *V. parahaemolyticus* in den MDD von *M. edulis* waren demnach über den gesamten Lagerungszeitraum mit  $5,0 \times 10^6$  KbE/g  $\pm 1,5$  log konstant.

Für *V. vulnificus* zeigte sich in dem 10-tägigen Zeitraum eine langsame Konzentrationsabnahme in den MDD, wobei am zehnten Tag noch folgende Konzentrationen detektiert wurden: in den Vakuumverpackungen bei 3 °C  $1,0 \times 10^3$  KbE/g; in Jute bei 3 °C  $5,3 \times 10^3$  KbE/g; in den Vakuumverpackungen bei 15 °C  $9,3 \times 10^4$  KbE/g. In Jute bei 15 °C wurde am achten Tag letztmalig *V. vulnificus* in einer Dichte von  $4,0 \times 10^4$  KbE/g nachgewiesen.





A



B

Abbildung 17 A-B: *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* und *V. vulnificus* in MDD von *M. edulis* während der Lagerung;

Lagerung Vakuumpackung und Jute 3 °C (A);

Lagerung Vakuumpackung und Jute 15 °C (B);

Vergleich der Zellzahlen von *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* und *V. vulnificus* nach 24-stündiger Kontamination in Mitteldarmdrüsen der *M. edulis* während der 10-tägigen Lagerung.

MDD: Mitteldarmdrüsen

□ / ■ *V. cholerae*; Δ / ▲ *V. parahaemolyticus*; ○ / ● *V. vulnificus*

Leere Symbole (□ / Δ / ○): Juteverpackung

Gefüllte Symbole (■ / ▲ / ●): Vakuumpackung

### 5.2.3.5 Vergleich der *Vibrio* spp.-Konzentrationen vor, während und nach der Lagerung

Durch das Zusammenrechnen der einzelnen *Vibrio* sp.-Konzentrationen aus den verschiedenen Muschel-Probensegmenten konnten die Gesamt-Vibrionen-Konzentrationen der einzelnen Tage miteinander verglichen werden (Tab. 23).

Bei der Lagerung mit *V. parahaemolyticus* lagen nach 24-stündiger Kontamination ca.  $3,3 \times 10^7$  KbE/g *Vibrio* spp. in den Muscheln vor. Am zehnten Tag der Lagerung wurden in den Muscheln aus der Vakuumverpackung, die bei 3 °C gelagert wurden  $3,1 \times 10^6$  KbE/g detektiert. In den *M. edulis* aus der Juteverpackung, die ebenfalls bei 3 °C gelagert wurden, konnten zu diesem Zeitpunkt  $1,5 \times 10^7$  KbE/g *V. parahaemolyticus* nachgewiesen werden. In den Muscheln aus der Vakuumverpackung, die bei 15 °C im Klimaschrank gelagert wurden, konnten am zehnten Tag  $2,5 \times 10^6$  KbE/g detektiert werden, in denen aus der Juteverpackung  $3,4 \times 10^7$  KbE/g. Die höchste *V. parahaemolyticus*-Konzentration wurde am siebten Tag mit  $3,8 \times 10^8$  KbE/g in den Muscheln aus der Vakuumverpackung bei 3 °C detektiert.

Nach Kontamination mit *V. cholerae* wurden in die Verpackungen (Vakuum und Jute) *M. edulis* mit  $3,7 \times 10^7$  KbE/g *V. cholerae* eingebracht. In den Muscheln der Vakuumverpackung bei 3 °C wurden nach 10-tägiger Lagerung  $2,5 \times 10^7$  KbE/g detektiert, in denen der Juteverpackung waren es  $6,9 \times 10^6$  KbE/g. Im Klimaschrank bei 15 °C wurden zu diesem Zeitpunkt in den Muscheln der Vakuumverpackung  $7,4 \times 10^6$  KbE/g detektiert, in denen der Juteverpackung bis zu  $4,7 \times 10^7$  KbE/g. Die höchste Konzentration an *V. cholerae* wurde mit  $1,8 \times 10^8$  KbE/g in den *M. edulis* aus der Vakuumverpackung bei 15 °C am sechsten Tag detektiert.

Die Lagerung der *M. edulis* nach Kontamination mit *V. vulnificus* begann mit ca.  $2,8 \times 10^6$  KbE/g. Am Ende der Lagerung wurden in den Muscheln aus der Vakuumverpackung bis zu  $4,5 \times 10^3$  KbE/g detektiert, in denen der Juteverpackung ca.  $6,9 \times 10^3$  KbE/g.

Während in den *M. edulis* aus der Vakuumverpackung bei 15 °C bis zu  $1,6 \times 10^3$  KbE/g nachgewiesen wurden, lag in denen der Juteverpackung an diesem Tag die *V. vulnificus*-Konzentration unter  $10^3$  KbE/g. Am achten Tag lagen hier ca.  $4,2 \times 10^4$  KbE/g *V. vulnificus* vor.

Für die Konzentrationen von *V. parahaemolyticus* und *V. cholerae* wurden keine Konzentrationsveränderungen detektiert. Dahingegen wurde eine Reduktion von *V. vulnificus* in den *M. edulis* beobachtet.

Innerhalb der Lagerungsversuche waren sensorische Veränderungen in Geruch und Beschaffenheit der Miesmuscheln wahrnehmbar. Diese Veränderungen waren durch das Absterben der Muscheln ab dem vierten Lagerungstag bei 15 °C Lagertemperatur bedingt.

**Tabelle 23: Vibrionen-Konzentration pro Tag unterteilt nach *Vibrio* spp. und Lagertechnik**

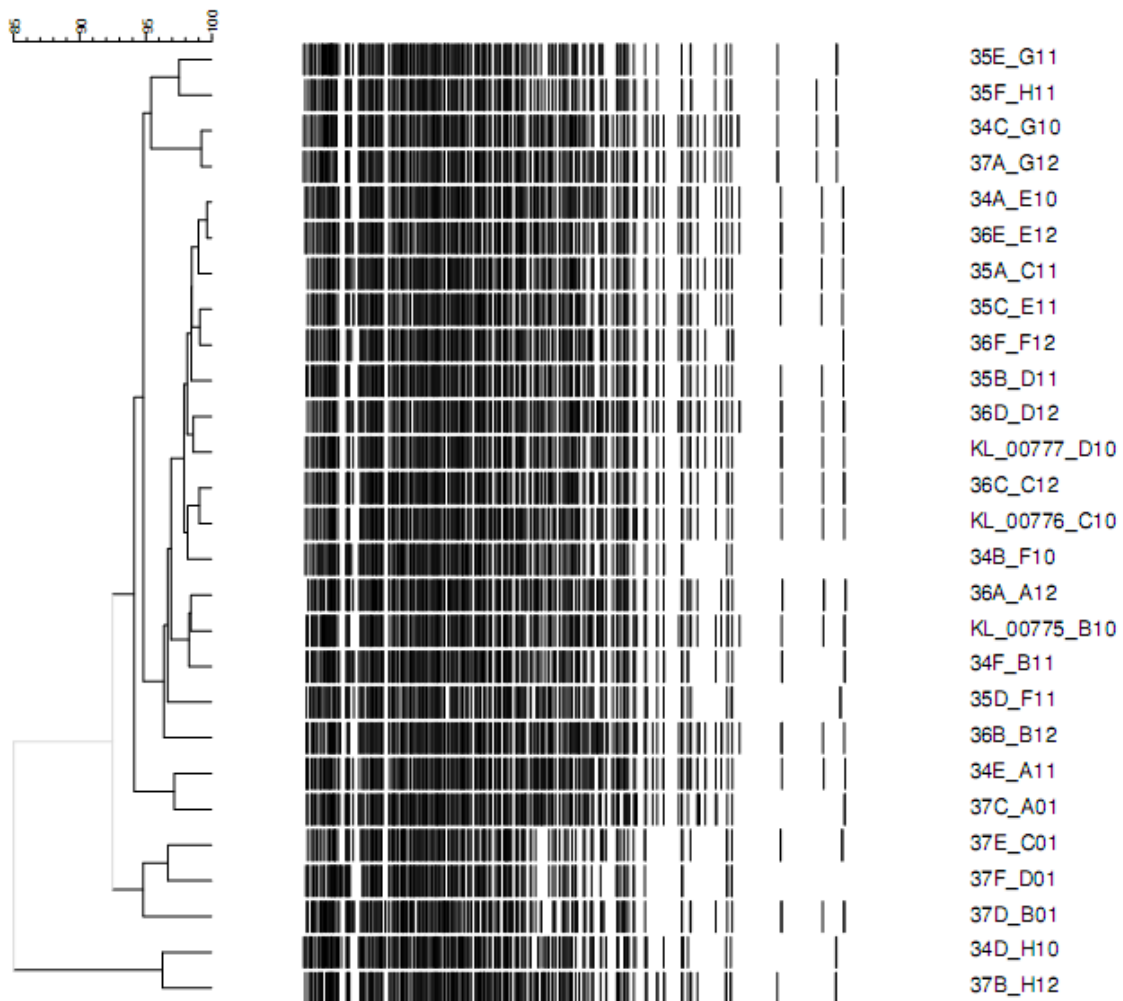
Dargestellt sind die summierten Zellzahlen der jeweiligen *Vibrio* sp. aus den Probensegmenten einer Lagertechnik für die einzelnen Tage der 10-tägigen Lagerung. Beispielsweise wurden die Zellzahlen von *V. parahaemolyticus* aus der Vakuumverpackung gelagert bei 3 °C (V+3°C) aus den einzelnen Probensegmenten (MDD, MR, MLW und TW-K) eines Tages summiert.

Summe KbE am Tag	<i>V. parahaemolyticus</i>				<i>V. cholerae</i>				<i>V. vulnificus</i>			
	V+3°C	J+3°C	V+15°C	J+15°C	V+3°C	J+3°C	V+15°C	J+15°C	V+3°C	J+3°C	V+15°C	J+15°C
<b>0d</b>	3,3x10 <sup>7</sup>	3,3x10 <sup>7</sup>	3,3x10 <sup>7</sup>	3,3x10 <sup>7</sup>	3,7x10 <sup>7</sup>	3,7x10 <sup>7</sup>	3,7x10 <sup>7</sup>	3,7x10 <sup>7</sup>	2,8x10 <sup>6</sup>	2,8x10 <sup>6</sup>	2,8x10 <sup>6</sup>	2,8x10 <sup>6</sup>
<b>1d</b>	9,5x10 <sup>6</sup>	1,4x10 <sup>7</sup>			1,1x10 <sup>8</sup>	4,2x10 <sup>7</sup>			5,9x10 <sup>4</sup>	2,2x10 <sup>5</sup>		
<b>2d</b>	2,3x10 <sup>7</sup>	4,0x10 <sup>7</sup>	6,5x10 <sup>6</sup>	2,2x10 <sup>7</sup>	1,3x10 <sup>7</sup>	3,0x10 <sup>7</sup>	1,1x10 <sup>7</sup>	8,9x10 <sup>6</sup>	1,3x10 <sup>5</sup>	1,8x10 <sup>5</sup>	3,3x10 <sup>5</sup>	1,6x10 <sup>5</sup>
<b>3d</b>	5,7x10 <sup>8</sup>	9,7x10 <sup>6</sup>			1,9x10 <sup>7</sup>	1,9x10 <sup>7</sup>			4,1x10 <sup>5</sup>	1,4x10 <sup>5</sup>		
<b>4d</b>	4,8x10 <sup>7</sup>	9,9x10 <sup>6</sup>	8,8x10 <sup>6</sup>	4,7x10 <sup>7</sup>	2,7x10 <sup>7</sup>	1,6x10 <sup>7</sup>	1,8x10 <sup>8</sup>	4,7x10 <sup>7</sup>	7,4x10 <sup>4</sup>	2,9x10 <sup>4</sup>	9,8x10 <sup>4</sup>	7,0x10 <sup>5</sup>
<b>5d</b>	1,3x10 <sup>7</sup>	5,7x10 <sup>7</sup>			5,3x10 <sup>7</sup>	3,2x10 <sup>7</sup>			2,1x10 <sup>5</sup>	5,8x10 <sup>4</sup>		
<b>6d</b>	1,1x10 <sup>7</sup>	3,6x10 <sup>7</sup>	4,6x10 <sup>6</sup>	1,1x10 <sup>8</sup>	9,1x10 <sup>6</sup>	3,8x10 <sup>7</sup>	2,2x10 <sup>6</sup>	2,0x10 <sup>6</sup>	7,4x10 <sup>4</sup>	9,2x10 <sup>4</sup>	9,7x10 <sup>4</sup>	5,3x10 <sup>5</sup>
<b>7d</b>	3,8x10 <sup>8</sup>	9,9x10 <sup>6</sup>			7,6x10 <sup>6</sup>	9,8x10 <sup>6</sup>			1,3x10 <sup>4</sup>	1,2x10 <sup>4</sup>		
<b>8d</b>	1,2x10 <sup>7</sup>	4,6x10 <sup>7</sup>	1,4x10 <sup>6</sup>	1,5x10 <sup>8</sup>	7,2x10 <sup>6</sup>	8,6x10 <sup>6</sup>	8,1x10 <sup>7</sup>	1,1x10 <sup>7</sup>	1,7x10 <sup>4</sup>	1,4x10 <sup>4</sup>	4,8x10 <sup>4</sup>	4,2x10 <sup>4</sup>
<b>9d</b>	2,0x10 <sup>6</sup>	4,6x10 <sup>6</sup>			9,3x10 <sup>6</sup>	2,7x10 <sup>6</sup>			6,5x10 <sup>3</sup>	3,6x10 <sup>4</sup>		
<b>10d</b>	3,0x10 <sup>6</sup>	1,5x10 <sup>7</sup>	2,5x10 <sup>6</sup>	3,4x10 <sup>7</sup>	2,5x10 <sup>7</sup>	6,9x10 <sup>6</sup>	7,4x10 <sup>6</sup>	4,7x10 <sup>7</sup>	4,5x10 <sup>3</sup>	6,9x10 <sup>3</sup>	1,6x10 <sup>5</sup>	< 10 <sup>3</sup>

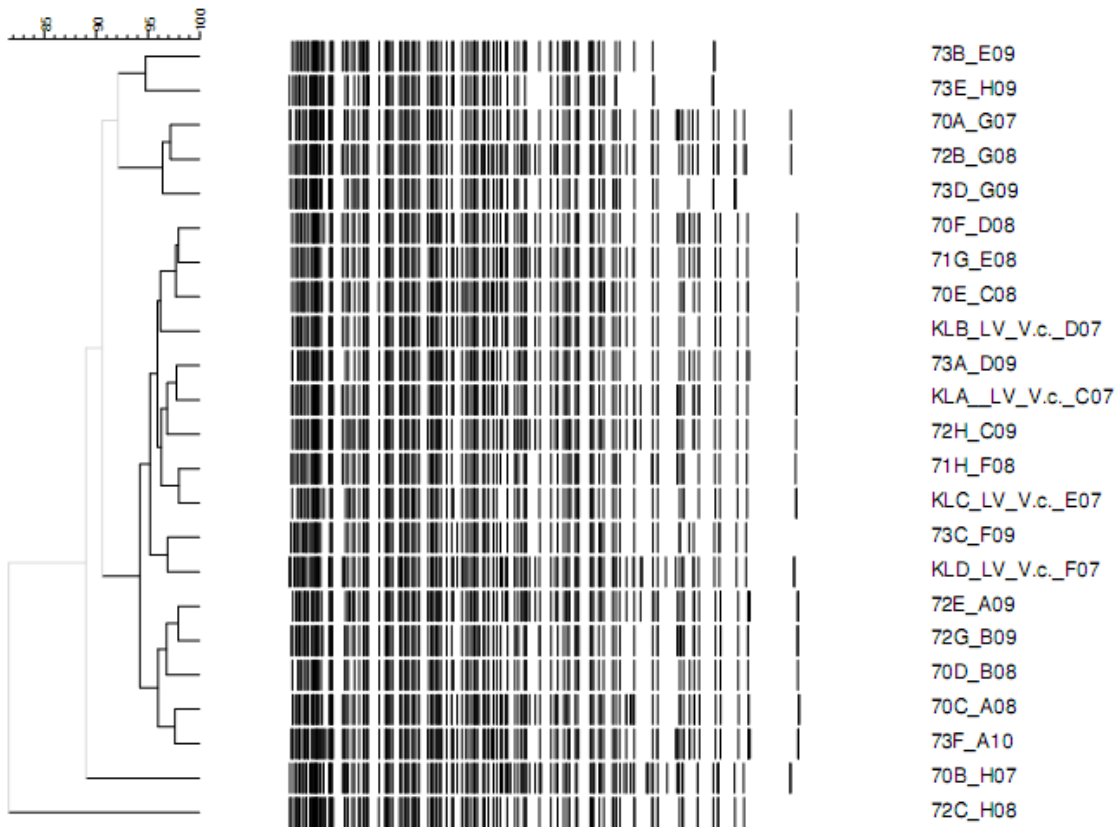
d: Tag; V+3°C: Vakuumverpackung 3 °C; J+3°C: Juteverpackung 3 °C; V+15°C Vakuumverpackung 15 °C; J+15°C: Juteverpackung 15 °C

### 5.3 Genotypisierung

Mittels fAFLP wurde überprüft, ob die nach 10-tägiger Lagerung aus den Miesmuscheln isolierten *Vibrio* spp.-Kolonien Klone der Kontaminationsstämme waren (Abb. 18 und 19). Ausgewählte Isolate wurden hinsichtlich eventuell auftretender genomischer Veränderungen untersucht.



**Abbildung 18: fAFLP von *V. parahaemolyticus*-Klonen**  
Unterschieden wurde zwischen *V. parahaemolyticus*-Klonen aus der Kontaminationslösung, vor Beginn der Lagerung (KL\_) und Klonen nach 10-tägiger Lagerung (Nr.: 34-37) aus allen Lagertechniken.



**Abbildung 19: fAFLP von *V. cholerae*-Klonen**

Unterschieden wurde zwischen *V. cholerae*-Klonen aus der Kontaminationslösung, vor Beginn der Lagerung (KL\_) und Klonen nach 10-tägiger Lagerung (Nr.: 70-73) aus allen Lagertechniken.

