

Aus dem Institut für  
Hygiene und Technologie der Lebensmittel tierischen Ursprungs  
der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl: Univ.-Prof. Dr. A. Stolle

---

**Nachweis und Differenzierung von *Vibrio* sp. in Krusten- und  
Schalentieren und Erzeugnissen daraus unter besonderer  
Berücksichtigung der routinemäßigen Diagnostik**

Inauguraldissertation  
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde  
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

von  
Monika Sieffert  
aus München

München 2003

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. R. Stolla  
Referent: Univ.-Prof. Dr. A. Stolle  
Korreferent: Univ.-Prof. Dr. R. Hoffmann

Tag der Promotion: 7. Februar 2003

# ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AAPW	Agar aus alkalischem Peptonwasser
ALS	Arbeitskreis Lebensmittelchemischer Sachverständiger
ALTS	Arbeitskreis Lebensmittelhygienischer tierärztlicher Sachverständiger
APW	Alkalisches Peptonwasser
ASP	Amnesic Shellfish Poisoning
aw-Wert	Wasseraktivität (Maß für frei verfügbares Wasser)
BgVV	Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cAMP	Cyclo-Adenosinmonophosphat
CHO	Chinese hamster ovary
CPC	Colistin-Polymyxin-B-Cellobiose-Agar
CT	Cholera-(Enterotoxin)
demin.	demineralisiert
DSP	Diarrheic Shellfish Poisoning
EPA	Environmental Protection Agency
et al.	et alli
EU	Europäische Union
FDA	Food and Drug Administration
g	Gramm
GSTB	Glukose-Salz-Teepol-Boullion
h	Stunde
HGMF	Hydrophobic-Grid-Membrane-Filter
K <sup>+</sup>	Kalium-Ion
Mg <sup>+</sup>	Magnesium-Ion
µg	Mikrogramm
µm	Mikrometer
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimol

MPN	most probable number
Na <sup>+</sup>	Natrium-Ion
NAG	non-agglutinating / nonagglutinable Vibrio
NCV	non-cholera Vibrio
NH <sub>4</sub> Cl	Ammoniumchlorid
N.N.	nomen nominantum
NSP	Neurotoxic Shellfish Poisoning
OF	Oxidations-Fermentations-Testnährboden nach HUGH und LEIFSON
O/129	Vibriostatikum (2,4-Diamino-6,7-diisopropyl-pteridin-phosphat)
PC	Plate-Count Agar
PCB	polychlorierte Biphenyle
PSP	Paralytic Shellfish Poisoning
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
SK	Subkolonie
SPB	Salz-Polymyxin-Boullion
sp.	species
TCBS	Thiosulfat-Zitrat-Galle-Saccharose Agar
TCP	Toxin co-regulated pilus
TTG	Taurochlorat-Tellurit-Gelatine-Agar
u.a.	und andere
USFDA	United States Food & Drug Administration
V.	Vibrio
VERD	Verdünnungslösung
VPS	Vibrio-Parahaemolyticus-Saccharose Agar
Vp-TDH	thermostable direct haemolysin
VP-Test	Voges-Proskauer-Test
Vp-TRH	Vp-TDH related haemolysin
ZEBS	Zentrale Erfassungs- und Bewertungsstelle für Umweltchemikalien

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>LITERATUR</b>	<b>3</b>
<b>1 Lebensmittelinfektionen in Deutschland</b>	<b>3</b>
<b>2 Entwicklung von Konsum und Produktion von Fischereierzeugnissen</b>	<b>6</b>
<b>3 Marine Aquakultur</b>	<b>7</b>
<b>4 Krustentiere und Schalentiere</b>	<b>9</b>
4.1 Krustentiere	9
4.1.1 Taxonomie, Anatomie und Physiologie	9
4.1.2 Fortpflanzung und Aquakultivierung	12
4.1.3 Vibriose der Garnelen	14
4.2 Schalentiere	16
4.2.1 Taxonomie, Anatomie und Physiologie	16
4.2.2 Fortpflanzung und Aquakultivierung der Miesmuschel	18
4.2.3 Vibriose der Muscheln	20
4.3 Gesundheitsrisiken für den Menschen durch Krusten- und Schalentiere	21
4.3.1 Kontaminanten	21
4.3.2 Rückstände	22
4.3.3 Parasiten	22
4.3.4 Toxine	23
4.3.5 Viren	25
4.3.6 Bakterien	26
<b>5 Vibrionen</b>	<b>27</b>
5.1 Taxonomie und Eigenschaften	27
5.2 Ökologie	34
5.3 Infektionen des Menschen	34
5.4 Humanpathogene <i>Vibrio</i> sp.	37

5.4.1	<i>Vibrio alginolyticus</i>	37
5.4.2	<i>Vibrio mimicus</i>	37
5.4.3	<i>Vibrio fluvialis</i>	38
5.4.4	<i>Vibrio furnisii</i>	39
5.4.5	<i>Vibrio damsela</i>	39
5.4.6	<i>Vibrio hollisae</i>	39
5.4.7	<i>Vibrio metschnikovii</i>	40
5.4.8	<i>Vibrio cincinnatiensis</i>	41
5.4.9	<i>Vibrio cholerae</i>	41
5.4.10	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	47
5.4.11	<i>Vibrio vulnificus</i>	51
5.5	Nachweismethoden	54
5.5.1	Nachweismethoden für Vibrionen allgemein	54
5.5.2	Nachweismethoden für <i>V. cholerae</i>	55
5.5.3	Nachweismethoden für <i>V. parahaemolyticus</i>	55
5.5.4	Nachweismethoden für <i>V. vulnificus</i>	56
<b>6</b>	<b>Membranfiltration</b>	<b>57</b>
6.1	Prinzip und Anwendung	57
6.2	Hydrophobic Grid-Membrane Filter (HGMF)	58
6.3	Vor- und Nachteile der Membranfiltration	59
6.4	Die Membranfiltration zum Nachweis von Vibrionen	60
	<b>EIGENE UNTERSUCHUNGEN</b>	<b>61</b>
<b>7</b>	<b>Material</b>	<b>61</b>
7.1	Probenmaterial	61
7.1.1	Nicht verzehrsfertige Erzeugnisse / Rohware	62
7.1.2	Nicht verzehrsfertige Erzeugnisse / erhitze Ware	63
7.1.3	Gegarte Ware / verzehrsfertige Erzeugnisse	63
7.2	Untersuchungsmaterial	64
<b>8</b>	<b>Methoden</b>	<b>65</b>
8.1	Isolierung von Vibrionen	67
8.1.1	Anreicherungsverfahren	67

8.1.2	Keimzählverfahren	68
8.2	Identifizierung	69
8.2.1	Wachstum auf TCBS, AAPW und PC	69
8.2.2	Oxidasetest	69
8.2.3	Beweglichkeit	69
8.2.4	Gramfärbung	70
8.2.5	Oxidativer und fermentativer Abbau von Glukose	70
8.2.6	Abbau von Glukose mit Überprüfung der Gasbildung	70
8.2.7	Empfindlichkeit gegenüber dem Vibriostatikum O/129	70
8.2.8	api 20 E-System	71
8.2.9	Abbau von Laktose	74
8.2.10	Wachstum in 6,5%iger NaCl-Bouillon	74
8.2.11	O1-Antiserum	74
8.2.12	Nationales Referenzzentrum	74
<b>ERGEBNISSE</b>		<b>75</b>
<b>9</b>	<b>Nachweis von <i>Vibrio</i> sp. in der Gesamtheit der untersuchten Proben</b>	<b>75</b>
<b>10</b>	<b>Nachweis von Vibrionen in den Erzeugnisgruppen</b>	<b>77</b>
<b>11</b>	<b>Vergleich der Untersuchungsverfahren zum Erregernachweis</b>	<b>79</b>
11.1	Vergleich Anreicherung mit Keimzählverfahren	79
11.2	Vergleich Anreicherung mit Spatelverfahren	79
11.3	Vergleich Anreicherung mit Membranfiltrationsverfahren	79
11.4	Vergleich Anreicherung 6 h mit 18-24 h	80
11.5	Vergleich Membranfiltrations- mit Spatelverfahren	80
<b>12</b>	<b>Vorkommen im Einzelnen</b>	<b>81</b>
<b>13</b>	<b>Andere isolierte Keime auf TCBS-Agar</b>	<b>88</b>
<b>14</b>	<b>Erfahrungen mit dem TCBS-Agar</b>	<b>89</b>
<b>15</b>	<b>Untersuchungsverfahren zur Erregeridentifizierung</b>	<b>90</b>
15.1	Vergleich Glukose-Pepton-Bouillon mit OF-Testnährboden	90
15.2	Erfahrungen und Probleme mit dem api 20 E-System	90

<b>DISKUSSION</b>	<b>93</b>
<b>16 Bewertung der Untersuchungsmethoden</b>	<b>93</b>
16.1 Membranfiltrationsverfahren	93
16.2 Anreicherungsverfahren	94
16.3 Anwendbarkeit in der Routinediagnostik	94
<b>17 Bedeutung für die Lebensmittelhygiene</b>	<b>97</b>
<b>18 Konkrete Gesundheitsgefahr</b>	<b>99</b>
<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>101</b>
<b>SUMMARY</b>	<b>103</b>
<b>ANHANG</b>	<b>105</b>
<b>19 Untersuchungsmaterial für den Nachweis von <i>Vibrio</i> sp.</b>	<b>105</b>
19.1 Medien zur Anreicherung, Isolierung und Differenzierung von <i>Vibrio</i> sp.	105
19.1.1 Nährmedien	105
19.1.2 Aufbewahrungsmedium	111
19.2 Testsysteme, Reagenzien und Chemikalien	111
19.3 Geräte und Hilfsmittel	113
<b>20 Übersicht über die Gesamtheit der untersuchten Proben</b>	<b>119</b>
<b>FARBTAFFELN</b>	<b>129</b>
<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>133</b>
<b>SONSTIGE LITERATURQUELLEN</b>	<b>141</b>
<b>TABELLENVERZEICHNIS</b>	<b>145</b>
<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>147</b>
<b>DANKSAGUNG</b>	<b>149</b>
<b>LEBENS LAUF</b>	<b>150</b>







# EINLEITUNG

In den letzten 25 Jahren sind die Meldungen über Lebensmittelinfektionen und -intoxikationen stark angestiegen. Gleichzeitig hat sich das Erregerspektrum in dieser Zeit gewandelt. Rindertuberkulose oder Brucellose sind in den Hintergrund getreten. An Bedeutung haben Salmonellen, enteropathogene *Escherichia coli*, *Campylobacter*, *Yersinia enterocolitica* und Vibrionen gewonnen. Lebensmittelinfektionen durch Vibrionen nehmen im Gegensatz zu Japan und den USA in Deutschland in Bezug auf ihre Häufigkeit zwar keine herausragende Stellung ein, auf der anderen Seite ist jedoch weniger bei der Salmonellose, Paratyphus, Shigellenruhr oder Typhus abdominalis, sondern vor allem bei der Gruppe der „übrigen Formen“ der infektiösen Enteritiden ein starker Anstieg in der Vorkommenshäufigkeit zu verzeichnen.