Die fAFLP-Ergebnisse ausgewählter Isolate vor und nach 10-tägiger Lagerung zeigten keine Unterschiede zwischen *V. parahaemolyticus*-Klonen (Abb. 18) bzw. zwischen *V. cholerae*-Klonen (Abb. 19).

#### 5.4 Vorhandene Begleitflora

Die mikrobiologische Analyse der Muschel-Gewebereste (MR) zeigte in allen getesteten Proben mesophile aerobe Gesamtkeimzahlen von  $>10^2$  KbE/g. Vor der Kontamination mit den einzelnen *Vibrio* sp. lag die mesophile aerobe Gesamtkeimzahl zwischen  $1,6 \times 10^3$  KbE/g und  $4,7 \times 10^5$  KbE/g. *Pseudomonas* spp., *Aeromonas* spp., *Enterobacteriaceae*, Coliforme Bakterien und *E. coli* (fluoreszenzoptisches Verfahren) wurden nicht detektiert.

In zwei Proben wurde in den Muschel-Geweberest-Proben (MR) und den dazugehörigen Mitteldarmdrüsen (MDD) eine natürliche Kontamination mit *V. vulnificus* nachgewiesen. In zwei anderen Proben konnte *V. alginolyticus* detektiert werden.

## 6 Diskussion

Vibrionen werden häufig in Fischen und Meeresfrüchten nachgewiesen. In Deutschland können bis zu 75 % der untersuchten Muscheln mit *Vibrio* spp. belastet sein. Weltweit kam es in vielen Ländern wie Japan, den Vereinigten Staaten, Mexiko, Vietnam, Thailand, Indonesien und Chile über den Verzehr Vibrionen-belasteter Meerestiere bereits zu schwerwiegenden Infektionen (Lesmana *et al.*, 2002; Morris, 2003; McLaughlin *et al.*, 2005; Cabanillas-Beltran *et al.*, 2006; Cabello *et al.*, 2007; Su und Liu, 2007; Chitov *et al.*, 2009; Nguyen *et al.*, 2009; Hara-Kudo *et al.*, 2012).

Die Miesmuschel, die in Deutschland häufig verzehrt wird, filtert ca. 1,5 Liter Meerwasser pro Stunde, wodurch sich Mikroorganismen in den Muscheln anreichern können.

Da auch Vibrionen in den Muscheln akkumulieren, wurde in dieser Arbeit eine vergleichende Studie zur Anreicherung, Lokalisation und Persistenz von drei potentiell humanpathogenen *Vibrio* spp. (*V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*) in Miesmuscheln durchgeführt. In Kontaminationsversuchen wurde die Anreicherung der Vibrionen in unterschiedlichen Muschelkompartimenten untersucht. In anschließenden Hälterungsversuchen wurde die Klärungskinetik der Muscheln von *Vibrio* spp. ermittelt. Weiterhin wurden Lagerungsversuche mit mit *Vibrio* spp. kontaminierten Miesmuscheln durchgeführt, um die Persistenz von Vibrionen unter den üblichen Lagerungsbedingungen zu untersuchen.

### 6.1 Kontaminationsversuche

Für die Kontaminationsversuche wurden Miesmuscheln über einen Zeitraum von 24 Stunden kontaminiert. Während der Kontamination erfolgte bereits nach 1,5 Stunden die erste Probenentnahme.

Die Ergebnisse aus den Kontaminationsversuchen zeigten insbesondere in den Mitteldarmdrüsen eine schnelle Anreicherung von Vibrionen. Nach 1,5 Stunden waren die Vibrionen-Konzentrationen innerhalb der Mitteldarmdrüsen bereits ca. 2 log höher als die Ausgangskonzentrationen im Tank-Wasser. Dabei wurde für *V. cholerae* eine Konzentration von  $5,0 \times 10^8$  KbE/g, für *V. parahaemolyticus* von  $6,0 \times 10^9$  KbE/g und für *V. vulnificus* von  $3,9 \times 10^8$  KbE/g detektiert. Diese Ergebnisse korrelieren mit den Daten von Lopez-Joven *et al.* (2011), die zeigten, dass *V. parahaemolyticus* in nur zwei Stunden in das Gewebe von Muscheln (*Ruditapes* spp.) in Konzentrationen von  $2,6 \times 10^5$  KbE/g in *Ruditapes (R.) decussatus* und  $6,4 \times 10^1$  KbE/g in *R. philipinarum* aufgenommen wurde. Allerdings detektierten sie die höchste *V. parahaemolyticus*-Konzentration in *R. decussatus* erst nach 12 Stunden und in *R. philipinarum* nach 24 Stunden. Marino *et al.* (2005) beobachteten bereits nach einer Stunde eine Anreicherung von *V. cholerae* O1 in *M. galloprovincialis* mit Konzentrationen von  $>10^6$  KbE/g. Murphree und Tamplin (1995) beobachteten innerhalb von einer Stunde eine Akkumulation von *V. cholerae* O1 in Austern bis auf  $>10^3$  KbE/g und verzeichneten einen

Anstieg bis auf  $>10^5$  KbE/g nach 6 Stunden. Schnelle Aufnahmen von Bakterien durch Muscheln sind auch für *Salmonella*, *E. coli* und *En. durans* beschrieben (Marino *et al.*, 2005; Morrison *et al.*, 2011).

Anhand der Daten aus diesen Studien kann geschlossen werden, dass Muscheln durch Filtration in der Lage sind, Bakterien schnell aus dem Meerwasser aufzunehmen. Die schnelle Akkumulation von *Vibrio* spp. im Miesmuschel-Gewebe erklärt sich durch die Filterfunktion von ca. 1,5 l/h pro Miesmuschel und die anschließende Rückhaltung von Bakterien oder Partikeln. Die hier vorgestellten Daten zeigen, dass *Vibrio* spp. nach dem Transfer von den Kiemen, die im Probensegment Muschel-Rest enthalten waren, in den Verdauungsorganen detektierbar sind. Dort werden sie vor allem in den Mitteldarmdrüsen akkumuliert. Wang *et al.* (2010) zeigten das gleiche Phänomen für Verdauungsdrüsen und Kiemen in Austern.

Im Probensegment Muschel-Reste wurden für *V. cholerae* und *V. parahaemolyticus* erst nach 6-stündiger Kontamination die höchsten Vibrionen-Konzentrationen mit  $2,8 \times 10^8$  KbE/g für *V. cholerae* und  $3,1 \times 10^8$  KbE/g für *V. parahaemolyticus* detektiert. Im Versuch mit *V. cholerae* lag die Konzentration in den Muschel-Resten zu diesem Zeitpunkt sogar über der Konzentration, die in den MDD detektiert wurde. Im Gegensatz dazu wurde die höchste *V. vulnificus*-Konzentration mit  $3,9 \times 10^6$  KbE/g in den Muschel-Resten bereits nach drei Stunden detektiert, bevor ein generelles Absinken der *V. vulnificus*-Konzentration in allen Probensegmenten beobachtet wurde. Diese Konzentrations-Abnahme von *V. vulnificus* könnte darin begründet liegen, dass der eingesetzte *V. vulnificus*-Stamm ein klinisches Patientenisolat war, wohingegen die verwendeten *V. cholerae*- und *V. parahaemolyticus*-Stämme aus Miesmuscheln stammen. Die unterschiedliche Herkunft der Miesmuscheln (Hängekultur gegenüber Bodenmuschelfeldern) oder das Vorhandensein einer antimikrobiellen Aktivität von *M. edulis* wären weitere Möglichkeiten. Hubert *et al.* (1996) und Defer *et al.* (2009) beschrieben, dass *Mytilus* spp. keine Anti-*Vibrio*-Aktivität zeigen. In ihren Studien untersuchten Defer *et al.* (2009) die Hämolymphe verschiedener Muschelarten auf das Vorhandensein von antimikrobieller Aktivität und konnten dabei zeigen, dass die höchste Aktivität bei *Ostrea (O.) edulis* (europäische Auster) in den Kiemen und dem Mantelgewebe zu finden war. Allerdings unterlag *V. alginolyticus* in *Buccinum undatum* (Wellhornschnecke) und *O. edulis* keinem inhibitorischen Effekt (Defer *et al.*, 2009). Demnach zeigen sich Unterschiede hinsichtlich der Empfindlichkeit verschiedener Bakterien-Spezies und zwischen verschiedenen Muschel-Arten. Eine weitere antimikrobielle Aktivität von Miesmuscheln besteht in der Möglichkeit, Lysozym-sensitive Bakterien in den Mitteldarmdrüsen abzubauen (Birkbeck und McHenry, 1982). Der klinische *V. vulnificus*-Stamm könnte Lysozym-sensitiv sein.

In der vorliegenden Studie wurde gezeigt, dass durch die Filtrationsaktivität der Miesmuschel eine Anreicherung der filtrierte Partikel im Muschelgewebe, insbesondere in den Mitteldarmdrüsen, stattfindet. Aussagen von Wright *et al.* (1996), DePaola *et al.* (2000) sowie von Cavallo und Stabili (2002) bestätigen diese Akkumulationsfähigkeit.

Publizierte Fallberichte zeigen, dass für den Menschen gefährliche Kontaminationsdosen in Muscheln und Austern erreicht werden können (Hara-Kudo *et al.*, 2012; Morris, 2003; Su und Liu, 2007).

## 6.2 Hälterungsversuche

Die Hälterung von Muscheln wird genutzt, um die Bakterienkonzentrationen innerhalb der Muscheln zu senken. Während einer 7-tägigen Hälterung wurden kontinuierlich sinkende *Vibrio*-Konzentrationen detektiert.

Die Anfangs-*Vibrio* spp.-Konzentrationen während der Hälterungszeiträume betragen  $10^6$ - $10^7$  KbE/g und konnten innerhalb der Hälterungszeit bei 15 °C um 3-4 log auf ca.  $10^3$  KbE/g reduziert werden. Nach sieben Tagen wurden noch bis zu  $4,3 \times 10^3$  KbE/g *V. parahaemolyticus*,  $2,5 \times 10^3$  KbE/g *V. cholerae* und  $1,3 \times 10^4$  KbE/g *V. vulnificus* detektiert. Alle drei untersuchten *Vibrio* spp. konnten am Ende der Hälterungszeiträume noch nachgewiesen werden. Barile *et al.* (2009), Su *et al.* (2010) und Wang *et al.* (2010) beobachteten für *V. parahaemolyticus* die gleichen Trends. In Austern blieb *V. parahaemolyticus* für bis zu zwei Wochen persistent (Wang *et al.*, 2010). Marino *et al.* (2005) und Tamplin und Capers (1992) konnten in ihren Studien eine Temperaturabhängigkeit der Persistenz aufzeigen. *V. cholerae* O1 war in *M. galloprovincialis* nach sieben Tagen bei 14 °C nicht mehr nachweisbar, konnte aber bei 21 °C in niedrigen Zellzahlen detektiert werden (Marino *et al.* 2005). Tamplin und Capers (1992) zeigten außerdem, dass sich *V. vulnificus* bei Temperaturen über 21 °C in Austern und Seewasser vermehrt.

Die Hälterungsversuche zeigten beispielhaft die Klärungskinetik der Miesmuscheln von verschiedenen *Vibrio* spp. unter natürlichen Bedingungen, vergleichbar mit denen in Muschelaufzuchtgebieten. Sind in den Aufzuchtgebieten Vibrionen vorhanden, werden diese vermutlich nicht vollständig durch die Gezeiten (Ebbe und Flut) ausgeschwemmt, sondern überdauern z. B. im Sediment. Durch die Fähigkeit zur Biofilmbildung könnten sich Vibrionen unter natürlichen Bedingungen an und in den Muschelschalen, -netzen und -seilen sowie an Steinen anheften.

Die Vibrionen, die als Begleitflora detektiert wurden, haben in den Miesmuscheln die Quarantäne, Hälterung und längere Adaptation an die Haltungsanlage überstanden. Das Auffinden von Vibrionen als Begleitflora spricht dafür, dass nicht alle Vibrionen in den Mitteldarmdrüsen dem Klärungseffekt während der Hälterung unterliegen müssen. Zumal eine hohe Prävalenz von *Vibrio* spp. in Fischen und Meeresfrüchten beschrieben wurde, die darauf schließen lässt, dass Muscheln für Vibrionen einen natürlichen Lebensraum darstellen (Lhafi und Kühne, 2007; Messelhäusser *et al.*, 2010; Randt *et al.*, 2011).



### 6.3 Lagerungsversuche

Die Miesmuscheln wurden, wie im deutschen Einzelhandel praktiziert, entweder in Jutesäcken oder in Vakuumverpackungen gelagert. Die Temperaturen für die Lagerung wurden praxisorientiert gewählt. Im deutschen Handel werden Muscheln bei ca. 3 °C in schmelzendem Eis gelagert und zuvor während der Ernte auf Fischerbooten bei Umgebungstemperatur transportiert.

Während der 10-tägigen Lagerung bei 3 °C wurde für *V. cholerae* und *V. parahaemolyticus* gezeigt, dass weder eine Reduktion noch ein Anstieg der Vibrionen-Konzentrationen zu verzeichnen war. Für *V. vulnificus* wurde eine Konzentrations-Abnahme in den Vakuumverpackungen und Jutesäckchen detektiert, wie es aufgrund einer Studie von Liu *et al.* (2009) erwartet wurde.

Bei 15 °C wurde kein Wachstum von *V. vulnificus* oder einer der anderen *Vibrio* sp. detektiert. Kaspar und Tamplin (1993) und Dasilva *et al.* (2012) beschrieben für *V. vulnificus* Wachstum bei 15 °C. Allerdings wurden in allen zuvor erwähnten Studien Austern anstelle von Miesmuscheln verwendet.

Die Konzentrations-Abnahme von *V. vulnificus* könnte in der Herkunft des verwendeten Stammes begründet liegen. Möglicherweise ging der klinische *V. vulnificus*-Stamm schneller ins VBNC-Stadium über, weil er widrigen Umgebungsbedingungen, wie z. B. zu niedrigen Temperaturen ausgesetzt war. Dieser Zustand ermöglicht den Vibrionen für längere Zeit ein Überleben unter widrigen Umgebungsbedingungen (Paludan-Muller *et al.*, 1996; Weichart und Kjelleberg, 1996; Bates und Oliver, 2004; Wong und Wang, 2004; Asakura *et al.*, 2007). Die detektierte Dichte von *V. vulnificus* ist nach 10-tägiger Lagerung trotz beobachteter Abnahme dennoch ausreichend, um Infektionen beim Menschen auszulösen, insbesondere unter dem Gesichtspunkt, dass dieser Stamm als klinisches Isolat bereits zu Infektionen beim Menschen geführt hat.

Wie erwartet, blieben die Muscheln während der Lagerung bei 3 °C länger verschlossen als die Muscheln, die bei 15 °C gelagert wurden. Dies könnte daran gelegen haben, dass sich Jute zusammen zieht, sobald sie, wie bei der Lagerung auf schmelzendem Eis, nass wird. Andererseits könnten die kühlen Temperaturen zu einem verlangsamten Stoffwechsel der Muscheln geführt haben. Ein Flüssigkeitsaustritt und eine damit verbundene Austrocknung der Muscheln werden verhindert, wodurch die Haltbarkeit bzw. das Leben der Muscheln verlängert werden soll. Bei 15 °C zog sich die Jute wahrscheinlich nicht eng genug zusammen, um das Öffnen der Muscheln zu verhindern und der Stoffwechsel der Muscheln blieb gleich. Die Muschelöffnung in den Jutesäcken führte zum Verlust der Muschel-Lumen-Wässer und damit zur Austrocknung der Muscheln. Dies wurde bei 15 °C bereits ab dem vierten Tag (zweite Probenentnahme) beobachtet. Dabei begann das Absterben in den Jutesäcken ca. vier Tage

früher als in den Vakuumbuteln. In den Vakuumverpackungen wurde durch das ASW ein Austrocknen der Miesmuscheln verhindert. Dennoch wurde auch in diesen Verpackungen ein Absterben der Muscheln beobachtet, wobei es überwiegend zu einer Gewebelyse kam.

Diese Beobachtungen lassen den Schluss zu, dass das Muschelsterben nicht unbedingt von der Verpackungsart (Jute- oder Vakuumverpackung) abhängig war, sondern von der Lagertemperatur von 3 °C oder 15 °C. Im Hinblick auf Frische und Haltbarkeit der Muscheln stellte die Vakuumverpackung mit ASW die bessere Alternative dar, weil die Muscheln gegenüber den Lagertemperaturen etwas weniger anfällig waren.

Die Lagerung der Miesmuscheln unter üblichen Lagerungstemperaturen beeinflusste nicht die Persistenz von *V. cholerae* und *V. parahaemolyticus*. Die Kühlung der Proben verursachte weder einen Anstieg noch ein Absinken der Konzentrationen von *V. cholerae* und *V. parahaemolyticus*. Die Ergebnisse zeigen außerdem, dass ohne ausreichende Kühlung eine Qualitätsminderung der Miesmuscheln sehr schnell eintreten kann. Dabei werden Zersetzungsprozesse der Miesmuscheln durch enzymatisch bedingte stoffliche Umsetzungen von Bakterien an den Oberflächen induziert. Um Infektionen durch den Verzehr von kontaminierten Meeresfrüchten zu vermeiden, müssen eine sofortige und durchgängige Kühlung von Meeresfrüchten und eine hygienische Handhabung umgesetzt werden. Deswegen ist es wichtig, dass während der Muschelernte entweder ein schneller Transport in die Weiterverarbeitungsindustrie erfolgt oder eine Kühlvorrichtung auf den Erntebooten vorhanden ist. Die Kühlkette sollte während jeglicher Transport- und Verarbeitungsschritte nicht unterbrochen werden.

### 6.4 Schlussfolgerung

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass sich Vibrionen sehr schnell in Miesmuscheln, insbesondere in den Mitteldarmdrüsen, anreichern können. Die Ermittlung der Klärungskinetik der Muscheln ergab zu Beginn eine rapide Abnahme der verschiedenen *Vibrio* spp.-Konzentrationen, zeigte aber auch, dass Vibrionen langfristig persistieren können. Im Mittel wurde eine Abnahme von 0,02 log KbE/g pro Stunde berechnet. Während der Lagerung von Miesmuscheln unter den üblichen Lagerungsbedingungen konnten Vibrionen persistieren und wurden nach zehn Tagen in annähernd der gleichen Konzentration detektiert wie zu Beginn der Lagerung.

Getestet wurden drei *Vibrio* spp. mit humanpathogener Relevanz. Die Verwendung von nur einem Stamm der verwendeten *Vibrio* spp. zeigte eine Tendenz zur Anreicherung, Lokalisation und Persistenz der verschiedenen Vibrionen in Miesmuscheln.

Es konnte beobachtet werden, wie persistent Miesmuschel-adaptierte Vibrionen (*V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* und als Begleitflora detektierte *Vibrio* spp.) in Miesmuscheln sind und wie sich ein klinischer *V. vulnificus*-Stamm in diesen verhält. Anhand des *V. vulnificus*-

Stammes wurde gezeigt, dass auch nicht Muschel-adaptierte *Vibrio*-Stämme in Miesmuscheln langfristig persistieren können.

## 7 Zusammenfassung

### „In vivo Studien zur Anreicherung, Lokalisation und Persistenz von *Vibrio* spp. in artifiziiell kontaminierten *Mytilus edulis*“

Ziel der vorliegenden Studie war es, die Akkumulation und Persistenz von potentiell pathogenen *Vibrio* spp. in spezifischen Geweben von *Mytilus edulis* zu untersuchen. Dabei wurde in einer Umgebung von künstlichem Meerwasser die Aufnahme von *Vibrio* spp. in Miesmuscheln imitiert und die Konzentrationen der Vibrionen während der verschiedenen Versuche verfolgt.

Aufgrund verschiedener Studien, die auf eine hohe Prävalenz von *Vibrio* spp. in Muscheln, anderen Meeresfrüchten und Muschel-Zuchtgebieten hinwiesen, wurden Kontaminationsversuche, Hälterungsversuche und Lagerungsversuche mit Vibrionen in Miesmuscheln durchgeführt.

Die Anreicherung und Lokalisation von *Vibrio* spp. in Miesmuscheln sollten nach artifiziieller Kontamination beurteilt werden. In 24-stündigen Kontaminationsversuchen wurde gezeigt, dass Vibrionen innerhalb von 1,5 Stunden in großen Dichten, mit ca.  $3,9 \times 10^8$  KbE/g bis  $6,0 \times 10^9$  KbE/g, in den Mitteldarmdrüsen akkumulieren konnten.

In 7-tägigen Hälterungsversuchen wurde gezeigt, dass eine langsame und kontinuierliche Reduktion der Vibrionen-Konzentrationen einsetzt, aber am Ende der Untersuchungsdauer noch immer Vibrionen nachweisbar waren. Im Vergleich der *Vibrio* spp.-Konzentrationen in den Mitteldarmdrüsen der *Mytilus edulis* konnte eine Abnahme von 0,02 log KbE/g pro Stunde berechnet werden.

Zudem wurden Lagerungsversuche über einen Zeitraum von zehn Tagen durchgeführt, bei denen die Muscheln direkt nach der 24-stündigen Kontamination praxisnah in Jutesäcken und Vakuumbuteln verpackt wurden, um die Persistenz des Erregers bei 3 °C in schmelzendem Eis und bei 15 °C im Klimaschrank zu beurteilen. Hierbei konnte gezeigt werden, dass während der Versuche mit *V. cholerae* und *V. parahaemolyticus* keine Reduktion der Vibrionen-Konzentrationen beobachtet wurde. Lediglich Schwankungen im Bereich von 2 log-Stufen wurden detektiert. Die *V. vulnificus*-Konzentration sank dagegen langsam aber stetig ab.

Innerhalb von *Mytilus edulis* können Vibrionen sehr schnell in hohen Zellzahlen angesammelt werden, die während der Hälterung nur langsam ausgewaschen werden. Bei der anschließenden Lagerung bleiben die dann noch vorhandenen Zellzahlen stabil.

Die vorliegende Studie bestätigt, dass innerhalb von Muscheln Vibrionen-Konzentrationen erreicht werden können, die für die menschliche Gesundheit gefährlich sind, wenn kontaminierte Muscheln roh oder nur unzureichend gekocht verzehrt werden. Vor allem die Einhaltung der Kühlkette vom Fang bis zur Theke ist zur Vermeidung einer möglichen Vermehrung der *Vibrio* spp. in Meeresfrüchten essentiell.

## 8 Summary

### ***In vivo* studies for enrichment, localization and persistence of *Vibrio* spp. in artificially contaminated *Mytilus edulis***

The presented study focused on the accumulation and persistence of potentially pathogenic *Vibrio* spp. accumulating in specific tissues of *Mytilus edulis*. Experiments were carried out on a laboratory scale in order to imitate the uptake of *Vibrio* spp. in mussels under controlled environmental conditions, monitoring the concentration changes of *Vibrio* during the various studies.

The aim of mussel contamination tests was to evaluate the behavior of *Vibrio* spp. in mussels after artificial contamination. Various studies highlighted high loads of *Vibrio* spp. in mussels, other seafood and mussel farming areas. Thus, three research strategies were performed investigating contamination, clearance and storage.

Contamination assays showed that *Vibrio* accumulates within 1.5 hours in digestive glands, up to concentrations of approx.  $10^7$  CFU/g to  $10^8$  CFU/g.

Clearing experiments over a period of seven days showed a slow continuous reduction of *Vibrio* concentrations, however *Vibrio* were detected during the whole investigation periods. A decrease rate of 0.02 log CFU/g per hour was found by tracing of *Vibrio* spp. concentrations in the digestive glands of *Mytilus edulis*.

Storage experiments were performed over a period of ten days after 24-hours of contamination. Mussels were packed according to retail conditions (in jute bags and vacuum bags including 200 ml of ASW). The persistence of *Vibrio* spp. were achieved at 3°C in melting ice and at 15°C in a refrigerator. It was shown that under storage *V. cholerae* and *V. parahaemolyticus* counts were stable. Only fluctuations in the range of 2 log stages were detected. However, *V. vulnificus* concentrations declined slowly but steadily.

*Mytilus edulis* accumulates *Vibrio* rapidly to high numbers, clearance kinetics are slow and eradication of *Vibrio* seems slow whereas storage conditions keep *Vibrio* alive with stable counts.

The present study confirms that within mussels *Vibrio* concentrations can be achieved, which are dangerous to human health, if mussels were consumed raw or only partially cooked. Especially the maintenance of the cold chain from catch to counter is crucial to avoid a possible multiplication of *Vibrio* in seafood.

## 9 Literaturverzeichnis

Alam, M.; M. Sultana; G. B. Nair; R. B. Sack; D. A. Sack; A. K. Siddique; A. Ali; A. Huq and R. R. Colwell (2006). Toxigenic *Vibrio cholerae* in the aquatic environment of Mathbaria, Bangladesh. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**(4): 2849-2855.

Alam, M.; M. Sultana; G. B. Nair; A. K. Siddique; N. A. Hasan; R. B. Sack; D. A. Sack; K. U. Ahmed; A. Sadique; H. Watanabe; C. J. Grim; A. Huq and R. R. Colwell (2007). Viable but nonculturable *Vibrio cholerae* O1 in biofilms in the aquatic environment and their role in cholera transmission. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**(45): 17801-17806.

Albert, M. J.; M. Ansaruzzaman; P. K. Bardhan; A. S. G. Faruque; S. M. Faruque; M. S. Islam; D. Mahalanabis; R. B. Sack; M. A. Salam; A. K. Siddique; M. D. Yunus and K. Zaman (1993). Large epidemic of Cholera-like disease in Bangladesh caused by *Vibrio cholerae* 0139 Synonym Bengal. *Lancet* **342**(8868): 387-390.

Ali, M.; A. L. Lopez; Y. A. You; Y. F. Kim; B. Sah; B. Maskery and J. Clemens (2012). The global burden of cholera. *Bull. World Health Organ.* **90**(3): 209-218.

Alter, T.; S. Huehn; E. Strauch and R. Dieckmann (2012). Pathogene Mikroorganismen – *Vibrio*. Behr's Verlag 2012. Kapitel 5: 60

Amako, K.; K. Okada and S. Miake (1984). Evidence for the presence of a capsule in *Vibrio vulnificus*. *J. Gen. Microbiol.* **130**(10): 2741-2743.

Amaro, C. and 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.

Andersson, Y. and K. Ekdahl (2006). Wound infections due to *Vibrio cholerae* in Sweden after swimming in the Baltic Sea, summer 2006. *Euro. Surveill.* **11**(8): 3013.

Anonym (2004a). Verordnung (EG) Nr. 853/2004 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 29. April 2004 über spezifische Hygienevorschriften für Lebensmittel tierischen Ursprungs. Amtsblatt der Europäischen Union, L 139:55-205 (Berichtigung vom 25.06.2004 Abl.226, 22; Berichtigung vom 04.08.2007 Abl. 204, 2). Anhang III – Besondere Anforderungen. Abschnitt VII: Lebende Muscheln. Kapitel I-IX.

Anonym (2004b). Verordnung (EG) Nr. 854/2004 des Europäischen Parlaments und des Rates mit besonderen Verfahrensvorschriften für die amtliche Überwachung von zum menschlichen Verzehr bestimmten Erzeugnissen tierischen Ursprungs. Amtsblatt der Europäischen Union, L139 (Berichtigung vom 25.06.2004 Abl.226; Berichtigung vom 04.08.2007 Abl. 204,26). Artikel 6: Lebende Muscheln. Anhang II. Kapitel I-III.

Anonym (1905). Robert Koch - Biography. Nobelprize.org. 20.06.2012 [http://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/medicine/laureates/1905/koch-bio.html](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1905/koch-bio.html).

Anonym (2006). Untersuchungen zum Vorkommen von *Vibrio vulnificus* an der niedersächsischen Nordseeküste. 1. Aufl. August 2006, Niedersächsisches Landesgesundheitsamt: 2.

- Anonym (2009). Gefährliche Bakterien an der Ostseeküste. Ostseezeitung. Rostock. 03.09.2009
- Anonym (2010a). Frau stirbt an Vibrionen-Infektion nach Ostsee-Bad. Ostseezeitung. Rostock. 27.07.2010
- Anonym (2010b). Vibrionen-Krankheitserreger in der Ostsee, Landesamt für Gesundheit und Soziales Mecklenburg Vorpommern. 02.09.2010
- Anonym (2012). Die gemeinsame Fischereipolitik in Zahlen - statistische Grundlagen. L. A. f. V. d. E. Union, Europ. Union, 2012: 48.
- Ansaruzzaman, M.; M. Lucas; J. L. Deen; N. A. Bhuiyan; X. Y. Wang; A. Safa; M. Sultana; A. Chowdhury; G. B. Nair; D. A. Sack; L. von Seidlein; M. K. Puri; M. Ali; C. L. Chaignat; J. D. Clemens and A. Barreto (2005). Pandemic serovars (O3:K6 and O4:K68) of *Vibrio parahaemolyticus* associated with diarrhea in Mozambique: spread of the pandemic into the African continent. J. Clin. Microbiol. **43**(6): 2559-2562.
- Arias, C. R.; M. C. Macián; R. Aznar; E. Garay and M. J. Pujalte (1999). Low incidence of *Vibrio vulnificus* among *Vibrio* isolates from sea water and shellfish of the western Mediterranean coast. J. Appl. Microbiol. **86**(1): 125-134.
- Asakura, H.; A. Ishiwa; E. Arakawa; S. Makino; Y. Okada; S. Yamamoto and S. Igimi (2007). Gene expression profile of *Vibrio cholerae* in the cold stress-induced viable but nonculturable state. Environ. Microbiol. **9**(4): 869-879.
- Austin, B. (2011). Taxonomy of bacterial fish pathogens. Vet. Res. **42**(1): 20.
- Baffone, W.; R. Tarsi; L. Pane; R. Campana; B. Repetto; G. L. Mariottini and C. Pruzzo (2006). Detection of free-living and plankton-bound vibrios in coastal waters of the Adriatic Sea (Italy) and study of their pathogenicity-associated properties. Environ. Microbiol. **8**(7): 1299-1305.
- Baker-Austin, C. (2010). Vibrios as causal agents of zoonoses. Vet. Microbiol. **140**: 310-317.
- Barile, N. B.; M. Scopa; E. Nerone; G. Mascilongo; S. Recchi; S. Cappabianca and L. Antonetti (2009). Study of the efficacy of a closed cycle depuration system on bivalve molluscs. Vet. Ital. **45**(4): 555-566.
- Barker, W. H. (1974). *Vibrio parahaemolyticus* Outbreaks in the United States. Lancet **303**(7857): 551-554.
- Bates, T. C. and J. D. Oliver (2004). The viable but nonculturable state of Kanagawa positive and negative strains of *Vibrio parahaemolyticus*. J. Microbiol. **42**(2): 74-79.
- Bauer, A.; O. Ostensvik; M. Florvag; O. Ormen and L. M. Rorvik (2006). Occurrence of *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae*, and *Vibrio vulnificus* in Norwegian Blue Mussels (*Mytilus edulis*). Appl. Environ. Microbiol. **72**(4): 3058-3061.

- Bauer, A. and 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.
- Bayne, B. L. (1965). Growth and the delay of metamorphosis of the larvae of *Mytilus edulis* (L.). *Ophelia* **2**(1): 1-47.
- Bayne, B. L.; A. J. S. Hawkins and E. Navarro (1987). Feeding and digestion by the mussel *Mytilus-edulis* (L) (*Bivalvia*-Mollusca) in mixtures of silt and algal cells at low concentrations. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **111**(1): 1-22.
- Bej, A. K.; D. P. Patterson; C. W. Brasher; M. C. Vickery; D. D. Jones and C. A. Kaysner (1999). Detection of total and hemolysin-producing *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish using multiplex PCR amplification of *tl*, *tdh* and *trh*. *J. Microbiol. Methods* **36**(3): 215-225.
- Binsztejn, N.; M. C. Costagliola; M. Pichel; V. Jurquiza; F. C. Ramirez; R. Akselman; M. Vacchino; A. Huq and R. Colwell (2004). Viable but nonculturable *Vibrio cholerae* O1 in the aquatic environment of Argentina. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**(12): 7481-7486.
- Birkbeck, T. H. and J. G. McHenry (1982). Degradation of bacteria by *Mytilus edulis*. *Mar. Biol.* **72**(1): 7-15.
- 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 and 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.
- Blake, P. A.; R. E. Weaver and D. G. Hollis (1980). Diseases of humans (other than cholera) caused by vibrios. *Annu. Rev. Microbiol.* **34**: 341-367.
- BMELV (2009). Spezifische Anforderungen an die Zulassung von Fischereifahrzeugen und Betrieben, in denen Fischereierzeugnisse hergestellt oder behandelt werden (Fischverarbeitungsbetriebe). Die Bundesregierung, <http://www.verwaltungsvorschriften-im-internet.de/BMELV-329-20091109-KF-002-A004.htm>
- Brandin, E. R. and T. G. Pistole (1985). Presence of Microorganisms in Hemolymph of the Horseshoe-Crab *Limulus-Polyphemus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **49**(3): 718-720.
- Bross, M. H.; K. Soch; R. Morales and R. B. Mitchell (2007). *Vibrio vulnificus* infection: diagnosis and treatment. *Am. Fam. Phys.* **76**(4): 539-544.
- Bullock, G. L. (1977) *Vibriosis in fish*. US Fish and Wildlife Publications, Paper 125
- Butt, A. A.; K. E. Aldridge and 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 and 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.; R. T. Espejo; M. C. Hernandez; M. L. Rioseco; J. Ulloa and J. A. Vergara (2007). *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 epidemic diarrhea, Chile, 2005. *Emerg. Infect. Dis.* **13**(4): 655-656.
- Cabrera Rodriguez, L. E.; S. P. Monroy; L. Morier; M. M. Ramirez Alvarez; A. Fernandez Abreu; G. Castro Escarpulli; A. Longa Briceno and L. Bravo Farinas (2005). Severe otitis due to *Vibrio fluvialis* in a patient with AIDS: first report in the world. *Rev. Cubana Med. Trop.* **57**(2): 154-155.
- Cavallo, R. A. and L. Stabili (2002). Presence of vibrios in seawater and *Mytilus galloprovincialis* (Lam.) from the Mar Piccolo of Taranto (Ionian Sea). *Water Res.* **36**(15): 3719-3726.
- CDC (2007). Summary of human *Vibrio* cases reported to CDC, 2007. [http://www.cdc.gov/nationalsurveillance/cholera\\_vibrio\\_surveillance.html](http://www.cdc.gov/nationalsurveillance/cholera_vibrio_surveillance.html) (25.02.2013)
- CDC (2008). Summary of human *Vibrio* cases reported to CDC, 2008. [http://www.cdc.gov/nationalsurveillance/cholera\\_vibrio\\_surveillance.html](http://www.cdc.gov/nationalsurveillance/cholera_vibrio_surveillance.html) (25.02.2013)
- CDC (2011). Cholera and other *Vibrio* illness (COVIS) Annual Summary, 2009. Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services. [http://www.cdc.gov/nationalsurveillance/cholera\\_vibrio\\_surveillance.html](http://www.cdc.gov/nationalsurveillance/cholera_vibrio_surveillance.html) (25.02.2013)
- CDC (2012). Identification of *Vibrio cholerae* Serogroup O1, serotype Inaba, biotype El Tor strain — Haiti, March 2012. *MMWR* **61**(17): 297-316.
- Chandran, A.; S. Varghese; E. Kandeler; A. Thomas; M. Hatha and A. Mazumder (2011). An assessment of potential public health risk associated with the extended survival of indicator and pathogenic bacteria in freshwater lake sediments. *Int. J. Hyg. Environ. Health* **214**(3): 258-264.
- Chatterjee, B. D.; P. K. De; A. K. Hati and N. Tandon (1978). Fly borne *Vibrio parahaemolyticus* in Calcutta. *Trop. Geogr. Med.* **30**(4): 499-503.
- Chen, M.; D. Guo; H. C. Wong; X. Zhang; F. Liu; H. Chen; B. Liu; L. Wang; F. Wu and L. Feng (2012). Development of O-serogroup specific PCR assay for detection and identification of *Vibrio parahaemolyticus*. *Int. J. Food Microbiol.* **159**(2): 122-129.
- Chitov, T.; P. Kirikaew; P. Yungyune; N. Ruengprapan and K. Sontikun (2009). An incidence of large foodborne outbreak associated with *Vibrio mimicus*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **28**(4): 421-424.
- Chowdhury, N. R.; S. Chakraborty; T. Ramamurthy; M. Nishibuchi; S. Yamasaki; Y. Takeda and G. B. Nair (2000). Molecular evidence of clonal *Vibrio parahaemolyticus* pandemic strains. *Emerg. Infect. Dis.* **6**(6): 631-636.
- Chuang, Y. C.; C. Y. Yuan; C. Y. Liu; C. K. Lan and 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.