Vibrionen sind Meeresbakterien und somit natürliche Kontaminanten von Meeresfrüchten, vor allem von Krustentieren und Schalentieren. Da diese Tatsache wenig bekannt ist, wird mit dieser Lebensmittelgruppe bei der Verarbeitung und Zubereitung unter hygienischen Aspekten eher sorglos umgegangen. In der humanmedizinischen Diagnostik von Enteritiden und Septikämien werden Vibrionen nur selten in Betracht gezogen und bleiben daher oft unerkannt. Eine große kaum zu ermittelnde Zahl milder verlaufender und selbstlimitierender Lebensmittelinfektionen läuft ohne Arztbesuch und eventuell sogar ohne Erkennen des Betroffenen ab. Es ist mit einer ausgesprochen hohen Dunkelziffer zu rechnen.

Mit der vorliegenden Studie sollte daher untersucht werden, inwieweit aus dem Handel stammende Krusten- und Schalentiere und Erzeugnisse daraus mit Vibrionen belastet sind.

In der amtlichen Lebensmittelüberwachung existiert keine einheitliche Untersuchungsmethode zum Nachweis von Vibrionen. Außer bei der Einfuhrkontrolle dürfte daher kaum eine Untersuchung auf Vibrionen durch die amtliche Lebensmittelüberwachung stattfinden. Das zweite Ziel der vorliegenden Arbeit war es, hierfür eine möglichst einfache und routinemäßig anwendbare Untersuchungsmethode zu entwickeln.



# LITERATUR

## 1 LEBENSMITTELINFEKTIONEN IN DEUTSCHLAND

Das Konsumverhalten und die Ernährungsgewohnheiten der Bevölkerung haben sich verändert. Es werden immer mehr Mahlzeiten außer Haus verzehrt und der hygienebewusste Umgang mit dem Lebensmittel im eigenen Haushalt wird infolgedessen verlernt. Gleichzeitig werden Lebensmittel ohne Zusatz von Konservierungsmitteln bevorzugt. Die Nachfrage nach rohen und „naturbelassenen“ Lebensmitteln ist gestiegen. Daraus resultieren Änderungen in Produktion und Handel. Es werden vermehrt rohe Lebensmittel ohne Einsatz von Konservierungsmitteln produziert. Gleichzeitig verlängern sich die Transportwege und -zeiten durch zentralisierte Produktion und Verarbeitung. Verbesserte Infrastrukturen ermöglichen Handelswege rund um den Globus. Hinzu kommen Änderungen in der Bevölkerungsstruktur. Der Anteil an älteren und immungeschwächten Menschen hat zugenommen. Sie sind für die Erreger empfänglicher. Lebensmittelinfektionen und -intoxikationen verlaufen in diesem Personenkreis schwerer und führen häufiger zu Komplikationen (AMMON et al., 2000).

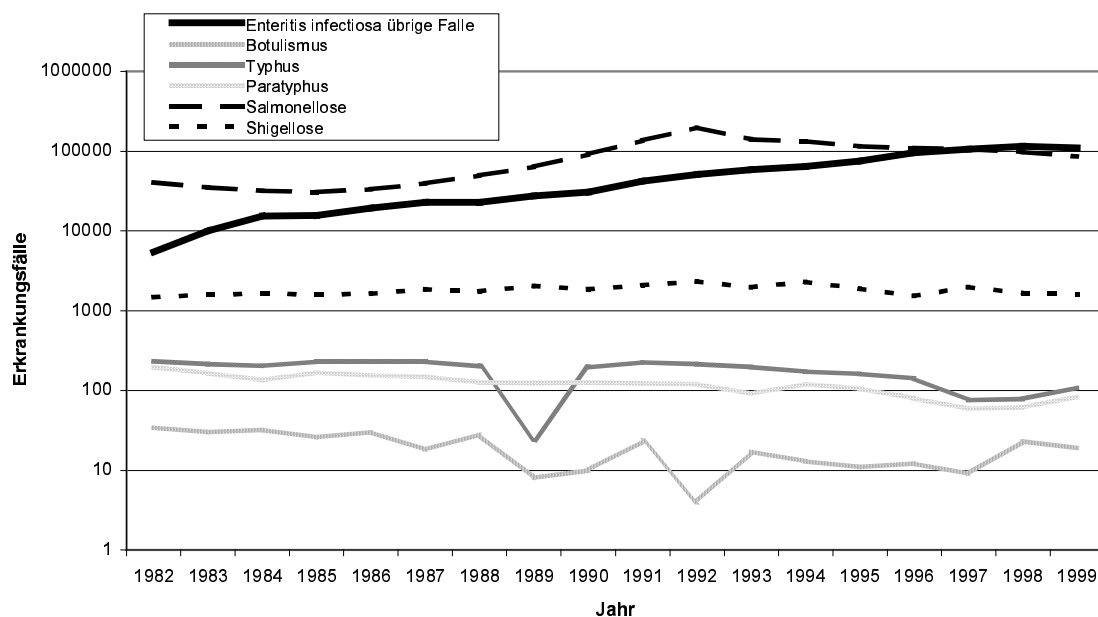
Nach dem Bundesseuchengesetz waren bis Ende 2000 in Deutschland folgende von den durch Lebensmittel auf den Menschen übertragbare bakterielle Infektions- und Intoxikationserkrankungen bei Krankheitsverdacht, Erkrankung und Tod meldepflichtig:

1. Botulismus,
2. Cholera,
3. Enteritis infektiosa:
  - a) Salmonellose,

- b) übrige Formen einschließlich mikrobiell bedingter Lebensmittelvergiftungen,
- 4. Paratyphus A, B und C,
- 5. Shigellenruhr und
- 6. Typhus abdominalis.

Vor allem bei der Gruppe der „übrigen Formen“ der infektiösen Enteritiden ist ein starker Anstieg in der Vorkommenshäufigkeit zu verzeichnen (**Abbildung 1**). Dabei ist zu beachten, dass die offizielle Meldestatistik nur die Spitze des Eisberges darstellt. Es ist mit einer ausgesprochen hohen Dunkelziffer zu rechnen (KLEER et al., 2001).

**Abbildung 1 Anstieg der „übrigen Formen“ der infektiösen Enteritiden (erstellt nach den Daten aus KLEER et al., 2001)**



Nachfolgend ist der Versuch wiedergegeben, eine Rangfolge über die Wichtigkeit der Erreger, die in den letzten 20 Jahren als Erreger von Lebensmittelinfektionen an Bedeutung gewonnen haben, nach Verbraucherbewertung und nach amtlichen Schätzungen aufzustellen.

1. Salmonellen
2. *Campylobacter jejuni*
3. *Yersinia enterocolitica*
4. *Escherichia coli* O157:H7 und andere EHEC
5. *Listeria monocytogenes*
6. Norwalk-like Viren
7. *Vibrio vulnificus*
8. *Vibrio parahaemolyticus*
9. *Vibrio cholerae*
10. *Cryptosporidium parvum*
11. *Cyclospora cayetanensis*

Vibrionen tauchen in dieser Rangfolge erst relativ weit unten auf. In Deutschland sind bekannte Infektionen mit Vibrionen rar. Zu Cholera-Erkrankungen kam es in Deutschland in den letzten Jahren nur sporadisch und zwar als eingeschleppte Infektion von Reisen nach Nigeria, Pakistan, Indien und Kenia (ROBERT KOCH INSTITUT, 1998, ROBERT KOCH INSTITUT, 1999a, ROBERT KOCH INSTITUT, 1999b, ROBERT KOCH INSTITUT, 2000b, ROBERT KOCH INSTITUT, 2001b, ROBERT KOCH INSTITUT, 2001c). 1994 wurde die erste Infektion mit *Vibrio vulnificus* in Deutschland bekannt (ROBERT KOCH INSTITUT, 1997).

Infolge sich verändernder Bevölkerungsstrukturen, sich wandelnder Ernährungsgewohnheiten und steigenden Importen von Fischereierzeugnissen könnten lebensmittelbedingte Infektionen mit Vibrionen in Deutschland an Bedeutung gewinnen.

## **2 ENTWICKLUNG VON KONSUM UND PRODUKTION VON FISCHEREIERZEUGNISSEN**

An der Spitze der Beliebtheitsskala der Fischereierzeugnisse in Deutschland stand im Jahr 2000 mit einem Marktanteil von 28,5 Prozent der Alaska-Seelachs. Nach Hering (18,5 %), Süßwasserfischen (13,7 %) und Thunfisch / Boniten (13,2 %) standen die Krusten- und Schalentiere mit einem Marktanteil von 11,0 Prozent noch vor Lachs (6 %) und Rotbarsch (5,4 %) an fünfter Stelle der Beliebtheitsskala der Fischereierzeugnisse in Deutschland. Insgesamt ist der Fischkonsum in Deutschland von 12,4 Kilogramm pro Kopf im Jahr 1999 auf 13,3 Kilogramm pro Kopf im Jahr 2000 angestiegen. Zwischen Juli 2000 und Juni 2001 konnten laut einer GfK-Verbraucherstudie (Growth from Knowledge Aktiengesellschaft, Marktforschungsgesellschaft) im Vergleich zum Vorjahreszeitraum 1 Millionen neue Haushalte als Fischkäufer gewonnen werden (N.N., 2001).

Deutschland ist seerechtlich durch die Buchtlage an der Nord- und Ostsee benachteiligt und hat die Fernfischerei aufgegeben und die Hochseefischerei reduziert. Die Anlandungen der eigenen Seefischerei sinken, gleichzeitig steigen die Importmengen, sodass dennoch der leicht gestiegene Pro-Kopf-Verbrauch an Fisch und Fischwaren gedeckt wird. Fischprodukte sind alle mit Ausnahme von Frischfisch heute in ihren Handelsreichweiten unbegrenzt. Das gilt vor allem für Frostware. Fisch und Fischprodukte wurden so trotz ihrer hohen Verderblichkeit zu einem praktisch überall verfügbaren Welthandelsprodukt, bei dem Fangplatz und Konsumort extrem auseinander klaffen können. Zu den wichtigsten Exportländern der Dritten Welt gehören Thailand, China, Chile, Indonesien, Peru, Indien, Ecuador, Argentinien, Marokko und Mexiko. Gemessen am Exportwert stellten sie im Jahr 1996 insgesamt 29,9 Prozent der Exporte von Fisch und Fischprodukten (UTHOFF, 1999).