- Cole, J. J. (1982). Interactions between bacteria and algae in aquatic ecosystems. *An. Rev. Ecol. System.* **13**: 291-314.
- Collin, B.; A. S. Rehnstam-Holm; B. Lindmark; A. Pal; S. N. Wai and B. Hernroth (2012). The origin of *Vibrio cholerae* influences uptake and persistence in the Blue Mussel *Mytilus edulis*. *J. Shellf. Res.* **31**(1): 87-92.
- Colwell, R. R. (1996). Global climate and infectious disease: the cholera paradigm. *Sci.* **274**(5295): 2025-2031.
- Colwell, R. R. and D. J. Grimes (1984). *Vibrio* diseases of marine fish populations. *Helgoland Mar. Res.* **37**(1): 265-287.
- Cook, D. W.; J. C. Bowers and A. DePaola (2002). Density of total and pathogenic (*tdh+*) *Vibrio parahaemolyticus* in Atlantic and Gulf coast molluscan shellfish at harvest. *J. Food Prot.* **65**(12): 1873-1880.
- Cooper, D. M.; R. Jagus; R. L. Somers and M. Rodbell (1981). Cholera toxin modifies diverse GTP-modulated regulatory proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **101**(4): 1179-1185.
- Corrales, M. T.; A. E. Bainotti and A. C. Simonetta (1994). Survival of *Vibrio cholerae* O1 in common foodstuff during storage at different temperatures. *Lett. Appl. Microbiol.* **18**(5): 277-280.
- Croci, L.; P. Serratore; L. Cozzi; A. Stacchini; S. Milandri; E. Suffredini and L. Toti (2001). Detection of *Vibrionaceae* in mussels and in their seawater growing area. *Lett. Appl. Microbiol.* **32**(1): 57-61.
- Croci, L.; E. Suffredini; L. Cozzi and L. Toti (2002). Effects of depuration of molluscs experimentally contaminated with *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae* O1 and *Vibrio parahaemolyticus*. *J. Appl. Microbiol.* **92**(3): 460-465.
- Dalsgaard, A.; N. Frimodt-Moller; B. Bruun; L. Hoi and J. L. Larsen (1996). Clinical manifestations and molecular epidemiology of *Vibrio vulnificus* infections in Denmark. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **15**(3): 227-232.
- Dalsgaard, A.; H. H. Huss; A. H-Kittikun and J. L. Larsen (1995). Prevalence of *Vibrio cholerae* and *Salmonella* in a major shrimp production area in Thailand. *Int. J. Food. Microbiol.* **28**(1): 101-113.
- DaSilva, L.; S. Parveen; A. DePaola; J. Bowers; K. Brohawn and M. L. Tamplin (2012). Development and validation of a predictive model for the growth of *Vibrio vulnificus* in post-harvest shellstock oysters. *Appl. Environ. Microbiol.* 2012, **78**(6): 1675
- Deen, J. L.; L. von Seidlein; D. Sur; M. Agtini; M. E. S. Lucas; A. L. Lopez; D. R. Kim; M. Ali and J. D. Clemens (2008). The high burden of cholera in children: comparison of incidence from endemic areas in Asia and Africa. *Plos. Neglected Trop. Dis.* **2**(2): e173
- Defer, D.; N. Bourgougnon and Y. Fleury (2009). Screening for antibacterial and antiviral activities in three bivalve and two gastropod marine molluscs. *Aquaculture* **293**(1-2): 1-7.

- Dekeyser, P.; M. Gossuin-Detrain; J. P. Butzler and J. Sternon (1972). Acute enteritis due to related *Vibrio*: first positive stool cultures. J. Infect. Dis. **125**(4): 390-392.
- DePaola, A.; G. M. Capers and D. Alexander (1994). Densities of *Vibrio vulnificus* in the intestines of fish from the US Gulf-coast. Appl. Environ. Microbiol. **60**(3): 984-988.
- DePaola, A.; C. A. Kaysner; J. Bowers and 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.
- DePaola, A.; J. L. Nordstrom; J. C. Bowers; J. G. Wells and D. W. Cook (2003). Seasonal abundance of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in Alabama oysters. Appl. Environ. Microbiol. **69**(3): 1521-1526.
- Di Pinto, A.; G. Ciccarese; M. Fontanarosa; V. Terio and G. Tantillo (2006). Detection of *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish samples using collagenase-targeted multiplex-PCR. J. Food Safety **26**(2): 150-159.
- Di Pinto, A.; G. Ciccarese; G. Tantillo; D. Catalano and 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.; V. Terio; L. Novello and G. Tantillo (2011). Comparison between thiosulphate-citrate-bile salt sucrose (TCBS) agar and CHROMagar *Vibrio* for isolating *Vibrio parahaemolyticus*. Food Control **22**(1): 124-127.
- Doucette, G. J. (1995). Interactions between bacteria and harmful algae: a review. Nat. Toxins **3**(2): 65-74.
- Drake, S. L.; A. DePaola and L.-A. Jaykus (2007). An Overview of *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus*. Comprehensive Rev. Food Science and Food Safety **6**(4): 120-144.
- Duan, J. Y. and Y. C. Su (2005). Comparison of a chromogenic medium with thiosulfate-citrate-bile salts-sucrose agar for detecting *Vibrio parahaemolyticus*. J. Food Science **70**(2): M125-M128.
- Duim, B.; T. M. Wassenaar; A. Rigtter and J. Wagenaar (1999). High-resolution genotyping of *Campylobacter* strains isolated from poultry and humans with amplified fragment length polymorphism fingerprinting. Appl. Environ. Microbiol. **65**(6): 2369-2375.
- Eddabra, R.; Y. Piemont and J. M. Scheftel (2011). Evaluation of a new chromogenic medium, chromID *Vibrio*, for the isolation and presumptive identification of *Vibrio cholerae* and *Vibrio parahaemolyticus* from human clinical specimens. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. **30**(6): 733-737.
- Egidius, E.; K. Andersen; E. Clausen and J. Raa (1981). Cold-water or Hitra disease in Norwegian salmonid farming. J. Fish Dis. **4**(4): 353-354.
- Emch, M.; C. Feldacker; M. S. Islam and M. Ali (2008). Seasonality of cholera from 1974 to 2005: a review of global patterns. Int. J. Health Geogr. **7**(31): 1-13

- Espineira, M.; M. Atanassova; J. M. Vieites and F. J. Santaclara (2010). Validation of a method for the detection of five species, serogroups, biotypes and virulence factors of *Vibrio* by multiplex PCR in fish and seafood. *Food Microbiol.* **27**(1): 122-131.
- FAO (2004-2012). Cultured Aquatic Species Information Programme. *Mytilus edulis*. [http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Mytilus\\_edulis/en#tcBioFea](http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Mytilus_edulis/en#tcBioFea) (30.10.2012)
- FAO (2008). Bivalve depuration: fundamental and practical aspects. <http://www.fao.org/docrep/011/i0201e/i0201e00.htm> (30.05.2012)
- Farmiloe, F. J.; S. J. Cornford; J. B. M. Coppock and M. Ingram (1954). The survival of *Bacillus subtilis* spores in the baking of bread. *J. Science Food and Agriculture* **5**(6): 292-304.
- Faruque, S. M.; K. Biswas; S. M. N. Udden; Q. S. Ahmad; D. A. Sack; G. B. Nair and J. J. Mekalanos (2006). Transmissibility of cholera: in vivo-formed biofilms and their relationship to infectivity and persistence in the environment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**(16): 6350-6355.
- FDA (2009). National Shellfish Sanitation Program Guide for the Control of Molluscan Shellfish 2009 Revision. <http://www.fda.gov/Food/FoodSafety/Product-SpecificInformation/Seafood/FederalStatePrograms/NationalShellfishSanitationProgram/ucm046353.htm> (30.10.2012)
- FDA (2011). Consumers warned to avoid eating oysters from area 1642 in Apalachicola Bay, Florida. <http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm254754.htm>. (10.08.2012)
- FDA (2012). Bad Bug Book. 2<sup>nd</sup> Edition. Foodborne pathogenic microorganisms and natural toxins handbook. <http://www.fda.gov/Food/FoodSafety/FoodborneIllness/FoodborneIllnessFoodbornePathogensNaturalToxins/BadBugBook/ucm070473.htm>. (30.05.2012)
- Fehlhaber, K.; J. Kleer and F. Kley (2007). *Handbuch Lebensmittelhygiene XII.5 Fisch und Fischereierzeugnisse inkl. Krebse und Weichtiere 5.2.2 Muscheln*. BEHR's Verlag, Hamburg (2007): 623-624
- Felsenfeld, O. (1966). A review of recent trends in cholera research and control. With an annex on the isolation and identification of cholera vibrios. *Bul. World Health Organ.* **34**(2): 161-195.
- FIZ (2010). *Fisch Wirtschaft Daten und Fakten 2010*. Fisch Wirtschaft, Fisch-Informationszentrum e. V.: 26.
- Fouz, B. and C. Amaro (2003). Isolation of a new serovar of *Vibrio vulnificus* pathogenic for eels cultured in freshwater farms. *Aquaculture* **217**(1-4): 677-682.
- Fouz, B.; J. L. Larsen and C. Amaro (2006). *Vibrio vulnificus* serovar A: an emerging pathogen in European anguilliculture. *J. Fish Dis.* **29**(5): 285-291.

- Fouz, B.; A. Llorens; E. Valiente and C. Amaro (2010). A comparative epizootiologic study of the two fish-pathogenic serovars of *Vibrio vulnificus* biotype 2. J. Fish Dis. **33**(5): 383-390.
- Frank, C.; M. Littman; K. Alpers and J. Hallauer (2006). *Vibrio vulnificus* wound infections after contact with the Baltic Sea, Germany. Euro. Surveill. **11**(8): 3024.
- Frans, I.; C. W. Michiels; P. Bossier; K. A. Willems; B. Lievens and H. Rediers (2011). *Vibrio anguillarum* as a fish pathogen: virulence factors, diagnosis and prevention. J. Fish Dis. **34**(9): 643-661.
- Frerichs, R. R. (2001). Readers respond to "Cholera in Paris". Am. J. Public Health **91**(8): 1170.
- Froelich, B.; A. Ringwood; I. Sokolova and J. Oliver (2010). Uptake and depuration of the C- and E-genotypes of *Vibrio vulnificus* by the Eastern Oyster (*Crassostrea virginica*). Environ. Microbiol. Rep. **2**(1): 112-115.
- Glass, R. I.; S. Becker; M. I. Huq; B. J. Stoll; M. U. Khan; M. H. Merson; J. V. Lee and R. E. Black (1982). Endemic cholera in rural Bangladesh, 1966-1980. Am. J. Epidemiol. **116**(6): 959-970.
- Goatcher, L. J.; S. E. Engler; D. C. Wagner and D. C. Westhoff (1974). Effect of storage at 5 C on survival of *Vibrio parahaemolyticus* in processed Maryland Oysters (*Crassostrea virginica*). J. Milk Food Technol. **37**(2): 74-77.
- Gomez-Gil, B.; L. Tron-Mayén; A. Roque; J. F. Turnbull; V. Inglis and A. L. Guerra-Flores (1998). Species of *Vibrio* isolated from hepatopancreas, haemolymph and digestive tract of a population of healthy juvenile *Penaeus vannamei*. Aquaculture **163**(1-2): 1-9.
- Gomez, J. M.; R. Fajardo; J. F. Patino and C. A. Arias (2003). Necrotizing fasciitis due to *Vibrio alginolyticus* in an immunocompetent patient. J. Clin. Microbiol. **41**(7): 3427-3429.
- Gopal, S.; S. K. Otta; S. Kumar; I. Karunasagar and M. Nishibuchi (2005). The occurrence of *Vibrio* species in tropical shrimp culture environments; implications for food safety. Int. J. Food Microbiol. **102**(2): 151-159.
- Gorbach, S. L.; J. G. Banwell; B. Jacobs; B. D. Chatterjee; R. Mitra; K. L. Brigham and K. N. Neogy (1970). Intestinal microflora in Asiatic cholera. I. Rice-water stool. J. Infect. Dis. **121**(1): 32-37.
- Gosling, E. (2007). Bivalve Molluscs. Blackwell Publishing Ltd: 439.
- Gulig, P. A.; K. L. Bourdage and A. M. Starks (2005). Molecular pathogenesis of *Vibrio vulnificus*. J. Microbiol. **43**: 118-131.
- Gunnlaugsson, G.; J. Einarsdottir; F. J. Angulo; S. A. Mentambanar; A. Passa and R. V. Tauxe (1998). Funerals during the 1994 cholera epidemic in Guinea-Bissau, West Africa: the need for disinfection of bodies of persons dying of cholera. Epidemiol. Infect. **120**(1): 7-15.

- Halpern, A.; Y. B. Broza; S. Mittler; E. Arakawa and A. Broza (2004). Chironomid egg masses as a natural reservoir of *Vibrio cholerae* non-O1 and non-O139 in freshwater habitats. *Microb. Ecol.* **48**(2): 285.
- Hara-Kudo, Y.; S. Saito; K. Ohtsuka; S. Yamasaki; S. Yahiro; T. Nishio; Y. Iwade; Y. Otomo; H. Konuma; H. Tanaka; H. Nakagawa; K. Sugiyama; Y. Sugita-Konishi and S. Kumagai (2012). Characteristics of a sharp decrease in *Vibrio parahaemolyticus* infections and seafood contamination in Japan. *Int. J. Food Microbiol.* **157**(1): 95-101.
- Hau, V. and C. O. Ho (2011). Necrotising fasciitis caused by *Vibrio vulnificus* in the lower limb following exposure to seafood on the hand. *Hong Kong Med. J.* **17**(4): 335-337.
- Hayat, U.; G. P. Reddy; C. A. Bush; J. A. Johnson; A. C. Wright and J. G. Morris, Jr. (1993). Capsular types of *Vibrio vulnificus*: an analysis of strains from clinical and environmental sources. *J. Infect. Dis.* **168**(3): 758-762.
- Hays, J. N. (2005). Cholera epidemic in Hamburg, 1892 *Epidemics and Pandemics*. <http://www.scribd.com/doc/50571062/Epidemics-and-Pandemics>, ABC-CLIO: 321-330.
- Hickman-Brenner, F. W.; D. J. Brenner; A. G. Steigerwalt; M. Schreiber; S. D. Holmberg; L. M. Baldy; C. S. Lewis; N. M. Pickens and J. J. Farmer, 3<sup>rd</sup> (1984). *Vibrio fluvialis* and *Vibrio furnissii* isolated from a stool sample of one patient. *J. Clin. Microbiol.* **20**(1): 125-127.
- Hitchner, E. R. and S. F. Snieszko (1947). A study of a microorganism causing a bacterial disease of lobsters. *J. Bacteriol.* **54**(1): 48.
- Hlady, W. G. and K. C. Klontz (1996). The epidemiology of *Vibrio* infections in Florida, 1981-1993. *J. Infect. Dis.* **173**(5): 1176-1183.
- Hodge, T. W., Jr.; C. S. Levy and M. A. Smith (1995). Diarrhea associated with *Vibrio fluvialis* infection in a patient with AIDS. *Clin. Infect. Dis.* **21**(1): 237-238.
- Hoi, L.; J. L. Larsen; I. Dalsgaard and A. Dalsgaard (1998). Occurrence of *Vibrio vulnificus* biotypes in Danish marine environments. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**(1): 7-13.
- Holt, J. G.; N. R. Krieg; P. H. A. Sneath; J. T. Staly and S. T. Williams (2000). *Bergey's manual of determinative bacteriology*, Lippincott Williams and Wilkins, 9<sup>th</sup> ed.
- Hood, M. A. and G. E. Ness (1982). Survival of *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli* in estuarine waters and sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **43**(3): 578-584.
- Howard-Jones, N. (1984). Robert Koch and the cholera vibrio: a centenary. *Br. Med. J. (Clin. Res. Ed.)* **288**(6414): 379-381.
- Hubert, F.; W. Vander Knaap; T. Noel and P. Roch (1996). Cytotoxic and antibacterial properties of *Mytilus galloprovincialis*, *Ostrea edulis* and *Crassostrea gigas* (bivalve molluscs) hemolymph. *Aquatic Living Res.* **9**(2): 115-124.
- Huq, A.; E. B. Small; P. A. West; M. I. Huq; R. Rahman and R. R. Colwell (1983). Ecological relationships between *Vibrio cholerae* and planktonic crustacean copepods. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**(1): 275-283.

- Huq, M. I.; A. K. Alam; D. J. Brenner and G. K. Morris (1980). Isolation of *Vibrio*-like group, EF-6, from patients with diarrhea. *J. Clin. Microbiol.* **11**(6): 621-624.
- Iida, T.; K. S. Park and T. Honda (2006). *Vibrio parahaemolyticus*. The biology of vibrios. F. L. Thompson, B. Austin and J. Swings. Washington, D.C., ASM Press: 340-347.
- Iida, T.; K. S. Park; O. Suthienkul; J. Kozawa; Y. Yamaichi; K. Yamamoto and T. Honda (1998). Close proximity of the *tdh*, *trh* and *ure* genes on the chromosome of *Vibrio parahaemolyticus*. *Microbiol.* **144**(9): 2517-2523.
- 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*”.
- Jain, V.; M. Dongre and S. Raychaudhuri (2006). Interaction of *Vibrio cholerae* O139 with an intestinal parasite, *Entamoeba histolytica*. *J. Med. Microbiol.* **55**(12): 1755-1756.
- Johne, R.; R.-P. Pund and C. Schrader (2011). Experimental accumulation and persistence of norovirus, feline calicivirus and rotavirus in blue mussels (*Mytilus edulis*). *Arch. f. Lebensmittelhyg.* **62**(4): 129-135.
- Johnson, J. A.; C. A. Salles; P. Panigrahi; M. J. Albert; A. C. Wright; R. J. Johnson and J. G. Morris, Jr. (1994). *Vibrio cholerae* O139 synonym bengal is closely related to *Vibrio cholerae* El Tor but has important differences. *Infect. Immun.* **62**(5): 2108-2110.
- Johnson, W. G., Jr.; A. C. Salinger and W. C. King (1973). Survival of *Vibrio parahaemolyticus* in oyster shellstock at two different storage temperatures. *Appl. Microbiol.* **26**(1): 122-123.
- Jones, J. A. (1999). International control of cholera: an environmental perspective to infectious disease control. *Indiana Law J.* **74**(3): 1035-1083.
- Jorgensen, C. B. (1975). Comparative physiology of suspension feeding. *Annu. Rev. Physiol.* **37**: 57-79.
- Joseph, S. W.; R. R. Colwell and J. B. Kaper (1982). *Vibrio parahaemolyticus* and related halophilic vibrios. *Crit. Rev. Microbiol.* **10**(1): 77-124.
- Judek, K.; D. Graubaum; C. Buhler; C. Krampitz and T. Alter (2008). Untersuchungen zur mikrobiologischen Qualität von Muscheln unter besonderer Berücksichtigung der *Campylobacter* spp.- und *Vibrio* spp.-Population. 49. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der DVG, Garmisch-Partenkirchen, DVG.

- Kaspar, C. W. and M. L. Tamplin (1993). Effects of temperature and salinity on the survival of *Vibrio vulnificus* in seawater and shellfish. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**(8): 2425-2429.
- Kielwein, G. (1969). Ein Nährboden zur selektiven Züchtung von Pseudomonaden und Aeromonaden. *Arch. f. Lebensmittelhyg.* **20**: 4.
- Kielwein, G. (1971). Die Isolierung und Differenzierung von Pseudomonaden aus Lebensmitteln. *Arch. f. Lebensmittelhyg.* **22**: 4.
- Kim, M. N. and H. J. Bang (2008). Detection of marine pathogenic bacterial *Vibrio* species by multiplex polymerase chain reaction (PCR). *J. Environ. Biol.* **29**(4): 543-546.
- Kim, Y. R.; S. E. Lee; H. Kook; J. A. Yeom; H. S. Na; S. Y. Kim; S. S. Chung; H. E. Choy and J. H. Rhee (2008). *Vibrio vulnificus* RTX toxin kills host cells only after contact of the bacteria with host cells. *Cell. Microbiol.* **10**(4): 848-862.
- Kirschner, A. K.; J. Schlesinger; A. H. Farnleitner; R. Hornek; B. Suss; B. Golda; A. Herzig and B. Reitner (2008). Rapid growth of planktonic *Vibrio cholerae* non-O1/non-O139 strains in a large alkaline lake in Austria: dependence on temperature and dissolved organic carbon quality. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**(7): 2004-2015.
- Kishishita, M.; N. Matsuoka; K. Kumagai; S. Yamasaki; Y. Takeda and M. Nishibuchi (1992). Sequence variation in the thermostable direct hemolysin-related hemolysin (*trh*) gene of *Vibrio parahaemolyticus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**(8): 2449-2457.
- Kizer, K. W. (1994). *Vibrio vulnificus* hazard in patients with liver disease. *West. J. Med.* **161**(1): 64-65.
- Klontz, K. C.; D. E. Cover; F. N. Hyman and R. C. Mullen (1994). Fatal gastroenteritis due to *Vibrio fluvialis* and nonfatal bacteremia due to *Vibrio mimicus*: unusual *Vibrio* infections in two patients. *Clin. Infect. Dis.* **19**(3): 541-542.
- Koenig, K. L.; J. Mueller and T. Rose (1991). *Vibrio vulnificus*. Hazard on the half shell. *West. J. Med.* **155**(4): 400-403.
- Kokotovic, B.; N. F. Friis; J. S. Jensen and P. Ahrens (1999). Amplified-fragment length polymorphism fingerprinting of *Mycoplasma* species. *J. Clin. Microbiol.* **37**(10): 3300-3307.
- Kothary, M. H. and U. S. Babu (2001). Infective dose of foodborne pathogens in volunteers: A review. *J. Food Safety* **21**(1): 49-73.
- Krengel, S.; K. Kuhnt-Lenz; S. Fetscher; W. Solbach and H. H. Wolff (2003). *Vibrio vulnificus* Sepsis. *J. Dtsch. Dermatol. Ges.* **1**(12): 959-961.
- Krupesha Sharma, S. R.; G. Rathore; D. K. Verma; N. Sadhu and K. K. Philipose (2011). *Vibrio alginolyticus* infection in Asian seabass (*Lates calcarifer*, Bloch) reared in open sea floating cages in India. *Aquaculture Res.*, 2011: 1-7
- Lee, B. C.; S. H. Choi and T. S. Kim (2008). *Vibrio vulnificus* RTX toxin plays an important role in the apoptotic death of human intestinal epithelial cells exposed to *Vibrio vulnificus*. *Microb. Infect.* **10**(14-15): 1504-1513.



- Lehmacher, A. and B. Hansen (2007). Real-time PCR of virulent *Vibrio parahaemolyticus* in fish and crustacean products. *J. Cons. Protect. Food Safety* **2**(2): 213-217.
- Lehnberg, W. and H. Theede (1979). Kombinierte Wirkungen von Temperatur, Salzgehalt und Cadmium auf Entwicklung, Wachstum und Mortalität der Larven von *Mytilus edulis* aus der westlichen Ostsee. *Helgoland Mar. Res.* **32**(1): 179-199.
- Lesmana, M.; D. S. Subekti; P. Tjaniadi; C. H. Simanjuntak; N. H. Punjabi; J. R. Campbell and B. A. Oyoyo (2002). Spectrum of *Vibrio* species associated with acute diarrhea in north Jakarta, Indonesia. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **43**(2): 91-97.
- Lhafi, S. K. and M. Kühne (2007). Occurrence of *Vibrio* spp. in blue mussels (*Mytilus edulis*) from the German Wadden Sea. *Int. J. Food. Microbiol.* **116**(2): 297-300.
- Lightner, D. V. and R. M. Redman (1981). A Baculovirus-caused disease of the penaeid shrimp, *Penaeus monodon*. *J. Invertebrate Pathol.* **38**(2): 299-302.
- Linde, H. J.; R. Kobuch; S. Jayasinghe; U. Reischl; N. Lehn; S. Kaulfuss and L. Beutin (2004). *Vibrio metschnikovii*, a rare cause of wound infection. *J. Clin. Microbiol.* **42**(10): 4909-4911.
- Linkous, D. A. and J. D. Oliver (1999). Pathogenesis of *Vibrio vulnificus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **174**(2): 207-214.
- Liu, C.; J. Lu and Y. C. Su (2009). Effects of flash freezing, followed by frozen storage, on reducing *Vibrio parahaemolyticus* in Pacific raw oysters (*Crassostrea gigas*). *J. Food Prot.* **72**(1): 174-177.
- Liu, W. W.; X. S. Shen; C. C. Liu and Y. C. Su (2010). *Vibrio parahaemolyticus* in granulated ark shell clam (*Tegillarca granosas*): accumulation from water and survival during cold storage and thermal process. *Intern. J. Food Science Technol.* **45**(4): 670-675.
- Lo, H. R.; J. H. Lin; Y. H. Chen; C. L. Chen; C. P. Shao; Y. C. Lai and L. I. Hor (2011). RTX toxin enhances the survival of *Vibrio vulnificus* during infection by protecting the organism from phagocytosis. *J. Infect. Dis.* **203**(12): 1866-1874.
- Lopez-Joven, C.; I. de Blas; I. Ruiz-Zarzuela; M. D. Furones and A. Roque (2011). Experimental uptake and retention of pathogenic and nonpathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in two species of clams: *Ruditapes decussatus* and *Ruditapes philippinarum*. *J. Appl. Microbiol.* **111**(1): 197-208.
- Lüder (2007). Klimarekonstruktionen auf Grundlage der Analyse subfossiler Chironomiden. Ein Beitrag zur Rekonstruktion holozäner Sommertemperaturen in Südnorwegen. *NORDEN* **18**: 77-83.
- Mahmud, Z. H.; S. B. Neogi; A. Kassu; T. Wada; M. S. Islam; G. B. Nair and F. Ota (2007). Seaweeds as a reservoir for diverse *Vibrio parahaemolyticus* populations in Japan. *Int. J. Food Microbiol.* **118**(1): 92-96.

- Malayil, L.; J. W. Turner; B. L. Mote; K. Howe and E. K. Lipp (2011). Evaluation of enrichment media for improved PCR-based detection of *Vibrio cholerae* and *Vibrio vulnificus* from estuarine water and plankton. *J. Appl. Microbiol.* **110**: 1470-1475
- Marino, A.; L. Lombardo; C. Fiorentino; B. Orlandella; L. Monticelli; A. Nostro and V. Alonzo (2005). Uptake of *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae* non-O1 and *Enterococcus durans* by, and depuration of mussels (*Mytilus galloprovincialis*). *Int. J. Food Microbiol.* **99**(3): 281-286.
- Markoulatos, P.; N. Siafakas and M. Moncany (2002). Multiplex polymerase chain reaction: a practical approach. *J. Clin. Lab. Anal.* **16**(1): 47-51.
- Martinelli, J. E.; R. M. Lopes; I. N. G. Rivera and R. R. Colwell (2011). *Vibrio cholerae* O1 detection in estuarine and coastal zooplankton. *J. Plankton Res.* **33**(1): 51-62.
- Maruo, K.; T. Akaike; T. Ono and H. Maeda (1998). Involvement of bradykinin generation in intravascular dissemination of *Vibrio vulnificus* and prevention of invasion by a bradykinin antagonist. *Infect. Immunity* **66**(2): 866-869.
- McLaughlin, J. B.; A. DePaola; C. A. Bopp; K. A. Martinek; N. P. Napolilli; C. G. Allison; S. L. Murray; E. C. Thompson; M. M. Bird and J. P. Middaugh (2005). Outbreak of *Vibrio parahaemolyticus* gastroenteritis associated with Alaskan oysters. *N. Engl. J. Med.* **353**(14): 1463-1470.
- Mead, P. S.; L. Slutsker; V. Dietz; L. F. McCaig; J. S. Bresee; C. Shapiro; P. M. Griffin and R. V. Tauxe (1999). Food-related illness and death in the United States. *Emerg. Infect. Dis.* **5**(5): 607-625.
- Merkel, S. M.; S. Alexander; E. Zufall; J. D. Oliver and Y. M. Huet-Hudson (2001). Essential role for estrogen in protection against *Vibrio vulnificus*-induced endotoxic shock. *Infect. Immun.* **69**(10): 6119-6122.
- Mesquita, M. M. F. (1988). Effects of seawater contamination level and exposure period on the bacterial and viral accumulation and elimination processes by *Mytilus edulis*. *Water Science Technol.* **20**(11-12): 265-270.
- Messelhäuser, U.; J. Colditz; D. Tharigen; W. Kleih; C. Holler and 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.
- Messens, W.; L. Herman; L. De Zutter and M. Heyndrickx (2009). Multiple typing for the epidemiological study of contamination of broilers with thermotolerant *Campylobacter*. *Veterinary Microbiology* **138**(1-2): 120-131.
- Miyoshi, S. and S. Shinoda (1992). Activation mechanism of human Hageman factor-plasma kallikrein-kinin system by *Vibrio vulnificus* metalloprotease. *FEBS Lett.* **308**(3): 315-319.
- Morris, J. G., Jr. (2003). Cholera and other types of vibriosis: a story of human pandemics and oysters on the half shell. *Clin. Infect. Dis.* **37**(2): 272-280.

- Morrison, C. M.; A. E. Armstrong; S. Evans; R. M. Mild; C. J. Langdon and L. A. Joens (2011). Survival of *Salmonella* Newport in oysters. *Int. J. Food. Microbiol.* **148**(2): 93-98.
- Moss, J. and M. Vaughan (1979). Activation of adenylate cyclase by cholera toxin. *Annu. Rev. Biochem.* **48**: 581-600.
- Motes, M. L.; A. DePaola; D. W. Cook; J. E. Veazey; J. C. Hunsucker; W. E. Garthright; R. J. Blodgett and S. J. Chirtel (1998). Influence of water temperature and salinity on *Vibrio vulnificus* in Northern Gulf and Atlantic Coast oysters (*Crassostrea virginica*). *Appl. Environ. Microbiol.* **64**(4): 1459-1465.
- Muller, G. (1977). Nonagglutinable cholera vibrios (NAG) in sewage, riverwater, and seawater (author's transl). *Zentralbl. Bakteriolog. Orig. B.* **165**(5-6): 487-497.
- Munn, C. B. (1977). Vibriosis in fish and its control. *Aquaculture Res.* **8**(1): 11-15.
- Murphree, R. L. and M. L. Tamplin (1995). Uptake and retention of *Vibrio cholerae* O1 in the Eastern Oyster, *Crassostrea virginica*. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**(10): 3656-3660.
- Myers, M. L.; G. Panicker and A. K. Bej (2003). PCR detection of a newly emerged pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 pathogen in pure cultures and seeded waters from the Gulf of Mexico. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**(4): 2194-2200.
- Nair, G. B.; T. Ramamurthy; S. K. Bhattacharya; B. Dutta; Y. Takeda and D. A. Sack (2007). Global dissemination of *Vibrio parahaemolyticus* serotype O3:K6 and its serovariants. *Clin. Microbiol. Rev.* **20**(1): 39-48.
- Nalin, D. R.; V. Daya; A. Reid; M. M. Levine and L. Cisneros (1979). Adsorption and growth of *Vibrio cholerae* on chitin. *Infect. Immun.* **25**(2): 768-770.
- Neifer, J. (2012). *Vibrio cholerae* Infektion. Persönliche Kommunikation (01.08.2012)
- Nguyen, B. M.; J. H. Lee; N. T. Cuong; S. Y. Choi; N. T. Hien; D. D. Anh; H. R. Lee; M. Ansaruzzaman; H. P. Endtz; J. Chun; A. L. Lopez; C. Czerkinsky; J. D. Clemens and D. W. Kim (2009). Cholera outbreaks caused by an altered *Vibrio cholerae* O1 El Tor biotype strain producing classical cholera toxin B in Vietnam in 2007 to 2008. *J. Clin. Microbiol.* **47**(5): 1568-1571.
- Nigro, O. D.; A. Hou; G. Vithanage; R. S. Fujioka and G. F. Steward (2011). Temporal and spatial variability in culturable pathogenic *Vibrio* spp. in lake Pontchartrain, Louisiana, USA, following hurricanes Katrina and Rita. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**(15): 5384-5393
- Nishibuchi, M. and J. B. Kaper (1995). Thermostable direct hemolysin gene of *Vibrio parahaemolyticus*: a virulence gene acquired by a marine bacterium. *Infect. Immun.* **63**(6): 2093-2099.
- Oberbeckmann, S.; A. Wichels; K. H. Wiltshire and G. Gerdtz (2011). Occurrence of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio alginolyticus* in the German Bight over a seasonal cycle. *Antonie Van Leeuwenhoek Int. J. Gen. Mol. Microbiol.* **100**(2): 291-307.

- Ogg, J. E.; R. A. Ryder and H. L. Smith, Jr. (1989). Isolation of *Vibrio cholerae* from aquatic birds in Colorado and Utah. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**(1): 95-99.
- Okuda, J.; M. Ishibashi; E. Hayakawa; T. Nishino; Y. Takeda; A. K. Mukhopadhyay; S. Garg; S. K. Bhattacharya; G. B. Nair and M. Nishibuchi (1997). Emergence of a unique O3:K6 clone of *Vibrio parahaemolyticus* in Calcutta, India, and isolation of strains from the same clonal group from Southeast Asian travelers arriving in Japan. *J. Clin. Microbiol.* **35**(12): 3150-3155.
- Oliver, J. D. (1981). Lethal cold stress of *Vibrio vulnificus* in oysters. *Appl. Environ. Microbiol.* **41**(3): 710-717.
- Paludan-Muller, C.; D. Weichart; D. McDougald and S. Kjelleberg (1996). Analysis of starvation conditions that allow for prolonged culturability of *Vibrio vulnificus* at low temperature. *Microbiol.* **142**(7): 1675-1684.
- Park, S. D.; H. S. Shon and N. J. Joh (1991). *Vibrio vulnificus* septicemia in Korea: clinical and epidemiologic findings in seventy patients. *J. Am. Acad. Dermatol.* **24**(3): 397-403.
- Pascual, M.; X. Rodo; S. P. Ellner; R. Colwell and M. J. Bouma (2000). Cholera dynamics and El Niño-Southern Oscillation. *Science* **289**(5485): 1766-1769.
- Powell, J. L. (1999). *Vibrio* species. *Clinics Lab. Med.* **19**(3): 537.
- Pruzzo, C.; G. Gallo and L. Canesi (2005). Persistence of vibrios in marine bivalves: the role of interactions with haemolymph components. *Environ. Microbiol.* **7**(6): 761-772.
- Raissy, M.; H. Momtaz; M. Moumeni; M. Ansari and E. Rahimi (2011). Molecular detection of *Vibrio* spp. in lobster hemolymph. *African J. Microbiol. Res.* **5**(13): 1697-1700.
- Ramdohr, S.; A. Wehrmann; A. Markert; G. Ackermann; M. Schweizer; G. Millat; M. Poelmann and E. Bartelt (2010). Pathogene Vibrionen in der marinen Umwelt. *Pathogene Vibrionen in der marinen Umwelt. Koblenz, B. f. Gewässerkunde.* **3/2010**: 1-60.
- Ramdohr, S.; A. Wehrmann; A. Markert; G. Ackermann; M. Schweizer; G. Millat; M. Poelmann and E. Bartelt (2012). Pathogenic *Vibrio* spp. in northern European waters. International Symposium, 31 May - 1 June 2012 in Koblenz. *B. f. Gewässerkunde. Koblenz, B. f. Verkehr Bau Stadtentwicklung.* **4/2012**: 1-80.
- Randt, S.; Huehn, S.; Strauch, E.; Herrfurth, D.; Götz, G.; Alter, T. (2010). Untersuchungen zur mikrobiologischen Qualität von Muscheln unter besonderer Berücksichtigung der *Campylobacter* spp.- und *Vibrio* spp.-Population. 51. Arbeitstagung des Arbeitsgebiets Lebensmittelhygiene, Garmisch-Partenkirchen, Germany, 2010
- Randt, S.; Huehn, S.; Herrfurth, D.; Pund, R.; Strauch, E. and Alter T. (2011). Die lebensmittelhygienische Bedeutung des Vorkommens von Vibrionen in Muscheln. *RFL* **63**: 93-96.
- Rasheed, V. (1989). Vibriosis Outbreak among cultured seabream (*Acanthopagrus Cuvieri*) broodstock in Kuwait. *Aquaculture* **76**(3-4): 189-197.