Mit 21,1 Mio. Tonnen erreichte die aquatische Gesamtproduktion, das heißt Fang und Produktion von Fischen, Krusten- und Schalentieren, im Jahre 1950 das Vorkriegsniveau von 1938. Bis 1996 ist sie auf 121,0 Mio. Tonnen angewachsen.



Das entspricht einer mittleren jährlichen Zuwachsrate von 3,9 Prozent. Die Weltbevölkerung ist jedoch im Zeitraum von 1950 bis 1996 nur um 1,8 Prozent pro Jahr gestiegen. Im Jahre 1996 stammten etwa 80 Prozent aller Fische, Krusten- und Schalentiere aus den Meeren und etwa 20 Prozent aus der Aquakultur, davon etwa 9 Prozent aus mariner Aquakultur. Die traditionelle marine Fangfischerei trug 72 Prozent zur Versorgung mit aquatischen Nahrungs- und Futtermitteln bei. Über den Zeitraum von 1984 bis 1996 wuchs die marine Aquakultur mit 13,3 Prozent jährlich am stärksten, gefolgt von der Aquakultur in Binnengewässern mit 10,9 Prozent Wachstum pro Jahr. Die Fangfischerei blieb dagegen mit insgesamt 1,8 Prozent und in den Meeren mit nur 1,7 Prozent deutlich zurück.

Während in der unmittelbaren Gegenwart die Fangfischerei insgesamt um 10,2 Prozent zugenommen hat, ist die Aquakultur um 101,0 Prozent gestiegen, und zwar die marine Aquakultur mit 117,5 Prozent besonders stark. Die marine Aquakultur von Fischen, Krusten- und Schalentieren weist unter allen Produktionssektoren die höchsten Zuwachsraten auf und zeigt derzeit exponentielles Wachstum (UTHOFF, 1999).

### 3 MARINE AQUAKULTUR

Die marine Aquakultur ist die kontrollierte Produktion von Meeresorganismen wie Fische, Krusten- und Schalentiere sowie marine Pflanzen im Meer- oder Brackwasser. Man kann Semi- und Vollkulturen unterscheiden. Bei **Semikulturen** wird durch gezieltes Abfischen von Larven und Jungtieren mobiler Arten in deren natürlichen Lebensräumen der Besatz gewonnen. Sessile Spezies wie Muscheln und Algen werden durch Bereitstellung von Haftkörpern (Kollektoren) im Verbreitungsgebiet angereichert. Bei **Vollkulturen** findet der gesamte Lebenszyklus, das heißt von Ei zu Ei oder vom Ei zum Konsumprodukt, unter gesteuerten Kulturbedingungen statt. Die Miesmuschelkultur, eine typische Semikultur, ist mit verschiedenen Arten je nach Region weltweit verbreitet. *Mytilus edulis* wird im

atlantischen Europa, *Mytilus galloprovincialis* im Mittelmeergebiet und *Mytilus smaragdinus* in Südostasien kultiviert. Die Ursprungsgebiete mariner Aquakultur Ost und Südostasien, das atlantische Europa sowie der Mittelmeerraum sind mit starkem Übergewicht Asiens auch heute noch die wichtigsten Produktionsgebiete. Aufgrund der spektakulären Produktionserfolge bei der kontrollierten Aufzucht von atlantischem Lachs (*Salmo salar*) in Norwegen (sie stieg von rund 4200 t im Jahr 1980 auf 301400 t im Jahr 1996) und von tropischen Garnelen in Südostasien, speziell Thailand (die thailändische Garnelenkultur wuchs von 8100 t im Jahr 1980 auf 230800 t im Jahr 1996) rückte die Aquakultur 1980 als Quelle mariner Nahrungsmittel zur Ergänzung der Versorgung durch die Fangfischerei in das globale öffentliche Interesse. Die Produktionsmengen wuchsen lange Zeit jährlich um 31 Prozent in Norwegen und 23 Prozent in Thailand. Mit einer jährlichen Zuwachsrate von 82 Prozent im Jahr 1996 verliefen die Kulturerfolge bei der Riesentigergarnele (*Penaeus monodon*), der derzeitigen Hauptspezies der thailändischen Garnelenwirtschaft, noch extremer. Die Produktionsmenge stieg von 170 Tonnen im Jahr 1984 auf 220000 Tonnen im Jahr 1996. Heute sind wichtigsten Produzenten sich entwickelnde Länder auf unterschiedlichem Entwicklungsstand. Gemessen an den Importmengen sind die führenden Konsumenten durchweg Industrieländer mit differenzierten Märkten, hoher Kaufkraft und starkem Delikatessenbedarf (UTHOFF, 1999).

## 4 KRUSTENTIERE UND SCHALENTIERE

### 4.1 Krustentiere

#### 4.1.1 Taxonomie, Anatomie und Physiologie

##### 4.1.1.1 Taxonomie

Unter **Krustentieren** (*Crustacea*) versteht man fast ausschließlich im Wasser lebende und durch Kiemen atmende Gliederfüßer (*Arthropoda*) (LERCHE et al., 1942). Charakteristisch für die Krustentiere ist ihre harte Hülle, das Exoskeletton. Die für die menschliche Ernährung interessanten Krustentiere gehören fast ausnahmslos zu den Zehnfüßern (*Decapoda*). Die Gruppe der Zehnfüßer kann in zwei große Untergruppen eingeteilt werden:

- die *Natantia*, „Schwimmer“ oder Garnelen und
- die *Reptantia*, „Krabbler“ oder Panzerkrebse (BRANSON, 1993).

Die **Garnelen** sind Bewohner der verschiedensten Lebensräume von der Tiefsee bis zum Süßwasser. Das Schwanzstück hat etwa die gleiche Länge wie der Kopf-Thorax-Panzer (Cephalothorax). Der Körper ist schlank und seitlich abgeflacht.

Die **Panzerkrebse** sind an der Bauchseite abgeflacht und der Schwanz ist meist kürzer als der Cephalothorax. Besonders auffällig sind die kräftigen Scheren. Jedoch besitzen nicht alle Panzerkrebse, wie zum Beispiel die Langusten, diese markanten Greifapparate. Die Panzerkrebse werden unterteilt in die Kurzschwanzkrebse oder Echte Krabben, in die Mittelschwanzkrebse und die Langschwanzkrebse, zu denen die Hummer, die Langusten und die Süßwasserkrebse gehören (N.N., 1994). Nachfolgende **Tabelle** gibt einen Überblick über die für die menschliche Ernährung interessanten Krustentiere.

**Tabelle 1 Einteilung der für die menschliche Ernährung wichtigen Krustentiere (modifiziert nach N.N., 1994)**

<b>Garnelen</b>	<b>Panzerkrebse</b>		
<b>Shrimps, Prawns</b>	<b>Langschwanzkrebse</b> <i>Macrura</i>	<b>Mittelschwanzkrebse / Crabs</b> <i>Anomura</i>	<b>Kurzschwanzkrebse</b> <b>echte Krabben / Crabs</b> <i>Brachyura</i>
<b>Geißelgarnelen</b> <i>Penaeidae</i> Hauptmannsgarnele Bären- oder Schiffskeelgarnele Furchengarnele	<b>Süßwasserkrebse / Freshwater crayfish</b> <i>Astacidae</i> Edelekrebs Galizier Steinkrebs Amerikanischer Flußkreb Louisiana Flußkreb	<b>Furchenkrebse</b> <i>Galatheidae</i> Langustino Chilekrabbe	<b>Seespinnen</b> <i>Majidae</i> Nordische Eismeerkrabbe Schneekrabbe Seespinne
<b>Tiefseegarnelen</b> <i>Pandalidae</i> Tiefseegarnele Mittelmeer-Tiefseegarnele Camarón	<b>Lobster:</b>	<b>Einsiedlerkrebse</b> <i>Paguridae</i> Einsiedlerkreb	<b>Taschenkrebse</b> <i>Cangruidae</i> Taschenkreb, Krieper <i>Cancer pagurus L.</i>
<b>Felsengarnelen</b> <i>Palaeomonidae</i> Ostseegarnele Sägegarnele japanische Garnele Rosenberggarnele	<b>Langusten / Crawfish</b> <i>Palinuridae</i> europäische Languste amerikanische Languste Kaplanguste	<b>Steinkrabben</b> <i>Lithodidae</i> Königskrabbe / Steinkrabbe Antarktische / Kamtschatka Königskrabbe	<b>Schwimmkrabben</b> <i>Portunidae</i> Blaukrabbe, <i>Callinectes sapidus</i> Ladykrabbe, <i>Ovalipes ocellatus</i> Kreuzkrabbe, <i>Charybdis cruciata</i> Mangrovenkrabbe, <i>Scyllaserata</i>
<b>Süßwassergarnelen</b> <i>Atyidae</i> Süßwassergarnele	<b>Bärenkrebse</b> <i>Scyllaridae</i> kleiner Bärkreb großer Bärkreb		<b>Gerynoidae</b> rote Tiefseekrabbe, Geryon
<b>Sandgarnelen</b> <i>Crangoiidae</i> Nordseegarnelen Amerikanische Sandgarnele	<b>Hummer/Hummerartige</b> <i>Homaridae</i> europäische Hummer amerikanischer Hummer Kaisergranat, Nephrops, Scampi		

#### 4.1.1.2 Anatomie und Physiologie

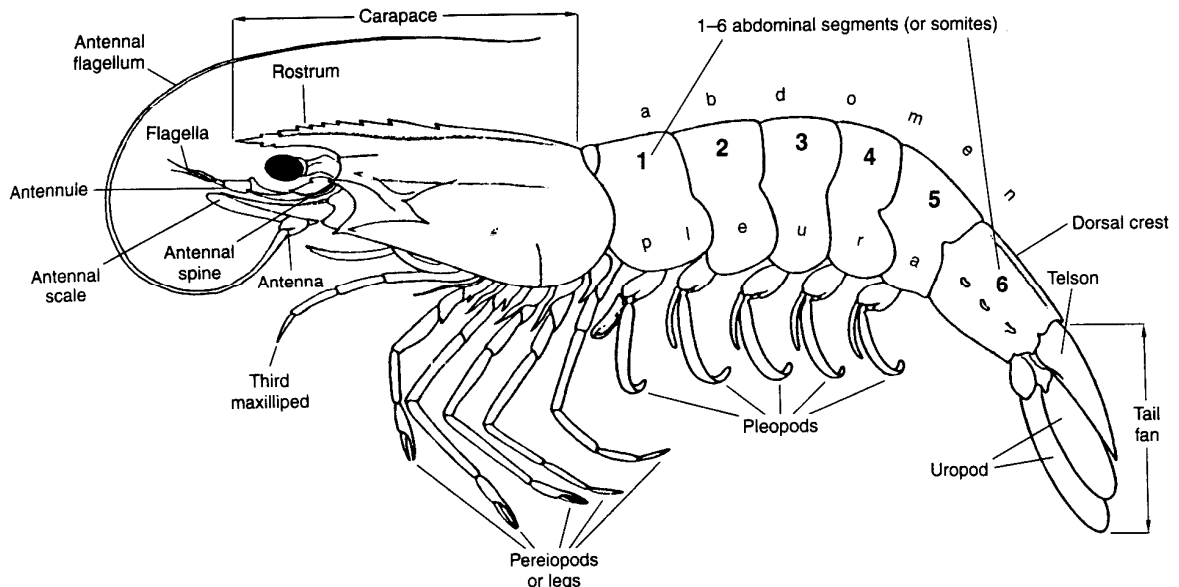
Die folgenden Ausführungen beziehen sich nur auf die Garnelen, da die meisten Eigenschaften beiden Gruppen gleich sind.