- Ray, B.; S. M. Hawkins and C. R. Hackney (1978). Method for the detection of injured *Vibrio parahaemolyticus* in seafoods. *Appl. Environ. Microbiol.* **35**(6): 1121-1127.
- Reilly, G. D.; C. A. Reilly; E. G. Smith and C. Baker-Austin (2011). *Vibrio alginolyticus*-associated wound infection acquired in British waters, Guernsey, July 2011. *Euro. Surveill.* **16**(42):19994.
- Reily, L. A. and C. R. Hackney (1985). Survival of *Vibrio cholerae* during cold-storage in artificially contaminated seafoods. *J. Food Science* **50**(3): 838-839.
- Rhodes, J. B.; D. Schweitzer and J. E. Ogg (1985). Isolation of non-O1 *Vibrio cholerae* associated with enteric disease of herbivores in western Colorado. *J. Clin. Microbiol.* **22**(4): 572-575.
- Riisgard, H. U. (1988). Efficiency of particle retention and filtration-rate in 6 species of northeast American bivalves. *Mar. Ecol. Prog. Series* **45**(3): 217-223.
- Riisgard, H. U.; J. Lassen and C. Kittner (2006). Valve-gape response times in mussels (*Mytilus edulis*) - Effects of laboratory preceding-feeding conditions and in situ tidally induced variation in phytoplankton biomass. *J. Shellfish Res.* **25**(3): 901-911.
- Ripabelli, G.; M. L. Sammarco; G. M. Grasso; I. Fanelli; A. Caprioli and I. Luzzi (1999). Occurrence of *Vibrio* and other pathogenic bacteria in *Mytilus galloprovincialis* (mussels) harvested from Adriatic Sea, Italy. *Int. J. Food Microbiol.* **49**(1-2): 43-48.
- Rivera, I. N.; E. K. Lipp; A. Gil; N. Choopun; A. Huq and 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.
- Rivera, I. N. G.; J. Chun; A. Huq; R. B. Sack and R. R. Colwell (2001). Genotypes associated with virulence in environmental isolates of *Vibrio cholerae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**(6): 2421-2429.
- RKI (2004) Epidemiologisches Bulletin. Aktuelle Daten und Informationen zu Infektionskrankheiten und Public Health. **13/2004**: 106-112.
- RKI (2006a) Epidemiologisches Bulletin. Zur Situation bei wichtigen Infektionskrankheiten in Deutschland. Rückblick auf die Influenza-Saison 2005/06. **34/2006**: 292-298.
- RKI (2006b) Epidemiologisches Bulletin. Aktuelle Daten und Informationen zu Infektionskrankheiten und Public Health. **32/2006**: 272-280.
- RKI (2010) Epidemiologisches Bulletin. Zur Situation bei wichtigen Infektionskrankheiten in Deutschland - Reiseassoziierte Infektionskrankheiten 2009. **38/2010**: 379-390 .
- RKI (2011) Epidemiologisches Bulletin. Zur Situation bei wichtigen Infektionskrankheiten in Deutschland - Reiseassoziierte Infektionskrankheiten 2010. **41/2011**: 371-382.
- RKI (2012a) Epidemiologisches Bulletin. Aktuelle Daten und Informationen zu Infektionskrankheiten und Public Health. **43/2012**: 429-440.

- RKI (2012b). Informationsbroschüre zu Nicht-Cholera-Vibrionen in Deutschland. Robert Koch-Institut (RKI). 1-11.
- Rodrigues, D. P.; R. V. Ribeiro and E. Hofer (1992). Analysis of some virulence factors of *Vibrio vulnificus* isolated from Rio-De-Janeiro, Brazil. *Epidemiology and Infection* **108**(3): 463-467.
- Rosche, T. M.; E. A. Binder and J. D. Oliver (2010). *Vibrio vulnificus* genome suggests two distinct ecotypes. *Environ. Microbiol. Rep.* **2**(1): 128-132.
- Ruppert, J.; B. Panzig; L. Guertler; P. Hinz; G. Schwesinger; S. B. Felix and S. Friesecke (2004). Two cases of severe sepsis due to *Vibrio vulnificus* wound infection acquired in the Baltic Sea. *Europ. J. Clinical Microbiol. & Infect. Dis.* **23**(12): 912-915.
- Sacks, J. J. and S. H. Lieb (1986). Flies and Campylobacter - Reply. *American J. Public Health* **76**(12): 1457-1457.
- Saeed, M. O. (1995). Association of *Vibrio harveyi* with mortalities in cultured marine fish in Kuwait. *Aquaculture* **136**(1-2): 21-29.
- Sangster, C. R. and R. M. Smolowitz (2003). Description of *Vibrio alginolyticus* infection in cultured *Sepia officinalis*, *Sepia apama*, and *Sepia pharaonis*. *Biological Bulletin* **205**(2): 233-234.
- Schets, C. (2012). Pathogenic *Vibrio* spp. in northern European waters. International Symposium, 31 May - 1 June 2012 in Koblenz. B. f. Gewässerkunde. Koblenz, Bundesministerium für Verkehr, Bau und Stadtentwicklung. **4/2012**: 18-21.
- Schmid-Hempel, P. and S. A. Frank (2007). Pathogenesis, virulence, and infective dose. *PLoS Pathog.* **3**(10): 1372-1373.
- Senderovich, Y.; I. Izhaki and M. Halpern (2010). Fish as reservoirs and vectors of *Vibrio cholerae*. *PLoS One* **5**(1): e8607.
- Sharon, G. and E. Rosenberg (2010). Healthy corals maintain *Vibrio* in the VBNC state. *Environ. Microbiol. Rep.* **2**(1): 116-119.
- Shen, X.; Y. Cai; C. Liu; W. Liu; Y. Hui and Y. C. Su (2009). Effect of temperature on uptake and survival of *Vibrio parahaemolyticus* in oysters (*Crassostrea plicatula*). *Int. J. Food Microbiol.* **136**(1): 129-132.
- Shikuma, N. J. and M. G. Hadfield (2010). Marine biofilms on submerged surfaces are a reservoir for *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae*. *Biofouling* **26**(1): 39-46.
- Sieffert, M. and A. Stolle (2002). Nachweis und Differenzierung von *Vibrio* spp. in Krusten- und Schalentieren. *Bundesgesundheitsbl. – Gesundheitsforsch. - Gesundheitsschutz* **45**(6): 507-513.
- Simonson, J. G. and R. J. Siebeling (1993). Immunogenicity of *Vibrio vulnificus* capsular polysaccharides and polysaccharide-protein conjugates. *Infect. Immun.* **61**(5): 2053-2058.

- Sizemore, R. K.; R. R. Colwell; H. S. Tubiash and T. E. Lovelace (1975). Bacterial flora of the hemolymph of the blue crab, *Callinectes sapidus*: numerical taxonomy. *Appl. Microbiol.* **29**(3): 393-399.
- Stark, K.; M. Niedrig; W. Biederbick; H. Merkert and J. Hacker (2009). Die Auswirkungen des Klimawandels. Welche neuen Infektionskrankheiten und gesundheitlichen Probleme sind zu erwarten? *Bundesgesundheitsbl. – Gesundheitsforsch. - Gesundheitsschutz* **52**: 699-714.
- Stroehrer, U. H.; L. E. Karageorgos; R. Morona and P. A. Manning (1992). Serotype conversion in *Vibrio cholerae* O1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**(7): 2566-2570.
- Strom, M. S. and R. N. Paranjpye (2000). Epidemiology and pathogenesis of *Vibrio vulnificus*. *Microbes Infect.* **2**(2): 177-188.
- Su, Y. C.; J. Duan and W. H. Wu (2005). Selectivity and specificity of a chromogenic medium for detecting *Vibrio parahaemolyticus*. *J. Food Prot.* **68**(7): 1454-1456.
- Su, Y. C. and C. Liu (2007). *Vibrio parahaemolyticus*: a concern of seafood safety. *Food Microbiol.* **24**(6): 549-558.
- Su, Y. C.; Q. Yang and C. Hase (2010). Refrigerated seawater depuration for reducing *Vibrio parahaemolyticus* contamination in pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *J. Food Prot.* **73**(6): 1111-1115.
- Sumner, J. and T. Ross (2002). A semi-quantitative seafood safety risk assessment. *Int. J. Food Microbiol.* **77**(1-2): 55-59.
- Tacket, C. O.; F. Brenner and P. A. Blake (1984). Clinical features and an epidemiological study of *Vibrio vulnificus* infections. *J. Infect. Dis.* **149**(4): 558-561.
- Tamplin, M. L. and G. M. Capers (1992). Persistence of *Vibrio vulnificus* in tissues of Gulf Coast oysters, *Crassostrea virginica*, exposed to seawater disinfected with UV light. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**(5): 1506-1510.
- Tao, Z.; S. Bullard and C. Arias (2011). High numbers of *Vibrio vulnificus* in Tar Balls collected from oiled areas of the north-central Gulf of Mexico following the 2010 BP Deepwater Horizon oil spill. *Ecohealth* **8**(4): 507-511.
- Tarr, C. L.; J. S. Patel; N. D. Pühr; E. G. Sowers; C. A. Bopp and N. A. Strockbine (2007). Identification of *Vibrio* isolates by a multiplex PCR assay and *rpoB* sequence determination. *J. Clin. Microbiol.* **45**(1): 134-140.
- Tena, D.; M. Arias; B. T. Alvarez; C. Mauleon; M. P. Jimenez and J. Bisquert (2010). Fulminant necrotizing fasciitis due to *Vibrio parahaemolyticus*. *J. Med. Microbiol.* **59**(2): 235-238.
- Thaithongnum, S.; P. Ratanama; K. Weeradechapol; A. Sukhoom and V. Vuddhakul (2006). Detection of *Vibrio harveyi* in shrimp postlarvae and hatchery tank water by the Most Probable Number technique with PCR. *Aquaculture* **261**(1): 1-9.

- Theede, H. and J. Lassig (1967). Comparative studies on cellular resistance of bivalves from marine and brackish waters. *Helgoland Mar. Res.* **16**(1): 119-129.
- Thom, S.; D. Warhurst and B. S. Drasar (1992). Association of *Vibrio cholerae* with Fresh-Water Amebas. *J. Med. Microbiol.* **36**(5): 303-306.
- Thompson, C. C.; A. C. Vicente; R. C. Souza; A. T. Vasconcelos; T. Vesth; N. Alves, Jr.; D. W. Ussery; T. Iida and F. L. Thompson (2009). Genomic taxonomy of vibrios. *BMC Evol. Biol.* **9**: 258.
- Thompson, R. J. and B. L. Bayne (1972). Active metabolism associated with feeding in the mussel *Mytilus edulis* L. *J. exp. mar. Biol. Ecol.* **9**: 111-124.
- Töbe, K.; E. A. Smith; S. Gallacher and L. K. Medlin (2004). Detection of bacteria originally isolated from *Alexandrium* spp. in the midgut diverticula of *Mytilus edulis* after water-borne exposure. *Harmful Algae* **3**(1): 61-69.
- Toranzo, A. E.; B. Magarinos and J. L. Romalde (2005). A review of the main bacterial fish diseases in mariculture systems. *Aquaculture* **246**(1-4): 37-61.
- Torres, L.; S. Escobar; A. I. Lopez; M. L. Marco and V. Pobo (2002). Wound infection due to *Vibrio vulnificus* in Spain. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **21**(7): 537-538.
- Tschäpe, H. (2000). Lebensmittelbedingte Infektionskrankheiten durch Bakterien. *Bundesgesundheitsbl. – Gesundheitsforsch. - Gesundheitsschutz* **43**(10): 758-769.
- Tubiash, H. S.; R. K. Sizemore and R. R. Colwell (1975). Bacterial flora of the hemolymph of the Blue Crab, *Callinectes sapidus*: most probable numbers. *Appl. Microbiol.* **29**(3): 388-392.
- UBA (2012). Klimaänderung, Umweltbundesamt. <http://www.umweltbundesamt-daten-zur-umwelt.de/umweltdaten/public/theme.do?nodeIdent=2845>
- Vanderzant, C. and R. Nickelson (1972). Survival of *Vibrio parahaemolyticus* in shrimp tissue under various environmental conditions. *Appl. Microbiol.* **23**(1): 34-37.
- Vasudevan, P.; P. Marek; S. Daigle; T. Hoagland and K. S. Venkitanarayanan (2002). Effect of chilling and freezing on survival of *Vibrio parahaemolyticus* on fish fillets. *J. Food Safety* **22**(4): 209-217.
- Vaughan, M. and J. Moss (1978). Mechanism of action of cholera toxin. *J. Supramol. Struct.* **8**(4): 473-488.
- Velazquez-Roman, J.; N. Leon-Sicairos; H. Flores-Villasenor; S. Villafana-Rauda and A. Canizalez-Roman (2012). Association of pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 present in the coastal environment of northwest Mexico with cases of recurrent diarrhea between 2004 and 2010. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**(6): 1794-1803.
- Vezzulli, L.; E. Pezzati; M. Moreno; M. Fabiano; L. Pane and C. Pruzzo (2009). Benthic ecology of *Vibrio* spp. and pathogenic *Vibrio* species in a coastal Mediterranean environment (La Spezia Gulf, Italy). *Microb. Ecol.* **58**(4): 808-818.



- Vezzulli, L.; C. Pruzzo; A. Huq and R. R. Colwell (2010). Environmental reservoirs of *Vibrio cholerae* and their role in cholera. *Environ. Microbiol. Rep.* **2**(1): 27-33.
- Wallet, F.; M. Tachon; S. Nseir; R. J. Courcol and M. Roussel-Delvallez (2005). *Vibrio metschnikovii* pneumonia. *Emerg. Infect. Dis.* **11**(10): 1641-1642.
- Wang, D.; S. Yu; W. Chen; D. Zhang and X. Shi (2010). Enumeration of *Vibrio parahaemolyticus* in oyster tissues following artificial contamination and depuration. *Lett. Appl. Microbiol.* **51**(1): 104-108.
- Warner, E. and J. D. Oliver (2008). Population structures of two genotypes of *Vibrio vulnificus* in oysters (*Crassostrea virginica*) and seawater. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**(1): 80-85.
- Warnock, E. W., 3<sup>rd</sup> and T. L. MacMath (1993). Primary *Vibrio vulnificus* septicemia. *J. Emerg. Med.* **11**(2): 153-156.
- Watanabe, H.; S. Miyoshi; T. Kawase; K. Tomochika and S. Shinoda (2004). High growing ability of *Vibrio vulnificus* biotype 1 is essential for production of a toxic metalloprotease causing systemic diseases in humans. *Microb. Pathog.* **36**(3): 117-123.
- Webb, J. L. A. (2011). Africa in the Time of cholera: a history of pandemics from 1817 to the present. *J. African Hist.* **52**(3): 412-414.
- Weichart, D. and S. Kjelleberg (1996). Stress resistance and recovery potential of culturable and viable but nonculturable cells of *Vibrio vulnificus*. *Microbiol.* **142**(4): 845-853.
- West, B. C.; R. Silberman and W. N. Otterson (1998). Acalculous cholecystitis and septicemia caused by non-O1 *Vibrio cholerae*: first reported case and review of biliary infections with *Vibrio cholerae*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **30**(3): 187-191.
- WHO (2012). Weekly epidemiological record. 3 August 2012, **31-32**: 290
- WHO (2011a). Cholera outbreaks in the Democratic Republic of Congo (DRC) and the Republic of Congo. World Health Organization.
- WHO (2011b). Global Alert and Response (GAR). World Health Organization.
- WHO (2011c). Cholera. Fact sheet No°107. World Health Organization.
- WHO (2011d). Weekly epidemiological record. 29 July 2011, **31**: 326
- WHO (2010). Weekly epidemiological record. 30 July 2010, **31**: 294
- WHO (2009). Weekly epidemiological record. 31 July 2009, **31**: 310
- Widdows, J.; P. Fieth and C. M. Worrall (1979). Relationships between seston, available food and feeding activity in the common mussel *Mytilus edulis*. *Mar. Biol.* **50**(3): 195-207.
- Williams, N. A. (2000). Immune modulation by the cholera-like enterotoxin B-subunits: from adjuvant to immunotherapeutic. *Int. J. Med. Microbiol.* **290**(4-5): 447-453.

Winter, J. E. (1978). A review on the knowledge of suspension-feeding in lamellibranchiate bivalves, with special reference to artificial aquaculture systems. *Aquaculture* **13**(1): 1-33.

Wong, H. C. and P. Wang (2004). Induction of viable but nonculturable state in *Vibrio parahaemolyticus* and its susceptibility to environmental stresses. *J. Appl. Microbiol.* **96**(2): 359-366.

Wright, A. C.; R. T. Hill; J. A. Johnson; M. C. Roghman; R. R. Colwell and J. G. Morris, Jr. (1996). Distribution of *Vibrio vulnificus* in the Chesapeake Bay. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**(2): 717-724.