Die Tiere besitzen meist mehr als zehn Beine, gezählt werden aber nur die fünf zum Laufen genutzten Beinpaare (Pereiopden) (N.N., 1994). Die ersten drei Beinpaare sind zu Teilen des Mundes adaptiert (Maxillipeds). Krustentiere besitzen im Gegensatz zu den übrigen Arthropoden stets zwei Antennenpaare.

Das Exoskeletton ist segmental aufgebaut. Die Kopf- und Thoraxsegmente sind dorsal und lateral zum Cephalothorax verschmolzen, welcher oft nach vorne in einen

spitzen Fortsatz verlängert ist (Rostrum). An der Basis der Pereiopden sitzen unter dem Cephalothorax die Kiemen in einer durch einen hartschaligen Kiemendeckel verschließbaren Kiemenhöhle. In dieser Höhle kann Wasser eingeschlossen werden, sodass die Tiere längere Zeit außerhalb des Wassers überleben können. Das Abdomen setzt sich aus sechs Segmenten mit fünf kurzen Beinpaaren (Pleopoden) zusammen. Diese Beinchen dienen zum Schwimmen, zur Kopulation und bei den eierhütenden Arten zum Schutz und Transport der Eier (BRANSON, 1993, LERCHE et al., 1942, LE VAY und EGAN, 1999, N.N., 1994). (**Abbildung 2**)

**Abbildung 2 Aufbau einer Garnele (LE VAY und EGAN, 1999)**



Die feste und flexible Haut der Krustentiere bildet eine Barriere gegen Bakterien und osmotische Einflüsse. In die Haut wird Chitin eingelagert. Chitin ist ein in den meisten Lösungsmitteln unlösliches Polymer welches der Haut seine Festigkeit und Flexibilität verleiht. Durch Einlagerung von Kalziumsalzen in die Haut werden die harten Segmente des Exoskeletts gebildet. Um Wachsen zu können, müssen Krustentiere sich häuten. Dazu werden die inneren Schichten der Haut resorbiert und eine neue Hautschicht gebildet. Nach dem Ablösen der äußeren Schichten alten

Haut, wird die neue Haut durch Aufnahme von Wasser vergrößert und durch Einlagerung von Kalziumsalzen aus körpereigenen Speichern und aus dem Wasser wieder gehärtet.

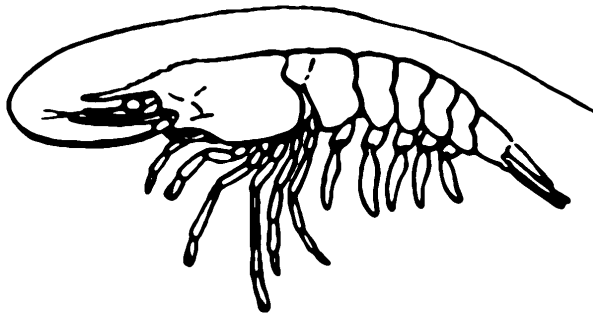
Krustentiere haben ein offenes Kreislaufsystem mit einem Herz und Arterien ohne Venen. Die Haemolymphe kehrt über ein Sinussystem zum Herzen zurück. Die Haemolymphe enthält Zellen für die Abwehr von Krankheitserregern und für die Wundheilung und ein humorales Abwehrsystem sowie frei im Plasma ein kupferbasiertes sauerstofftransportierendes Pigment, welches oxygeniert die Haemolymphe blau färbt.

Zur Nahrungsaufnahme wird das Futter mit den Maxillipeds gehalten, zerkleinert und in den Mund geschoben. Der Verdauungstrakt besitzt zwei Magenerweiterungen. Hier wird das Futter durch Magenzähne zerkleinert und mit Verdauungsenzymen aus dem Hepatopankreas vermischt. Das Hepatopankreas ist Verdauungsdrüse, Nahrungs-Resorptionsorgan und Speicherorgan für Glycogen, Flüssigkeit und Kalzium zugleich (BRANSON, 1993).

#### **4.1.2 Fortpflanzung und Aquakultivierung**

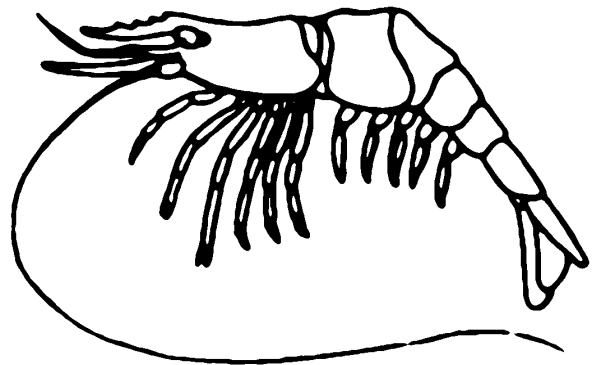
Praktisch alle für die menschliche Ernährung interessanten Zehnfüßer sind getrennt geschlechtlich. Die Garnelen der Section *Penaeidea* (**Abbildung 3**) legen große Mengen (ca.  $10^6$ ) kleiner Eier (Durchmesser 200  $\mu\text{m}$ ) direkt ins Meerwasser etwa 30 Kilometer vor der Küste. Im Gegensatz dazu behüten die Garnelen der Section *Caridea* (**Abbildung 3**) sowie die *Reptantia* (Panzerkrebse) ihre Eier, die an die Schwimmbeinchen geheftet werden, bis zu mehrere Monate.

**Abbildung 3 Unterscheidung zwischen *Penaeidea* und *Caridea* (modifiziert nach BLISS, 1982)**



***Penaeidea:***

der Rücken bildet eine Rundung



***Caridea:***

der Rücken bildet einen Knick

Nach ein paar Stunden schlüpft aus den Eiern der *Penaeidea* das erste Larvenstadium, *Nauplius*. Die Larven durchlaufen in zwölf Häutungen die Stadien *Nauplius*, *Protozoëa* und *Mysis* ehe die Metamorphose zur Post-Larve folgt. In dieser Zeit wandern die Larven aus dem offenen Meer zurück an die Küste, in der Indo-Pazifischen Region in die Mangroven-Gewässer. Hier entwickeln sie sich im Laufe von bis zu acht Monaten zur juvenilen Garnele, die schließlich wieder in die Laichgebiete ins Meer hinausschwimmen, wo sie das adulte Stadium erreichen. In vielen tropischen Ländern werden diese Wanderungen, die zu bestimmten Zeitpunkten in Massen angetreten werden, zur Garnelenfischerei an der Küste genutzt. Mit dem Anlegen von Becken, die bei Ebbe Meerwasser und Garnelen zurückhalten, begannen die Aquakultivierungen in den Mangroven (MUIR und ROBERTS, 1982a, MUIR und ROBERTS, 1982b). Seit Ende der Siebziger bis Anfang der Achtziger Jahre entwickelte sich die moderne Garnelen-Aquakultur. Die Riesentigergarnele (*Penaeus monodon*) ist besonders robust, schnellwachsend und erreicht ein hohes Gewicht von 30 bis 35 Gramm in nur 90 bis 100 Tagen. Sie ist damit die wichtigste Spezies für die Garnelen-Aquakultur (ANDERSON, 1993).

Nicht alle Krustentierarten können erfolgreich kultiviert werden. Der echte Scampi (*Nephros norvegicus*) zum Beispiel lebt ständig auf offener See und seine Larven

lassen sich nicht in großen Mengen aufziehen, da sie zu Kannibalismus neigen. Die Tiefseegarnele (*Pandalus borealis*) lebt ebenfalls ständig auf offener See und lässt sich nicht an Küstengewässer adaptieren. Andere Garnelen wie zum Beispiel die Nordseegarnele (*Crangon crangon*) sind nur klein (4 – 6 g) und auf dem Markt zu billig, sodass sich ihre Kultivierung nicht lohnt (MUIR und ROBERTS, 1982b). Sie leben in hoher Dichte in schwimmenden Schwärmen am Meeresgrund und werden mit Schleppnetzen gefangen.

Krustentiere sind entweder Carnivoren oder Allesfresser und leben von Aas, Sinkstoffen und Algen (LE VAY und EGAN, 1999).

In der Aquakultur werden die Tiere je nach Entwicklungsstadium mit verschiedenem Futter gefüttert. Die erste Zeit nach dem Schlupf leben die *Nauplii* von ihren eigenen Dotterreserven. Die jungen Larven (Futteraufnahme durch Filtration) werden mit Phytoplankton (Algen) und die älteren Larven (Futteraufnahme mit Hilfe von Mundwerkzeugen) mit Zooplankton (*Nauplii* von *Brachionus* sp. oder *Artemia salina*) gefüttert. Dieses Lebendfutter wird in der Regel in speziellen Becken in der Aquakultur gezüchtet. Nach der Metamorphose zur Post-Larve erhalten die Tiere Futterpellets aus Fleischmus, Muschelfleisch oder ähnlichem (ANDERSON, 1993).

### 4.1.3 Vibriose der Garnelen

Assoziiert an marine Krustentiere können sowohl grampositive (*Bacillus* und *Staphylococcus*) als auch gramnegative Bakterien (*Pseudomonas*, *Aeromonas* und *Vibrio*) gefunden werden. An Erkrankungen von Krustentieren sind vorwiegend gramnegative Bakterien beteiligt (KINNE, 1990).

Pseudomonaden und vor allem Vibrionen verursachen bei Krustentieren **Hautläsionen** infolge Infektion von Hautverletzungen. In Aquakulturen von Garnelen der Section *Penaeidea* können unter ungünstigen Bedingungen bis zu 100 Prozent des Bestandes betroffen sein (KINNE, 1990).



Gramnegative Bakterien sind auch Auslöser bakterieller Septikämien von Krustentieren. Da Vibrionen als Hauptauslöser ausgemacht worden sind, wurde das Krankheitsbild „Vibriosis“ oder „Vibriose“ geprägt (KINNE, 1990).

In der Larvenaufzucht ist neben Erkrankungen durch Viren, Pilze, Protozoen und anderen Bakterien die „**Luminous Vibriosis**“ oder „**leuchtende Vibriose**“ hervorgerufen durch *Vibrio harveyi* von großer Bedeutung. Die Bakterien akkumulieren im Verdauungstrakt, vermehren sich dann stark und breiten sich in der Körperhöhle aus. Die Erkrankung hat eine Mortalität von bis zu 100 Prozent bei Larven aller Altersstufen der Riesentigergarnele (*Penaeus monodon*) zur Folge. Infizierte Larven können in der Nacht an ihrer grünen Lumineszenz erkannt werden. *Vibrio harveyi* gilt als fakultativ pathogen, gewinnt aber im Laufe der Ausbreitung im Bestand zunehmend an Virulenz (ANDERSON, 1993).

Die bakterielle Septikämie oder **Vibriose der Larven** ist eine Faktorenerkrankung mit hoher Mortalität verursacht durch *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahaemolyticus* und andere Vibrionen. Die Larven zeigen eine rötliche Verfärbung des Körpers, fressen nicht und sind vermindert aktiv. Aus der Haemolymphe können große Zahlen beweglicher Bakterien isoliert werden (ANDERSON, 1993).

Die bakterielle Septikämie oder **Vibriose der juvenilen Garnelen** ist die verbreitetste Erkrankung in Aquakulturen. Sie ist ebenfalls eine Faktorenerkrankung und wird durch verschiedene in Brackwassergebieten verbreitete Vibrionen ausgelöst. Die Symptome sind unspezifisch und durch Lethargie, Verdunklung des Körpers, Anorexie, sich Versammeln in den Ecken der Becken und Verletzungen der Kiemen und Extremitäten bis hin zu Läsionen der Haut und des Panzers geprägt (ANDERSON, 1993).

Die Vibriose wird durch zu hohe Besatzdichte, hohe Wassertemperaturen und schlechte Wasserqualität begünstigt. *Vibrio parahaemolyticus* wird am häufigsten als Auslöser der Vibriose berichtet. Weitere Spezies sind *V. anguillarum*, *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae* non O1 und die lumineszierenden Spezies *V. alginolyticus*, *V. harveyi* und *V. splendidus* (KINNE, 1990).

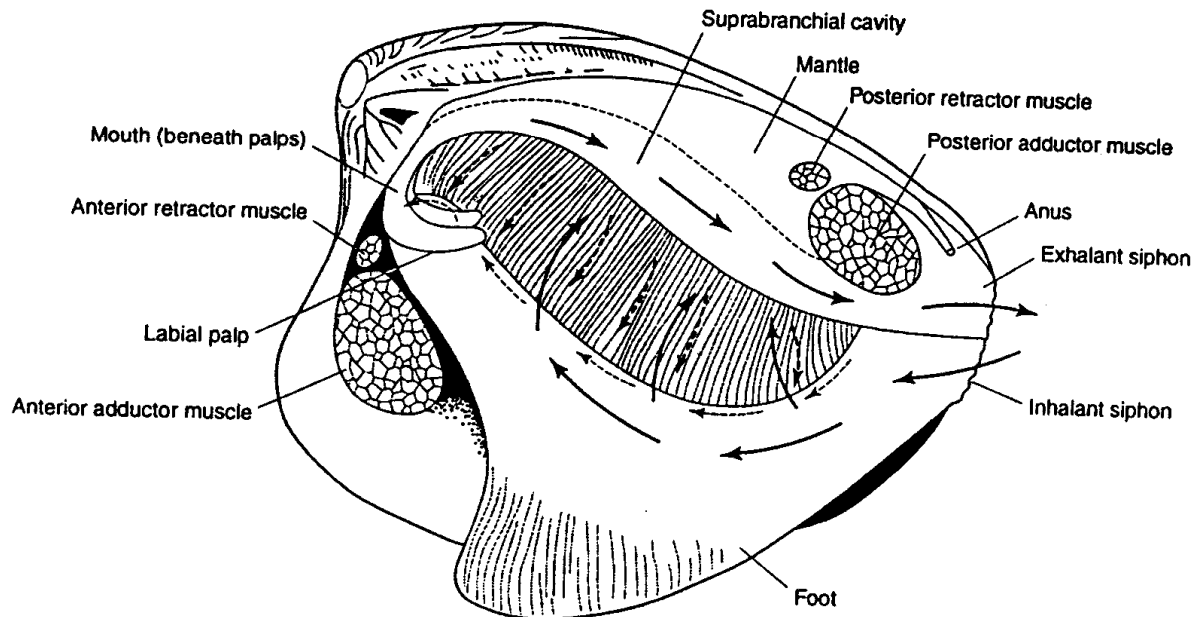
## 4.2 Schalentiere

### 4.2.1 Taxonomie, Anatomie und Physiologie

Der Stamm der **Weichtiere** (*Mollusca*) umfasst neben kleineren Klassen die Kopffüßer (*Cephalopoda*), Schnecken (*Gastropoda*) und Muscheln (*Bivalvia*). Die Körper der Weichtiere sind im Gegensatz zum Körper der Gliederfüßer (*Arthropoda*) unsegmentiert. Die Weichtiere zeichnen sich durch ihr fehlendes Skelett, ihren muskulösen Fuß, ihren Kopf, der jedoch den Muscheln fehlt, und den Eingeweidesack aus. Der Eingeweidesack wird von einer Hautfalte, die man als Mantel (*Pallium*) bezeichnet, umhüllt. Von der Epidermis des Mantels wird eine organische Matrix sezerniert, in die Kalziumkarbonat eingelagert wird. Diese Schale schützt den Eingeweidesack und damit die inneren Organe (NORDSIECK, 2002).

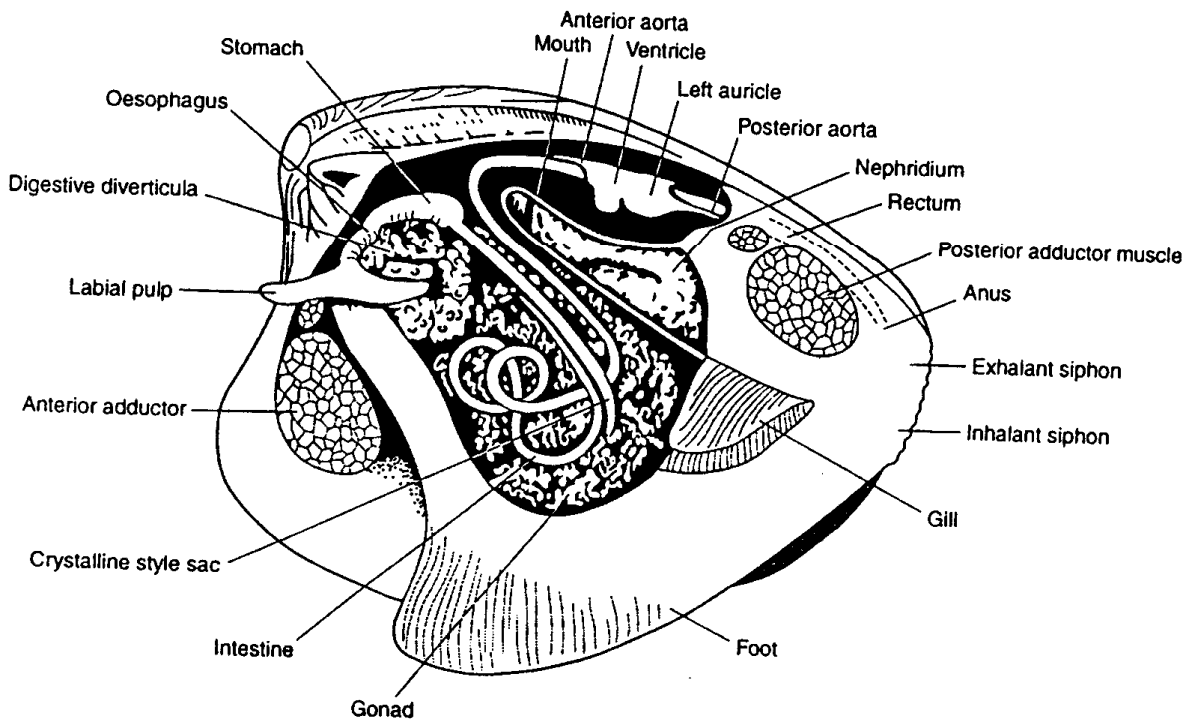
Die **Muscheln** (*Bivalvia*) besitzen zwei Schalenklappen, die den Körper umschließen und mit einem Ligament beweglich verbunden sind und durch ein Scharnier aus Höckern und Zähnen am seitlichen Verrutschen gehindert werden. Durch einen oder zwei Schließmuskeln können sie verschlossen werden. Viele Spezies haben einen muskulösen Fuß, den sie aus den geöffneten Schalen strecken können. Er dient zur Fortbewegung. Muscheln atmen mit großen Kiemen, die in mehreren lappenartigen Schichten übereinander liegen. Der Mantel, der die Kiemen umgibt, bildet meist an einem Ende der Muschel zwei Siphons aus, von denen einer dem Ein-, der andere dem Ausatmen dient. Durch Flimmerhärchen und Pumpbewegung der Schließmuskeln wird Wasser über diese teilweise röhrenförmigen Ein- und Ausatemöffnungen (Siphons) durch die zu einem Filterapparat spezialisierten Kiemen gepumpt (**Abbildung 4**).