Yamasaki, S.; S. Garg; G. B. Nair and 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.

Yue, X.; B. Z. Liu and L. Sun (2011). Isolation and characterization of a virulent *Vibrio* sp. bacterium from clams (*Meretrix meretrix*) with mass mortality. *J. Invertebrate Pathol.* **106**(2): 242-249.

## 10 Anhang

### 10.1 *Vibrio* spp.-Zellzahlen

**Tabelle 24: Mittelwert-Zellzahlen von *Vibrio* spp während der Kontamination**

Mittelwerte der Zellzahlen von *Vibrio* spp. in den verschiedenen Probensegmenten von *M. edulis* während der 24-stündigen Kontamination in den Kontaminationsversuchen

<i>Vibrio</i> spp.	MW Probensegment	Zeit	0h	1,5h	3h	4,5h	6h	24h
<i>V. cholerae</i>	MDD	nd		$5,0 \times 10^8$	$5,1 \times 10^8$	$4,1 \times 10^8$	$5,3 \times 10^7$	$1,1 \times 10^7$
	MR	nd		$5,5 \times 10^7$	$2,8 \times 10^7$	$4,5 \times 10^6$	$2,8 \times 10^8$	$8,0 \times 10^5$
	MLW	nd		$2,9 \times 10^6$	$4,3 \times 10^6$	$2,9 \times 10^7$	$5,3 \times 10^7$	$1,1 \times 10^6$
	TW-K	nd		$5,3 \times 10^6$	$4,4 \times 10^6$	$1,4 \times 10^6$	$3,1 \times 10^7$	$6,8 \times 10^6$
<i>V. parahaemolyticus</i>	MDD	nd		$6,0 \times 10^9$	$2,0 \times 10^9$	$1,5 \times 10^9$	$3,1 \times 10^9$	$1,8 \times 10^7$
	MR	nd		$2,8 \times 10^7$	$8,8 \times 10^7$	$5,3 \times 10^7$	$3,1 \times 10^8$	$6,1 \times 10^6$
	MLW	nd		$3,8 \times 10^7$	$1,0 \times 10^7$	$2,9 \times 10^8$	$3,9 \times 10^7$	$7,0 \times 10^6$
	TW-K	nd		$5,1 \times 10^8$	$1,1 \times 10^7$	$3,0 \times 10^7$	$8,3 \times 10^6$	$2,6 \times 10^6$
<i>V. vulnificus</i>	MDD	nd		$3,9 \times 10^8$	$5,0 \times 10^7$	$2,3 \times 10^7$	$2,8 \times 10^6$	$2,8 \times 10^6$
	MR	nd		$1,6 \times 10^6$	$3,9 \times 10^6$	$1,3 \times 10^6$	$4,1 \times 10^5$	$3,6 \times 10^4$
	MLW	nd		$8,0 \times 10^5$	$8,5 \times 10^5$	$6,3 \times 10^5$	$7,0 \times 10^4$	$1,6 \times 10^4$
	TW-K	nd		$7,5 \times 10^5$	$4,5 \times 10^5$	$3,1 \times 10^4$	$8,5 \times 10^3$	$5,5 \times 10^3$

MW Probensegment: Mittelwert der *Vibrio* Zellzahlen in den einzelnen Probensegmenten

MDD: Mitteldarmdrüsen; MR: Muschel-Gewebe-Reste; TW-K: Tankwasser Kontaminationsbecken; TW-H: Tankwasser Hälterungsbecken; MLW: Muschel-Lumen-Wässer

nd: keine *Vibrio* spp. detektiert

**Tabelle 25: Mittelwert-Zellzahlen von *Vibrio* spp. während der Hälterungsversuche**Mittelwerte der Zellzahlen von *Vibrio* spp. in den verschiedenen Probensegmenten von *M. edulis* während der sieben bis neun-tägigen Hälterungsversuche

Vibrio spp.	Zeit MW P	0h	24h	25,5h	27h	28,5h	30h	36h	48h	72h	96h	120h	144h	168h	192h
		<i>V. c.</i>	MDD	nd	4,3x10 <sup>7</sup>	4,3x10 <sup>7</sup>	5,0x10 <sup>7</sup>	1,6x10 <sup>7</sup>	6,1x10 <sup>6</sup>	8,0x10 <sup>5</sup>	5,8x10 <sup>6</sup>	3,1x10 <sup>5</sup>	3,9x10 <sup>5</sup>	7,0x10 <sup>3</sup>	2,8x10 <sup>3</sup>
	MR	nd	4,3x10 <sup>6</sup>	3,1x10 <sup>6</sup>	3,1x10 <sup>6</sup>	8,0x10 <sup>5</sup>	9,3x10 <sup>4</sup>	5,8x10 <sup>4</sup>	4,1x10 <sup>4</sup>	1,4x10 <sup>4</sup>	4,0x10 <sup>3</sup>	1,5x10 <sup>3</sup>	1,0x10 <sup>3</sup>	7,0x10 <sup>3</sup>	< 10 <sup>3</sup>
	TW-K	nd	1,8x10 <sup>6</sup>	nm	nm	nm	nm	nm	nm	nm	nm	nm	nm	nm	nm
	TW-H	nd	nd	5,3x10 <sup>4</sup>	5,9x10 <sup>4</sup>	1,3x10 <sup>4</sup>	1,4x10 <sup>4</sup>	3,9x10 <sup>4</sup>	4,3x10 <sup>3</sup>	2,0x10 <sup>3</sup>	< 10 <sup>3</sup>	< 10 <sup>3</sup>	< 10 <sup>3</sup>	< 10 <sup>3</sup>	< 10 <sup>3</sup>
	MLW	nd	6,8x10 <sup>6</sup>	6,3x10 <sup>5</sup>	1,6x10 <sup>5</sup>	1,3x10 <sup>7</sup>	3,1x10 <sup>5</sup>	9,4x10 <sup>4</sup>	8,3x10 <sup>4</sup>	7,5x10 <sup>3</sup>	4,8x10 <sup>3</sup>	4,0x10 <sup>3</sup>	1,0x10 <sup>3</sup>	< 10 <sup>3</sup>	< 10 <sup>3</sup>
<i>V. p.</i>	MDD	nd	1,9x10 <sup>7</sup>	5,5x10 <sup>6</sup>	5,0x10 <sup>6</sup>	3,1x10 <sup>6</sup>	3,8x10 <sup>6</sup>	4,8x10 <sup>5</sup>	2,0x10 <sup>5</sup>	4,1x10 <sup>5</sup>	1,1x10 <sup>5</sup>	2,8x10 <sup>5</sup>	7,3x10 <sup>3</sup>	2,0x10 <sup>3</sup>	4,3x10 <sup>3</sup>
	MR	nd	3,5x10 <sup>6</sup>	1,8x10 <sup>5</sup>	4,1x10 <sup>5</sup>	1,4x10 <sup>5</sup>	1,4x10 <sup>5</sup>	6,7x10 <sup>4</sup>	2,1x10 <sup>4</sup>	1,8x10 <sup>6</sup>	1,1x10 <sup>4</sup>	2,5x10 <sup>3</sup>	1,5x10 <sup>3</sup>	< 10 <sup>3</sup>	< 10 <sup>3</sup>
	TW-K	nd	3,8x10 <sup>5</sup>	nm	nm	nm	nm	nm	nm	nm	nm	nm	nm	nm	nm
	TW-H	nd	nd	4,5x10 <sup>3</sup>	8,5x10 <sup>3</sup>	1,1x10 <sup>4</sup>	6,0x10 <sup>3</sup>	4,3x10 <sup>3</sup>	1,0x10 <sup>3</sup>	< 10 <sup>3</sup>	< 10 <sup>3</sup>	< 10 <sup>3</sup>	< 10 <sup>3</sup>	< 10 <sup>3</sup>	< 10 <sup>3</sup>
	MLW	nd	3,4x10 <sup>6</sup>	2,9x10 <sup>5</sup>	8,0x10 <sup>4</sup>	1,3x10 <sup>5</sup>	1,0x10 <sup>5</sup>	3,8x10 <sup>5</sup>	2,4x10 <sup>4</sup>	1,3x10 <sup>4</sup>	5,8x10 <sup>3</sup>	4,0x10 <sup>3</sup>	2,3x10 <sup>3</sup>	1,0x10 <sup>3</sup>	< 10 <sup>3</sup>
<i>V. v.</i>	MDD	nd	6,8x10 <sup>7</sup>	nm	8,8x10 <sup>7</sup>	nm	4,0x10 <sup>7</sup>	7,0x10 <sup>6</sup>	5,0x10 <sup>6</sup>	1,1x10 <sup>7</sup>	2,5x10 <sup>5</sup>	2,0x10 <sup>4</sup>	4,2x10 <sup>4</sup>	4,0x10 <sup>4</sup>	1,3x10 <sup>4</sup>
	MR	nd	2,0x10 <sup>7</sup>	nm	5,5x10 <sup>6</sup>	nm	1,7x10 <sup>6</sup>	8,0x10 <sup>5</sup>	1,0x10 <sup>6</sup>	1,5x10 <sup>5</sup>	3,4x10 <sup>4</sup>	1,2x10 <sup>4</sup>	2,8x10 <sup>4</sup>	1,3x10 <sup>4</sup>	2,5x10 <sup>2</sup>
	TW-K	nd	8,0x10 <sup>5</sup>	nm	nm	nm	nm	nm	nm	nm	nm	nm	nm	nm	nm
	TW-H	nd	nd	nm	6,5x10 <sup>4</sup>	nm	1,3x10 <sup>4</sup>	1,6x10 <sup>4</sup>	5,5x10 <sup>3</sup>	7,3x10 <sup>2</sup>	3,0x10 <sup>2</sup>	1,0x10 <sup>2</sup>	< 10 <sup>2</sup>	< 10 <sup>2</sup>	< 10 <sup>2</sup>
	MLW	nd	2,6x10 <sup>6</sup>	nm	9,3x10 <sup>5</sup>	nm	2,8x10 <sup>6</sup>	2,1x10 <sup>5</sup>	1,3x10 <sup>6</sup>	3,0x10 <sup>5</sup>	1,6x10 <sup>4</sup>	3,1x10 <sup>4</sup>	1,3x10 <sup>4</sup>	6,0x10 <sup>3</sup>	2,0x10 <sup>3</sup>

Vibrio spp.	Zeit MW P	116h	140h
		<i>V. v.</i>	MDD
	MR	5,5x10 <sup>2</sup>	5,8x10 <sup>2</sup>
	TW-K	< 10 <sup>2</sup>	< 10 <sup>2</sup>
	TW-H	< 10 <sup>2</sup>	< 10 <sup>2</sup>
	MLW	2,0x10 <sup>2</sup>	2,5x10 <sup>2</sup>

MW P: Mittelwert der *Vibrio*-Zellzahlen in den einzelnen Probensegmenten

MDD: Mitteldarmdrüsen; MR: Muschel-Gewebe-Reste; TW-K: Tankwasser Kontaminationsbecken; TW-H: Tankwasser Hälterungsbecken; MLW: Muschel-Lumen-Wässer

nd: keine *Vibrio* spp. detektiert

nm: nicht gemessen

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

**Tabelle 26: Mittelwert-Zellzahlen von *Vibrio* spp. während der Lagerungsversuche**Mittelwerte der Zellzahlen von *Vibrio* spp. in den verschiedenen Probensegmenten von *M. edulis* während der 10-tägigen Lagerungsversuche

<i>Vibrio</i> <i>spp.</i>	<i>MWP</i>	<i>Zeit</i>	<i>-24h</i>	<i>0d</i>	<i>1d</i>	<i>2d</i>	<i>3d</i>	<i>4d</i>	<i>5d</i>	<i>6d</i>	<i>7d</i>	<i>8d</i>	<i>9d</i>	<i>10d</i>	
<i>V. c.</i>	MDD	nd		7,5x10 <sup>6</sup>											
	MR	nd		2,6x10 <sup>7</sup>											
	TW-K	nd		7,5x10 <sup>5</sup>											
	MLW	nd		2,6x10 <sup>6</sup>											
	MDD V+3°C	nd			1,0x10 <sup>8</sup>	7,9x10 <sup>6</sup>	1,4x10 <sup>7</sup>	2,5x10 <sup>7</sup>	4,8x10 <sup>7</sup>	7,5x10 <sup>6</sup>	6,3x10 <sup>6</sup>	5,8x10 <sup>6</sup>	8,3x10 <sup>6</sup>	2,0x10 <sup>7</sup>	
	MR V+3°C	nd			3,4x10 <sup>6</sup>	3,6x10 <sup>6</sup>	1,9x10 <sup>6</sup>	5,5x10 <sup>5</sup>	4,4x10 <sup>6</sup>	1,1x10 <sup>6</sup>	4,4x10 <sup>5</sup>	9,3x10 <sup>5</sup>	5,6x10 <sup>5</sup>	1,1x10 <sup>6</sup>	
	ASW V+3°C	nd			3,4x10 <sup>5</sup>	9,5x10 <sup>5</sup>	3,8x10 <sup>5</sup>	8,0x10 <sup>5</sup>	1,5x10 <sup>5</sup>	3,4x10 <sup>5</sup>	1,1x10 <sup>5</sup>	4,3x10 <sup>5</sup>	3,4x10 <sup>5</sup>	2,9x10 <sup>6</sup>	
	MLW V+3°C	nd			5,5x10 <sup>5</sup>	5,0x10 <sup>5</sup>	2,8x10 <sup>6</sup>	3,0x10 <sup>5</sup>	2,0x10 <sup>5</sup>	1,0x10 <sup>5</sup>	7,5x10 <sup>5</sup>	5,0x10 <sup>4</sup>	1,3x10 <sup>5</sup>	1,3x10 <sup>5</sup>	
	MDD J+3°C	nd			3,7x10 <sup>7</sup>	2,3x10 <sup>7</sup>	1,1x10 <sup>7</sup>	1,3x10 <sup>5</sup>	2,3x10 <sup>7</sup>	2,9x10 <sup>7</sup>	6,6x10 <sup>6</sup>	6,8x10 <sup>6</sup>	3,8x10 <sup>5</sup>	5,3x10 <sup>6</sup>	
	MR J+3°C	nd			4,9x10 <sup>6</sup>	5,8x10 <sup>6</sup>	6,8x10 <sup>6</sup>	2,5x10 <sup>6</sup>	3,7x10 <sup>6</sup>	4,6x10 <sup>6</sup>	3,1x10 <sup>6</sup>	1,0x10 <sup>6</sup>	5,5x10 <sup>5</sup>	1,5x10 <sup>6</sup>	
	MLW J+3°C	nd			3,0x10 <sup>5</sup>	6,0x10 <sup>5</sup>	4,5x10 <sup>5</sup>	5,0x10 <sup>5</sup>	5,3x10 <sup>6</sup>	5,3x10 <sup>6</sup>	1,0x10 <sup>5</sup>	8,5x10 <sup>5</sup>	1,8x10 <sup>6</sup>	1,5x10 <sup>5</sup>	
	MDD V+15°C	nd			6,3x10 <sup>6</sup>			1,8x10 <sup>8</sup>		1,4x10 <sup>6</sup>		7,8x10 <sup>7</sup>		4,4x10 <sup>6</sup>	
	MR V+15°C	nd			6,9x10 <sup>5</sup>			3,5x10 <sup>6</sup>		4,5x10 <sup>5</sup>		2,0x10 <sup>6</sup>		2,8x10 <sup>6</sup>	
	ASW V+15°C	nd			3,8x10 <sup>6</sup>			2,3x10 <sup>5</sup>		2,3x10 <sup>5</sup>		4,1x10 <sup>5</sup>		2,9x10 <sup>4</sup>	
	MLW V+15°C	nd			7,5x10 <sup>4</sup>			5,0x10 <sup>5</sup>		7,5x10 <sup>4</sup>		5,0x10 <sup>5</sup>		1,5x10 <sup>5</sup>	
	MDD J+15°C	nd			7,9x10 <sup>6</sup>			3,5x10 <sup>7</sup>		5,1x10 <sup>5</sup>		4,3x10 <sup>6</sup>		3,3x10 <sup>7</sup>	
	MR J+15°C	nd			3,0x10 <sup>5</sup>			7,3x10 <sup>6</sup>		9,5x10 <sup>5</sup>		5,8x10 <sup>6</sup>		1,4x10 <sup>7</sup>	
	MLW J+15°C	nd			7,5x10 <sup>5</sup>			5,0x10 <sup>6</sup>		5,5x10 <sup>5</sup>		7,5x10 <sup>5</sup>		< 10 <sup>3</sup>	
	<i>V. p.</i>	MDD	nd		1,8x10 <sup>7</sup>										
		MR	nd		6,1x10 <sup>6</sup>										
TW-K		nd		2,6x10 <sup>6</sup>											
MLW		nd		7,0x10 <sup>6</sup>											
MDD V+3°C		nd			4,5x10 <sup>6</sup>	1,6x10 <sup>7</sup>	5,6x10 <sup>8</sup>	4,5x10 <sup>7</sup>	1,0x10 <sup>7</sup>	2,8x10 <sup>6</sup>	3,8x10 <sup>8</sup>	5,3x10 <sup>6</sup>	1,5x10 <sup>5</sup>	2,1x10 <sup>6</sup>	
MR V+3°C		nd			4,0x10 <sup>6</sup>	6,0x10 <sup>6</sup>	1,4x10 <sup>6</sup>	1,6x10 <sup>6</sup>	1,1x10 <sup>6</sup>	7,1x10 <sup>6</sup>	3,1x10 <sup>6</sup>	5,5x10 <sup>6</sup>	7,5x10 <sup>5</sup>	5,3x10 <sup>5</sup>	
ASW V+3°C		nd			4,1x10 <sup>5</sup>	4,3x10 <sup>5</sup>	8,8x10 <sup>5</sup>	5,6x10 <sup>5</sup>	1,1x10 <sup>6</sup>	8,8x10 <sup>5</sup>	7,3x10 <sup>5</sup>	5,6x10 <sup>5</sup>	6,8x10 <sup>5</sup>	1,3x10 <sup>5</sup>	
MLW V+3°C		nd			6,3x10 <sup>5</sup>	4,8x10 <sup>5</sup>	7,0x10 <sup>6</sup>	1,0x10 <sup>6</sup>	8,3x10 <sup>5</sup>	6,0x10 <sup>5</sup>	1,1x10 <sup>6</sup>	8,3x10 <sup>5</sup>	4,4x10 <sup>5</sup>	2,9x10 <sup>5</sup>	
MDD J+3°C		nd			1,0x10 <sup>7</sup>	5,8x10 <sup>6</sup>	5,5x10 <sup>6</sup>	1,9x10 <sup>6</sup>	1,4x10 <sup>7</sup>	2,7x10 <sup>7</sup>	4,1x10 <sup>6</sup>	2,5x10 <sup>6</sup>	1,2x10 <sup>5</sup>	8,8x10 <sup>6</sup>	
MR J+3°C		nd			2,2x10 <sup>6</sup>	1,6x10 <sup>6</sup>	4,3x10 <sup>5</sup>	3,9x10 <sup>6</sup>	1,3x10 <sup>7</sup>	5,5x10 <sup>6</sup>	1,8x10 <sup>6</sup>	6,0x10 <sup>6</sup>	3,8x10 <sup>6</sup>	1,3x10 <sup>6</sup>	
MLW J+3°C		nd			1,5x10 <sup>6</sup>	3,3x10 <sup>7</sup>	3,8x10 <sup>6</sup>	4,1x10 <sup>6</sup>	3,0x10 <sup>7</sup>	3,9x10 <sup>6</sup>	4,0x10 <sup>6</sup>	3,8x10 <sup>7</sup>	7,3x10 <sup>5</sup>	4,8x10 <sup>6</sup>	
MDD V+15°C		nd			4,1x10 <sup>6</sup>			2,0x10 <sup>6</sup>		5,1x10 <sup>5</sup>		4,3x10 <sup>5</sup>		7,8x10 <sup>5</sup>	
MR V+15°C		nd			1,1x10 <sup>6</sup>			1,9x10 <sup>6</sup>		1,4x10 <sup>5</sup>		2,0x10 <sup>5</sup>		5,5x10 <sup>5</sup>	
ASW V+15°C		nd			1,1x10 <sup>6</sup>			3,9x10 <sup>6</sup>		3,9x10 <sup>6</sup>		4,1x10 <sup>5</sup>		8,0x10 <sup>5</sup>	
MLW V+15°C		nd			1,5x10 <sup>5</sup>			1,0x10 <sup>6</sup>		8,8x10 <sup>4</sup>		3,2x10 <sup>5</sup>		4,1x10 <sup>5</sup>	
MDD J+15°C		nd			1,0x10 <sup>7</sup>			1,3x10 <sup>7</sup>		7,6x10 <sup>7</sup>		3,4x10 <sup>7</sup>		2,0x10 <sup>6</sup>	
MR J+15°C		nd			7,5x10 <sup>6</sup>			3,1x10 <sup>7</sup>		3,4x10 <sup>7</sup>		1,2x10 <sup>8</sup>		3,2x10 <sup>7</sup>	
MLW J+15°C		nd			4,1x10 <sup>6</sup>			2,9x10 <sup>6</sup>		4,1x10 <sup>6</sup>		2,0x10 <sup>5</sup>		< 10 <sup>3</sup>	