**Abbildung 4 Aufbau einer Muschel-1 (LE VAY und EGAN, 1999)**



Große Muscheln filtern so bis zu 1000 Liter Wasser pro Tag. Aus dem Wasser gefiltertes Phytoplankton (Algen), feine Partikel aus organischem Material und vermutlich auch Bakterien bilden die Nahrung der Muscheln. Verdauliche Nahrungspartikel werden zur Mundöffnung transportiert. Unverdauliche Partikel werden in eine Schleimschicht gehüllt und ausgeschieden. Durch diese Art der Nahrungsaufnahme können aber auch Giftstoffe und pathogene Keime aus dem Wasser oder Sediment angereichert werden. An den Mundraum schließt sich der im Eingeweidesack liegende Verdauungstrakt an, der aus Schlund (Pharynx), Magen und Darm besteht. Die so genannten Mitteldarmdrüsen sind die Hauptverdauungsdrüsen, die einen Großteil des Eingeweidesackes einnehmen. Im Eingeweidesack befinden sich außerdem die Exkretionsorgane und die Geschlechtsorgane (Gonaden). Der Blutkreislauf der Weichtiere ist offen, bestehend aus einem mehrkammerigem Herz sowie vorderer und hinterer Aorta. Als sauerstofftransportierendes Pigment dient neben Hämoglobin vor allem Haemocyanin, wodurch die Haemolymphe bläulich bis farblos erscheint (**Abbildung 5**) (EIGENER, 1978, LE VAY und EGAN, 1999, NORDSIECK, 2002).

**Abbildung 5    Aufbau einer Muschel-2 (LE VAY und EGAN, 1999)**



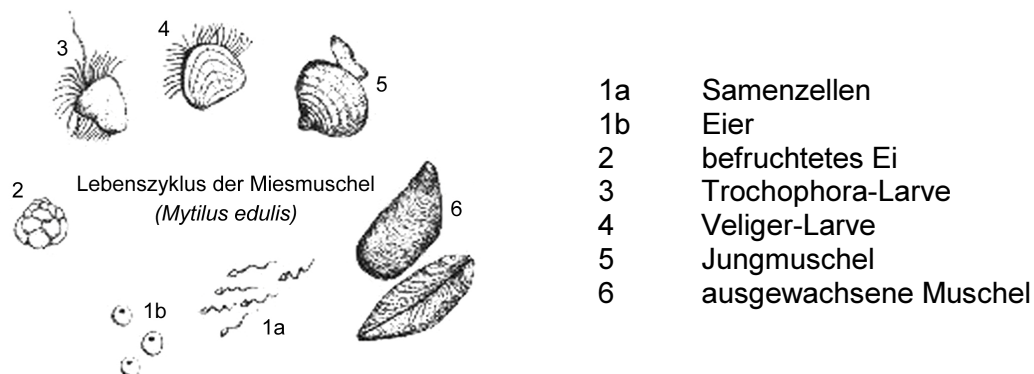
Die **Miesmuschel** hat eine schwarz-blaue, etwa 4 bis 5 Zentimeter große und annähernd symmetrische Schale, die an einem Ende keilförmig zugespitzt ist. Der Fuß ist groß und muskulös und bei der fast geschlossenen Muschelschale oft das einzige sichtbare Körperteil. Am Ende des Fußes befinden sich Byssusdrüsen, die einen harten Faden produzieren, mit dem sich die Muschel an Felsen oder Pfähle befestigen kann. Im Watt heften sich Miesmuscheln aneinander und bilden eine Muschelbank. Sie verhindern so, im Untergrund zu versinken (EIGENER, 1978, LE VAY und EGAN, 1999, NORDSIECK, 2002).

#### **4.2.2 Fortpflanzung und Aquakultivierung der Miesmuschel**

Miesmuscheln sind wie alle Muscheln getrennt geschlechtlich. Die weibliche Muschel laicht abhängig von Wassertemperatur, Strömung und anderen äußeren Faktoren

von Mai bis Oktober zwischen 5 und 12 Millionen Eier. Die männlichen Muscheln entlassen Samenzellen ins umgebende Wasser (**Abbildung 6**). Aus dem befruchteten Ei schlüpft die planktonische Trochophora-Larve, die mit einem Wimpernschopf und einem in der Mitte liegenden Wimperkranz ausgestattet ist. Nach wenigen Tagen entsteht aus der Trochophora die Veliger-Larve mit den typischen wimpernbesetzten segelförmigen Fortsätzen. Nach einer Entwicklungszeit von etwa vier bis sechs Wochen erreichen die Larven eine Größe von etwa 0,25 Millimetern und verwandeln sich in junge Muscheln. Sie heften sich an feinfädige Strukturen, wie Nesseltierkolonien (Polypen) und Röhrenwürmer. Nach einigen Wochen haben die jungen Muscheln ihr Körpergewicht verdoppelt und ändern ihren Standort. Bei ausreichender Körpergröße besiedeln sie die Gezeitenzone (NORDSIECK, 2002).

**Abbildung 6 Lebenszyklus der Miesmuschel (NORDSIECK, 2002)**



In Europa werden Miesmuscheln in großen Mengen in flachen Seegebieten, den sogenannten Muschelgärten, gezüchtet. Spanien ist der größte Produzent gefolgt von Zeeland in den Niederlanden. Auch in Deutschland, Italien, Frankreich, Irland und Griechenland besitzt die Miesmuschel - Aquakultur eine gewisse Bedeutung. Man kann zwischen Bodenkulturen, Hängekulturen und Pfahlmuschelkulturen unterscheiden. Im Frühjahr und im Herbst dürfen die Muschelzüchter für einige Wochen die sogenannte Muschelsaat, etwa einen Zentimeter große Jungmuscheln, fischen. Die Muschelsaat wird bei der in Deutschland und in den Niederlanden verbreiteten **Bodenkultur** auf dem Meeresboden des Wattenmeeres ausgesät. Bei

der **Hängekultur** wird die Muschelsaat in langen schmalen Netzen im Wasser aufgehängt und die Muscheln heften sich mit ihren Byssusfäden an den Seilen fest. Der Vorteil dieser in Spanien und in Italien üblichen Methode ist, dass die Muscheln sandfrei bleiben, da sie nicht mit dem Meeresboden in Berührung kommen. **Pfahlmuschelkulturen** sind in Frankreich seit langer Zeit üblich. Es handelt sich um in den Meeresboden gerammte Holzpfähle, an denen sich Miesmuscheln entweder von selbst ansiedeln oder als Muschelsaat in gazeartigen Netzen um die Pfähle gewickelt werden. Die Muscheln kriechen durch die Maschen und heften sich mit ihren Byssusfäden an die Pfähle. Nach zwei Jahren ist die Muschel groß genug für die Vermarktung und wird geerntet. Im Wattenmeer erfolgt die Ernte mit Schleppnetzen aus Metall. Auf dem Kutter werden die Miesmuscheln mit Meerwasser gespült, um sie von Schlick, Seesternen und anderen Meerestieren zu befreien. Der größte Teil der deutschen Miesmuscheln wird vor der Vermarktung über Yerseke in Zeeland (Niederlande) in die Oosterschelde verbracht. Die Oosterschelde ist ein großer Meeresarm ohne Zufluss von Flüssen oder Abwässern im südlichen Teil der Niederlande in der Provinz Zeeland mit einem Torfuntergrund. Das Wasser ist daher besonders sauber und die Miesmuscheln lagern hier einige Wochen zur Qualitätsverbesserung. Sie lösen sich voneinander und werden auf dem Torfuntergrund sandfrei (N.N., 2002a).

### 4.2.3 Vibriose der Muscheln

Aufgrund ihrer Futteraufnahme durch Filtration von Meerwasser reichern Muscheln eine große Anzahl von Mikroorganismen in ihrem Körper an. Ohne selbst zu erkranken können Muscheln zu passiven Überträgern von pathogenen Mikroorganismen werden. Gramnegative Bakterien bilden die überwiegende Mehrheit der mit Muscheln assoziierten Prokaryoten. Vibrionen und Pseudomonaden gehören zur normalen bakteriellen Flora im Verdauungstrakt der Muscheln. Gesunde ausgewachsene Muscheln haben ein wirksames humorales und zelluläres Abwehrsystem. Die meisten marinen Bakterien (z.B. *Aeromonas* sp. und *Vibrio* sp.) sind für adulte Muscheln ungefährlich und werden in hohen Keimzahlen toleriert. Muschellarven sind jedoch weit empfindlicher. *Vibrio anguillarum* und

*Vibrio alginolyticus* sind als Auslöser der „bacillary necrosis“ der Larven und jungen Muscheln anzusehen. Je älter die Muscheln werden, desto geringer scheint die Pathogenität der Bakterien für die Muscheln zu sein. Bei hohen Wassertemperaturen ab 18°C jedoch steigt die Mortalität der Muscheln durch Infektion mit *Vibrio anguillarum* und *Vibrio alginolyticus* stark an. In Amerika zum Beispiel gehen 15 bis 20 Prozent der Austern an dieser durch hohe Wassertemperaturen und hohen Nährstoffgehalt in Verbindung mit Vibrio-Infektion ausgelösten „Sommer-Krankheit“ in den Monaten Juli bis August ein. Bei niedrigen Wassertemperaturen verlaufen Vibrio-Infektion der Muscheln ohne Erkrankung (KINNE, 1983).

## **4.3 Gesundheitsrisiken für den Menschen durch Krusten- und Schalentiere**

### **4.3.1 Kontaminanten**

**Schwermetalle** gelangen als natürlicher Bestandteil der Erdkruste durch Erosion und über die Vegetation, vor allem aber als industrielle Emissionen über Abwässer und Stäube in die Meere. Bei Meeresfrüchten ist Quecksilber das Schwermetall mit der größten Bedeutung. Durch in Bodenschlämmen lebende Mikroorganismen wird es in organische Quecksilberverbindungen überführt. Diese hochtoxischen und fettlöslichen Verbindungen werden von den Meerestieren aufgenommen und akkumulieren in langlebigen Arten und in Tieren am Ende der Nahrungskette.

Die ebenfalls fettlöslichen **Organochlorverbindungen**, wie Pestizide und PCB (polychlorierte Biphenyle), die als technische Hilfsmittel weit verbreitet sind, sind wie auch die hochtoxischen **Dioxine** außerordentlich persistent und verbreiten sich weltweit (TÜLSNER, 1994).

### 4.3.2 Rückstände

Da Infektionserkrankungen in einer Garnelenlarvenaufzucht einen sehr schnellen Verlauf mit Verlust des gesamten Bestandes innerhalb 48 Stunden nehmen können, werden vielfach **Antibiotika** präventiv dem Wasser zugesetzt (ANDERSON, 1993).

Nach einer Warnung der EU über das Schnellinformationssystem für Lebensmittel über Rückstände des Antibiotikums **Chloramphenicol** in Shrimps im Jahre 2001 müssen nun Garnelen aus Aquakulturen in China, Indonesien und Vietnam auf Rückstände von Chloramphenicol untersucht werden. Chloramphenicol ist ein billiges Antibiotikum, welches beim Menschen durch Knochenmarkschädigung zu einer irreversiblen aplastischen Anämie führen kann und ein genotoxisches Potential besitzt. 1994 wurde in der EU Chloramphenicol für die Anwendung bei Tieren, die der Lebensmittelgewinnung dienen, verboten. In Lebensmitteln ist für Chloramphenicol eine Nulltoleranz festgelegt (N.N.,2002b, N.N.,2002c).

Neben Antibiotika (Chloramphenicol, Nitrofurane, Nalidixin u.a.) zur Behandlung und Vorbeuge von bakteriellen Erkrankungen kommen in der Aquakultur Desinfektionsmittel (Hypochlorid, Iodophore, Quarternäre Ammoniumverbindungen u.a.) zur Entkeimung von Geräten und Anlagen sowie von Tieren und Eiern, Molluscizide (Kupfersulfat, Triphenylzinn) gegen Schnecken, Piscizide (Rotenon, Natriumpentachlorphenat) zur Fischbekämpfung, Betäubungsmittel und Psychopharmaka (Tricain, Benzocain, Chlorpromazin u.a.) zur Beruhigung beim Abfischen, Transport oder Sortieren und Düngemittel (Mist, Fäkalien, Klärschlamm und Mineraldünger) zur Förderung des Wachstums des Phytoplanktons zum Einsatz und können als Rückstände in das Lebensmittel gelangen. (N.N., 2000a)

### 4.3.3 Parasiten

Für den Menschen gefährliche Parasiten treten bei Fischen auf. Die Fische sind hierbei in der Regel der Zwischenwirt und fleischfressende Säugetiere, und damit auch der Mensch, sind die Endwirte. Zu nennen sind hierzu die **Nematodenlarven**



der Anisakis-Familie (*Anisakis simplex*, Heringswurm) und von *Pseudoterranova decipens*, Kabeljauwurm, weiterhin **Zestodenlarven** (Finnen) von *Diphyllobothrium* sp. sowie **Trematoden-Zysten** mit invasionsreifen Jungegehn (Metazerkarien) von *Nanophyetus salmincola*, *Opisthorchis felineus* (Katzenegel) und *Clonorchis sinensis* (Lungenegel) (TÜLSNER, 1994, FEHLHABER und JANETSCHKE, 1992).

#### 4.3.4 Toxine

Verschiedene Verderbniserreger bilden durch Decarboxylierung schnell verwertbarer freier Aminosäuren biogene Amine wie **Histamin** (aus Histidin), **Cadaverin** (aus Lysin) und **Putrescin** (aus Ornithin). Biogene Amine rufen akute Vergiftungserscheinungen hervor. Histamin zum Beispiel verursacht nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten Kopfschmerzen, Erbrechen, Bauchschmerzen, Durchfall und Hautrötungen, Nesselsucht, Juckreiz und Kreislaufstörungen, Schwindel und Empfindungsstörungen. Da die histidinreichen makrelenartigen Fische besonders häufig zu Histaminosen führen, spricht man in englischsprachigen Raum auch von „Scombroid Poisoning“ (TÜLSNER, 1994).

**Tetrodotoxin** ist ein potentes Neurotoxin. Es blockiert die Natriumkanäle der Nervenzellen. Man findet dieses Toxin in Fischen der Gattung *Tetraodontiformes*, Pufferfische, mit dem Kugelfisch, **Fugu**, als bekanntesten Vertreter aber auch in vielen anderen Meeresorganismen (Fische, Oktopus, Krabben und Muscheln) sowie in Giffröschen und Salamanderarten. Das Gift wird von in Symbiose lebenden Bakterien, darunter Stämme der Familie der *Vibrionaceae* sowie *Pseudomonas* sp. und *Photobacterium phosphoreum* gebildet. Die meisten Vergiftungsfälle gibt es in Japan nach dem Verzehr des Fugu-Fisches. Außerhalb der Indo-Pazifischen Region sind die Fälle nur rar. Zwanzig Minuten bis drei Stunden nach Verzehr treten die ersten Symptome, Taubheit von Lippen und Zunge, auf. Es breitet sich eine Parästhesie und schließlich Paralyse über den Körper aus. Es kommt zu Atem- und Kreislaufproblemen und völliger Lähmung bei vollem Bewusstsein. Die Mortalitätsrate liegt bei etwa 50 Prozent (JOHNSON, 2002).

**Ciguatera** ist eine Vergiftungserkrankung, die durch Ciguatoxin ausgelöst wird. Ciguatoxin wird von *Gambierdiscus toxicus* (Dinoflagellaten, einzellige Algen, Phytoplankton) gebildet. Algenfressende Fische nehmen dieses und auch weitere Toxine, zum Beispiel Maitotoxin, mit dem Futter auf und speichern sie in Leber und Intestinum. Nach Verzehr von am Ende der Nahrungskette stehenden Raubfischen tropischer und subtropischer, also algenreicher, Gewässer führt das als Cholinesterasehemmer wirkende Ciguatoxin zunächst zu gastrointestinalen Störungen und später zu neurologischen Symptomen. Maitotoxin wirkt kontrahierend auf die glatte Muskulatur. Die Toxine sind thermostabil und werden weder durch Garen noch durch andere Zubereitungsverfahren inaktiviert.

Dinoflagellaten aber auch Kiesel- und Blaualgen bilden vor allem in der Algenblütezeit noch weitere Toxine (**Muscheltoxine / Algentoxine**), die von Muscheln aufgenommen und angereichert werden. Diese Toxine scheinen für Muscheln ungefährlich zu sein, führen beim Menschen jedoch zu verschiedenen Vergiftungserscheinungen:

Amnesic Shellfish Poisoning (ASP),  
Paralytic Shellfish Poisoning (PSP),  
Neurotoxic Shellfish Poisoning (NSP) und  
Diarrheic Shellfish Poisoning (DSP)

Im Jahre 1987 erkrankten 156 Personen nach dem Verzehr von Miesmuscheln, die in Ostkanada geerntet worden waren, an **Amnesic Shellfish Poisoning (ASP)**. Die Vergiftung wird durch Domoinsäure verursacht. Domoinsäure wird von im Ozean lebenden Kieselalgen (*Nitzschia pungens*) gebildet. Sie ähnelt dem Neurotransmitter Glutamat. ASP ist gekennzeichnet durch Gastrointestinalstörungen, die nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden auftreten, und neurologische Symptome, wie Kopfschmerz, Gedächtnisverlust, Desorientierung und in schweren Fällen Schlaganfall und Koma, welche nach 48 Stunden auftreten. Vor allem ältere Patienten erleiden schwerere Symptome (USFDA, 1992, ARNOLD, 2001).

Das von Dinoflagellaten (*Gonyaulx*-Arten, „red tide“) gebildete Saxitoxin verursacht die Vergiftungserkrankung **Paralytic Shellfish Poisoning (PSP)**. Saxitoxin blockiert die Natriumkanäle an Nerven- und Muskelzellen. PSP ist gekennzeichnet durch Parästhesien beginnend an Lippen, Zunge und Zahnfleisch, die sich bis in die distalen Extremitäten ausbreiten. Weiterhin kommt es zu Schwindel, Kopfschmerz, Ataxie, Paralysen und Muskelschwäche, die bis zu Wochen anhalten kann. In schweren Fällen kommt es zu Atemlähmung und Tod.

Die Vergiftungserkrankung **Neurotoxic Shellfish Poisoning (NSP)** verläuft wesentlich milder als PSP. Sie wird durch Brevetoxin B, von in Küstenregionen Mittelamerikas vorkommenden Dinoflagellaten (Feueralgen, *Gymnodium breve*) gebildet, verursacht und geht mit Gastrointestinalstörungen, Parästhesien, Myalgie, Ataxie und Heiß-Kalt-Empfindungsumkehr einher. Die Inkubationszeit ist kurz und liegt zwischen einigen Minuten und wenigen Stunden. Die Erkrankung klingt schon nach einigen Stunden bis wenigen Tagen ab. Brevetoxin B führt außerdem zu Fisch- und Seevogelmassensterben.

**Diarrheic Shellfish Poisoning (DSP)** wird durch eine Gruppe von hochmolekularen Polyetherverbindungen, darunter Okadarsäure, Pectenotoxin, Yessotoxin und einen Toxinkomplex, oder Dinophysis - Toxin, ausgelöst. Die Toxine werden von Dinoflagellaten der Gattung *Dinophysis* gebildet. Okadarsäure bindet an die Darmepithelzellen und erhöht ihre Permeabilität. Es kommt bald (nach etwa 30 Minuten) nach dem Verzehr kontaminierter Muscheln zu einer Gastroenteritis, die nach ein bis zwei Tagen wieder abklingt. Die Erkrankung tritt in Europa nur sporadisch auf und ist in der Regel nicht lebensbedrohlich.

### 4.3.5 Viren

Das **Hepatitis A Virus** gehört zu der Familie der *Picornaviridae*, Genus Hepatovirus. Das **Norwalk Virus** gehört zur Familie der *Caliciviridae*. Beide sind weltweit verbreitet und der Mensch bildet das natürliche Reservoir. Die Übertragung erfolgt jeweils fäkal-oral durch kontaminierte Lebensmittel, Wasser und Meeresfrüchte, vor

allen Muscheln. Bei Kindern verläuft die Infektion mit dem Hepatitis A Virus symptomarm oder symptomlos. Bei Erwachsenen kommt es zu einer Hepatitis, die in der Regel nach zwei bis drei Wochen vollständig wieder abklingt. Das Norwalk Virus führt zu akut verlaufenden Gastroenteritiden (ROBERT KOCH INSTITUT, 2000a, ROBERT KOCH INSTITUT, 2001a).

#### **4.3.6 Bakterien**

Meeresfrüchte können zu Überträgern von bakteriellen Infektionen oder Intoxikationen nach Kontamination durch Menschen, Geräte und Einrichtungen (*Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, Salmonellen, Shigellen, *Staphylococcus aureus*) oder nach Kontamination infolge Gewässerverunreinigung durch infizierte Abwässer (Salmonellen, *Vibrio cholerae* O1 bzw. O139) oder aber durch natürlich vorhandene Bakterien, wie *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae* non O1, *Vibrio vulnificus* und andere *Vibrio* sp. werden (TÜLSNER, 1994).