Die Tabelle wird auf nachfolgender Seite fortgesetzt.

Vibrio spp.	Zeit MW P	-24h	0d	1d	2d	3d	4d	5d	6d	7d	8d	9d	10d
<i>V. v.</i>	MDD	nd	2,8x10 <sup>6</sup>										
	MR	nd	3,6x10 <sup>4</sup>										
	TW-K	nd	5,5x10 <sup>3</sup>										
	MLW	nd	1,6x10 <sup>4</sup>										
	MDD V+3°C	nd		3,9x10 <sup>4</sup>	1,0x10 <sup>5</sup>	3,7x10 <sup>5</sup>	5,3x10 <sup>3</sup>	5,1x10 <sup>4</sup>	8,8x10 <sup>3</sup>	1,7x10 <sup>3</sup>	1,0x10 <sup>4</sup>	3,5x10 <sup>3</sup>	1,0x10 <sup>3</sup>
	MR V+3°C	nd		7,5x10 <sup>3</sup>	1,3x10 <sup>4</sup>	3,0x10 <sup>4</sup>	3,4x10 <sup>4</sup>	1,2x10 <sup>5</sup>	6,3x10 <sup>4</sup>	4,3x10 <sup>3</sup>	4,0x10 <sup>3</sup>	2,0x10 <sup>3</sup>	1,0x10 <sup>3</sup>
	ASW V+3°C	nd		7,5x10 <sup>3</sup>	1,0x10 <sup>3</sup>	1,0x10 <sup>3</sup>	1,3x10 <sup>3</sup>	2,8x10 <sup>4</sup>	1,0x10 <sup>3</sup>	< 10 <sup>3</sup>	1,0x10 <sup>3</sup>	1,0x10 <sup>3</sup>	1,5x10 <sup>3</sup>
	MLW V+3°C	nd		4,8x10 <sup>3</sup>	1,2x10 <sup>4</sup>	1,0x10 <sup>4</sup>	3,4x10 <sup>4</sup>	1,0x10 <sup>4</sup>	1,0x10 <sup>3</sup>	7,3x10 <sup>3</sup>	2,0x10 <sup>3</sup>	< 10 <sup>3</sup>	1,0x10 <sup>3</sup>
	MDD J+3°C	nd		1,4x10 <sup>5</sup>	1,6x10 <sup>5</sup>	1,2x10 <sup>5</sup>	2,1x10 <sup>4</sup>	5,0x10 <sup>4</sup>	2,5x10 <sup>4</sup>	8,0x10 <sup>3</sup>	1,0x10 <sup>4</sup>	3,1x10 <sup>4</sup>	5,3x10 <sup>3</sup>
	MR J+3°C	nd		4,4x10 <sup>4</sup>	1,8x10 <sup>4</sup>	1,1x10 <sup>4</sup>	7,5x10 <sup>3</sup>	6,8x10 <sup>3</sup>	6,7x10 <sup>3</sup>	4,3x10 <sup>3</sup>	4,3x10 <sup>3</sup>	4,5x10 <sup>3</sup>	1,8x10 <sup>3</sup>
	MLW J+3°C	nd		4,1x10 <sup>4</sup>	< 10 <sup>3</sup>	7,5x10 <sup>3</sup>	< 10 <sup>3</sup>	1,0x10 <sup>3</sup>	< 10 <sup>3</sup>	< 10 <sup>3</sup>	< 10 <sup>3</sup>	< 10 <sup>3</sup>	< 10 <sup>3</sup>
	MDD V+15°C	nd			4,8x10 <sup>4</sup>		7,8x10 <sup>4</sup>		7,5x10 <sup>4</sup>		3,8x10 <sup>3</sup>		9,3x10 <sup>4</sup>
	MR V+15°C	nd			1,1x10 <sup>4</sup>		7,5x10 <sup>3</sup>		8,8x10 <sup>3</sup>		2,8x10 <sup>4</sup>		1,0x10 <sup>4</sup>
	ASW V+15°C	nd			1,0x10 <sup>3</sup>		6,8x10 <sup>3</sup>		6,8x10 <sup>3</sup>		1,0x10 <sup>4</sup>		7,5x10 <sup>3</sup>
	MLW V+15°C	nd			2,7x10 <sup>5</sup>		6,0x10 <sup>3</sup>		6,0x10 <sup>3</sup>		6,0x10 <sup>3</sup>		5,3x10 <sup>4</sup>
	MDD J+15°C	nd			1,4x10 <sup>5</sup>		6,3x10 <sup>5</sup>		5,0x10 <sup>5</sup>		4,0x10 <sup>4</sup>		< 10 <sup>3</sup>
	MR J+15°C	nd			1,8x10 <sup>4</sup>		7,5x10 <sup>4</sup>		3,0x10 <sup>4</sup>		1,5x10 <sup>3</sup>		< 10 <sup>3</sup>
	MLW J+15°C	nd			< 10 <sup>3</sup>		< 10 <sup>3</sup>		1,0x10 <sup>3</sup>		< 10 <sup>3</sup>		< 10 <sup>3</sup>

MW P: Mittelwert der *Vibrio* Zellzahlen in den einzelnen Probensegmenten

MDD: Mitteldarmdrüsen; MR: Muschel-Gewebe-Reste; TW-K: Tankwasser Kontaminationsbecken; TW-H: Tankwasser Hälterungsbecken; MLW: Muschel-Lumen-Wässer

nd: keine *Vibrio* spp. detektiert

nm: nicht gemessen

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

## 10.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Humanpathogene <i>Vibrio</i> spp. und ihre Erkrankungsformen (nach SCVPH, 2001) .	4
Tabelle 2: Prävalenzdaten von <i>Vibrio</i> spp. in Muscheln und Meeresfrüchten aus Deutschland	10
Tabelle 3: Prävalenzdaten von <i>Vibrio</i> spp. in Muscheln und Meeresfrüchten aus anderen EU-Staaten	12
Tabelle 4: Prävalenzdaten von <i>Vibrio</i> spp. in Muscheln und Meeresfrüchten aus Nicht-EU-Staaten	13
Tabelle 5: Eigenschaften von <i>Vibrionaceae</i>	18
Tabelle 6: Internationale Grenz- und Warnwerte für <i>Vibrio</i> spp.	15
Tabelle 7: Hälterungssysteme verschiedener Länder	29
Tabelle 8: Akkumulationsstudien von <i>Vibrio</i> spp. und / oder anderen Bakterien in Muscheln und Meeresfrüchten	33
Tabelle 9: Hälterungsstudien von Meeresfrüchten	36
Tabelle 10: Lagerungsstudien von Lebensmitteln	39
Tabelle 11: Herkunft und Virulenzfaktoren der <i>Vibrio</i> spp. dieser Studie	41
Tabelle 12: Herkunft der <i>Mytilus edulis</i> dieser Studie	42
Tabelle 13: Primer für mPCR zur Speziesdetektion	49
Tabelle 14: fAFLP spezifische Oligonukleotid-Adapter für Ligationen	50
Tabelle 15: fAFLP Primer für präselektive PCR	50
Tabelle 16: fAFLP Primer für selektive PCR	50
Tabelle 17: mPCR-Systeme zur Speziesdetektion	57
Tabelle 18: PCR-Systeme zur Unterscheidung von Serovaren und Virulenzgenen	60
Tabelle 19: Reaktionsansatz für mPCR	65
Tabelle 20: Primer-Konzentrationen für mPCR	65
Tabelle 21: Primer-Sequenzen der mPCR	66
Tabelle 22: Bestimmung der Begleitflora	71
Tabelle 23: Vibrionen-Konzentration pro Tag unterteilt nach <i>Vibrio</i> spp. und Lagertechnik	101
Tabelle 24: Mittelwert-Zellzahlen von <i>Vibrio</i> spp. während der Kontamination	133
Tabelle 25: Mittelwert-Zellzahlen von <i>Vibrio</i> spp. während der Hälterungsversuche	134
Tabelle 26: Mittelwert-Zellzahlen von <i>Vibrio</i> spp. während der Lagerungsversuche	135

### 10.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Fließschema zur konventionellen Kultivierung von <i>Vibrio parahaemolyticus</i> und <i>Vibrio cholerae</i> .....	17
Abbildung 2: Muschelatmung und Nahrungsaufnahme.....	26
Abbildung 3: Versuchsanlage .....	51
Abbildung 4: Graphische Darstellung eines Beckens.....	51
Abbildung 5: geöffnete <i>Mytilus edulis</i> mit Probenbeschriftung .....	54
Abbildung 6: Fließschema zur Isolierung von <i>Vibrio</i> spp. ....	55
Abbildung 7: Probenahmezeitpunkte während der Kontamination.....	63
Abbildung 8: Probenahmezeitpunkte während der Hälterung.....	64
Abbildung 9: Probenahmezeitpunkte während der Lagerung.....	64
Abbildung 10 A-B: Wachstumskurven von <i>Vibrio</i> spp. ....	77
Abbildung 11 A-C: <i>Vibrio</i> spp. in <i>M. edulis</i> während der Kontamination;.....	78
Abbildung 12 A-C: <i>Vibrio</i> spp. in <i>M. edulis</i> während der Hälterung;.....	81
Abbildung 13: <i>V. parahaemolyticus</i> , <i>V. cholerae</i> und <i>V. vulnificus</i> in MDD von <i>M. edulis</i> während der Hälterung;.....	84
Abbildung 14 A-D: <i>V. cholerae</i> in <i>M. edulis</i> während der Lagerung;.....	86
Abbildung 15 A-D: <i>V. parahaemolyticus</i> in <i>M. edulis</i> während der Lagerung;.....	91
Abbildung 16 A-D: <i>V. vulnificus</i> in <i>M. edulis</i> während der Lagerung;.....	95
Abbildung 17 A-B: <i>V. cholerae</i> , <i>V. parahaemolyticus</i> und <i>V. vulnificus</i> in MDD von <i>M. edulis</i> während der Lagerung;.....	99
Abbildung 18: fAFLP von <i>V. parahaemolyticus</i> -Klonen .....	102
Abbildung 19: fAFLP von <i>V. cholerae</i> -Klonen.....	103



## Publikationsverzeichnis

**Stefanie Randt, Stephan Huehn, Doreen Herrfurth, Ralf Pund, Eckhard Strauch, Thomas Alter**

Die lebensmittelhygienische Bedeutung des Vorkommens von Vibrionen in Muscheln. Rundschau für Fleischhygiene und Lebensmittelüberwachung 63: 93-96 (2011)

**Doreen Herrfurth, Kathrin Oeleker, Ralf Pund, Eckhard Strauch, Keike Schwartz, Josef Kleer, Greta Gölz, Thomas Alter, Stephan Huehn**

Uptake and localization of *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* in blue mussels (*Mytilus edulis*) of the Baltic Sea. Journal of Shellfish Research 32(3): 1-5 (2013)

## Poster

**S. Randt, S. Huehn, E. Strauch, D. Herrfurth, G. Gölz, T. Alter**

Untersuchungen zur mikrobiologischen Qualität von Muscheln unter besonderer Berücksichtigung der *Campylobacter* spp.- und *Vibrio* spp.-Population, 51. Arbeitstagung des Arbeitsgebiets Lebensmittelhygiene, Garmisch-Partenkirchen, Germany, 2010

**D. Herrfurth, S. Randt, R. Pund, E. Strauch, T. Alter, S. Huehn**

*In vivo* survey of *Vibrio* spp. in artificially contaminated *Mytilus edulis*, National Symposium on Zoonoses Research, Berlin, Germany, 2011

**D. Herrfurth, K. Schwartz, R. Pund, E. Strauch, T. Alter, S. Huehn**

*In vivo* survey of *Vibrio* spp. in artificially contaminated *Mytilus edulis*, International Symposium „Pathogenic *Vibrio* spp. in Northern European Waters“, Koblenz, Germany, 2012

## Vorträge

*In vivo* Verhaltensstudien von *Vibrio* spp. in artifiziell kontaminierten Muscheln, 52. Arbeitstagung des Arbeitsgebiets Lebensmittelhygiene, Garmisch-Partenkirchen, Germany, 2011

*In vivo* Verhaltensstudien der Klärungskinetik von *Vibrio cholerae* und *Vibrio parahaemolyticus* aus artifiziell kontaminierten Miesmuscheln (*Mytilus edulis*), 13. Fachsymposium Lebensmittelmikrobiologie, Stuttgart, Germany, 2012

## Danksagung

Bedanken möchte ich mich bei allen Mitarbeitern aus dem Institut der Lebensmittelhygiene der FU Berlin. Ich danke Euch für Eure Unterstützung von Anfang bis Ende, bei all meinen Tätigkeiten an diesem Institut.

Ich danke Prof. Dr. Thomas Alter für die Möglichkeit diese Arbeit an seinem Institut anfertigen zu können und für die Überlassung dieses interessanten Themas. Mein besonderer Dank gilt Dr. Stephan Hühn für seine Geduld, Ausdauer, die engagierte Betreuung und immerwährende uneingeschränkte Unterstützung wenn Fragen aufkamen. Bezüglich des wissenschaftlichen Arbeitens konnte ich viel von ihm lernen.

Besonders herzlich möchte ich mich bei Kathrin Oeleker bedanken, die mir stets bei allen anfallenden Arbeiten eine große Unterstützung war und ohne deren tatkräftige Mithilfe alle Arbeiten kaum zu schaffen gewesen wären.

In diesem Zusammenhang danke ich allen hier nicht namentlich erwähnten Kolleginnen und Kollegen sowie ehemaligen Mitarbeitern des Instituts für Lebensmittelhygiene der Freien Universität Berlin für ihre Mitarbeit und die Aufopferung auch am Wochenende mit mir zu arbeiten.

Ich danke Dr. Ralf Peter Pund, aus der Fachgruppe Referenzmaterial und Zertifizierung, Abteilung: Experimentelle Toxikologie und ZEBET, für die Bereitstellung von Labor, Gerätschaften und Materialien sowie seiner stets freundlichen und wissenschaftlichen Betreuung bei den Versuchen die im Bundesinstitut für Risikobewertung bearbeitet wurden. Bezüglich der praktischen Arbeiten, Aufbau der Versuchseinheiten und Betreuung der Muscheln während der Versuche, danke ich insbesondere Anja Muske-Will, Harvey Harbach, Martin Teterra und Nils Gregor, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen.

Keike Schwartz danke ich für die erfolgreiche und nette Zusammenarbeit bei den Hälterungsversuchen die mit *V. vulnificus* durchgeführt wurden.

Katharina Riehn und Sara Urmersbach möchte ich für ihre Mühe und Ausdauer danken.

Abschließend gilt mein Dank meiner Familie, insbesondere meinem Lebensgefährten Thomas, auf deren moralische Unterstützung ich immer zählen konnte. Ich danke meinen Eltern und meinem Bruder Marcel, die immer ein offenes Ohr für mich hatten und auch sonst immer für mich da sind.

Aber ganz besonders danke ich meinem Sohn Jonas, dessen Lebensfreude und Lachen mich immer wieder aufbaut.

## **Selbständigkeitserklärung**

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

Doreen Herrfurth