## 5 VIBRIONEN

1773 beschrieb MÜLLER Keime mit starrem geraden oder gekrümmten Zelleib, die ihm durch ihre vibrierenden Bewegungen in Wassertröpfchen aufgefallen waren (ROLLE und MAYR, 1993).

### 5.1 Taxonomie und Eigenschaften

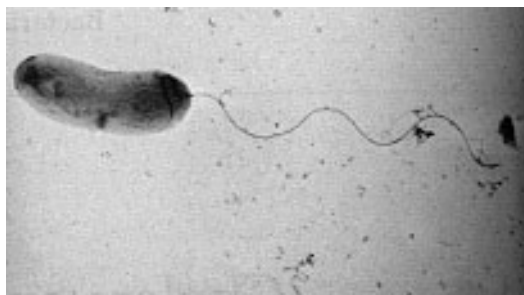
*Vibrio* gehört mit seinen zur Zeit 41 identifizierten Spezies (VENKATESWARAN, 1999) zusammen mit *Photobacterium*, *Aeromonas* und *Plesiomonas* zur Familie der *Vibrionaceae*, welche wiederum zusammen mit den Familien der *Enterobacteriaceae* und *Pasteurellaceae* und anderen Genera im Bergey's Manual of Systematic Bacteriology zur Sektion 5 „fakultativ anaerobe gramnegative Stäbchen“ zusammengefasst werden. Die Familie der *Vibrionaceae* wurde im Jahre 1965 durch VÉRON als eine Gruppe von Genera meist Oxidase-positiver und durch polare Begeißelung beweglicher Spezies von den Oxidase-negativen und durch peritriche Begeißelung beweglichen *Enterobacteriaceae* abgegrenzt.

Die **Familie *Vibrionaceae*** umfasst nicht sporenbildende, gramnegative, gerade oder gebogene, bewegliche Stäbchen mit polarer Begeißelung. Unter bestimmten Bedingungen, wie zum Beispiel die Kultivierung auf festen Nährmedien, werden zusätzliche laterale Geißeln ausgebildet. Die Bakterien sind vom chemoorganotrophen Ernährungstyp, und als fakultative Anaerobier zum oxidativen und fermentativen Stoffwechsel fähig. Sie zeigen keine Denitrifikation. Die meisten Spezies sind Oxidase-positiv. Alle Spezies nutzen D-Glukose als einzige oder wichtigste Kohlenstoff- und Energiequelle. Die meisten Spezies nutzen Ammoniumsalze als einzige Stickstoffquelle. Zwei bis drei Prozent Kochsalzgehalt oder eine Seewassergrundlage im Nährmedium sind für die meisten Spezies obligat für das Wachstum. Zahlreiche Spezies sind für den Menschen, für Fische, Aale, Frösche und andere Wirbeltiere und wirbellose Tiere pathogen (BAUMANN et al.,

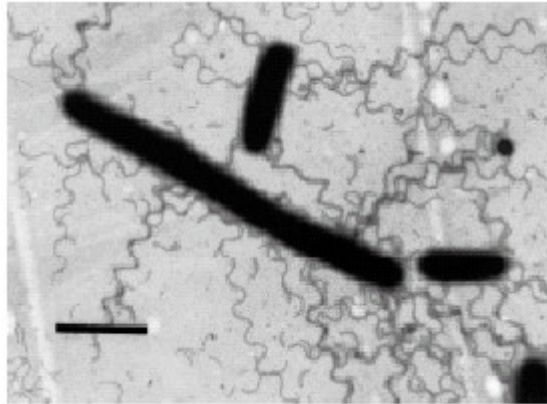
1984). VENKATESWARAN (1999) wies darauf hin, dass auf der Basis phylogenetischer rRNA-Daten Fisch- und Meeresfrucht-pathogene Vibrionen wie *V. anguillarum*, *V. aestuarianus*, *V. ordalii*, *V. pelagius* und *V. tubiashii* zum Genus *Listonella* und lumineszierende Vibrionen wie *V. damsela*, *V. fisheri*, *V. iliopiscarium* und *V. logei* zum Genus *Photobacterium* transferiert wurden (VENKATESWARAN, 1999).

Das **Genus *Vibrio*** umfasst gerade oder gebogene Stäbchen von 0,5 bis 0,8 Mikrometern Dicke und 1,4 bis 2,6 Mikrometern Länge. Unter ungünstigen Umweltbedingungen / Wachstumsbedingungen werden die Zellenformen jedoch unregelmäßig und schließlich kokkoid. Sie bilden weder Endosporen noch Mikrozysten aus und sind gramnegativ. In flüssigen Medien bilden sie polar eine (**Abbildung 7**) oder mehrere Geißeln aus, die von einer Hülle, bestehend aus der äußeren Zellmembran, umgeben sind. Auf festen Medien werden zusätzlich zahlreiche kürzere, nicht umhüllte Lateralgeißeln ausgebildet (**Abbildung 8**). Mit Hilfe dieser Lateralgeißeln sind viele marine Vibrionen fähig, auf festen Nährmedien zu schwärmen. Neben Geißeln wurden bei einigen Spezies (zum Beispiel *V. cholerae*) auch Fimbrien nachgewiesen.

**Abbildung 7: *Vibrio cholerae* (TODAR, 2000)**



**Abbildung 8: *V. parahaemolyticus* mit ausgebildeten Lateralgeißeln  
(MC CARTER, 1999)**



Vibrionen sind fakultativ anaerob und zu fermentativem und respiratorischem **Stoffwechsel** fähig. Sie sind chemoorganotroph und können in Mineralmedien allein mit dem Zusatz von D-Glukose und  $\text{NH}_4\text{Cl}$  wachsen. Wenige Stämme benötigen jedoch zusätzlich organische Wachstumsfaktoren, wie bestimmte Aminosäuren. Kochsalz stimuliert das Wachstum aller Spezies und ist für fast alle Spezies essentiell für das Wachstum. *V. cholerae* und *V. mimicus* können auch ohne Kochsalzzusatz wachsen. *V. metschnikovii* benötigt nur wenig  $\text{Na}^+$  während *V. costicola* hohe  $\text{Na}^+$ -Gehalte benötigt. Für jede Spezies ist die optimale Kochsalzkonzentration eine andere und von der übrigen Zusammensetzung des Nährmediums und von sonstigen Umweltfaktoren abhängig. Der optimale Kochsalzgehalt liegt bei etwa 2 - 4 Prozent. Der optimale pH - Bereich liegt etwa zwischen 7,5 und 8,5. Wachstum ist je nach Spezies von pH 5 bis pH 11 möglich. Vibrionen sind empfindlich gegenüber saurem Milieu. Die Fermentation von D-Glukose führt zu Säurebildung und fast ausnahmslos nicht zu Gasbildung. Alle Vibrionen nutzen D-Glukose, D-Fruktose, Maltose und Glyzerol. Sie sind bis auf *V. metschnikovii* Oxidase-positiv.

Auf verschiedenen Nähragar oder Blutagar mit einem Gehalt von mindestens 0,5 Prozent Kochsalz wachsen Vibrionen als gewölbte, glatte, cremeweiße Kolonien mit glattem Rand. *V. nigripulchritudo* produziert ein unlösliches blauschwarzes Pigment, welches innerhalb der Kolonie als schwarze Punkte auskristallisiert. *V. gazogenes*

bildet ein rotes Pigment. Nach drei bis vier Tagen Bebrütung auf einem festen Medium bilden *V. fischeri* und *V. logei* ein zellgebundenes gelborangenes Pigment. Einige Stämme von *V. cholerae*, *V. harveyi*, *V. splendidus*, *V. fischeri* und *V. logei* zeigen Biolumineszenz und emittieren blaugrünes Licht. Die Entstehung des Lichts beruht auf einer Reaktion, die durch das Enzym Luziferase katalysiert wird (BAUMANN et al., 1984).

Die wichtigsten kulturellen und biochemischen Eigenschaften sind in den nachfolgenden **Tabellen** wiedergegeben.



**Tabelle 2: Verschiedene Eigenschaften von Spezies und Biovarien des Genus *Vibrio* (nach BAUMANN et al., 1984)**

Eigenschaften	<i>V. cholerae</i>	<i>V. metschnikovii</i>	<i>V. campbellii</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>V. alginolyticus</i>	<i>V. vulnificus</i>	<i>V. fluvialis</i>	<i>V. furnissii</i>	<i>V. anguillarum I</i>	<i>V. anguillarum II</i>
Arginindihydrolase	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
Oxydase	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Gas aus D-Glukose	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Voges Prosgauer	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-
Na <sup>+</sup> notwendig	-	d	+	+	+	+	+	+	+	+
Wachstum bei +4°C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Wachstum bei +30°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Wachstum bei +40°C	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-
Amylase	+	+	+	+	+	+	+	d	+	-
Gelatinase	+	+	+	+	+	+	+	d	+	+
Lipase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Chitinase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	d
L-Arabinose	-	-	-	d	-	-	+	+	+	-
D-Mannose	d	d	d	+	d	+	+	d	-	+
D-Galaktose	+	d	-	+	d	+	+	+	d	-
Saccharose	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+
Cellobiose	-	-	d	-	-	+	d	d	+	-
Laktose	-	d	-	-	-	d*	-	-	-	-
Citrat	d	d	d	+	+	+	+	+	+	+

+ 90 % oder mehr der Stämme sind positiv

- 90 % oder mehr der Stämme sind negativ

d 11-89 % der Stämme sind positiv

d\* Wildstämme können Laktose nicht abbauen; viele Stämme erreichen diese Fähigkeit schnell durch Mutation.

**Tabelle 3: Verschiedene Eigenschaften von *Vibrio* sp. und verwandten Genera (nach BAUMANN et al., 1984)**

Eigenschaften	<i>V. cholerae</i>	<i>V. metschnikovii</i>	<i>V. campbellii</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>V. alginolyticus</i>	<i>V. vulnificus</i>	<i>V. fluvialis</i>	<i>V. furnissii</i>	<i>V. anguillarum</i> I	Aeromonas	Plesiomonas
Thornley Aginin	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
Lysindecaboxylase	+	d	+	+	+	+	-	-	-	D	+
Ornithindecaboxylase	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+
Gas aus Glukose	-	-	-	-	-	-	-	+	-	D	-
Säure aus L-Arabinose	-	-	-	d	-	-	+	+	d	D	-
Säure aus Inositol	-	d	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Säure aus Salicin	-	-	-	-	-	+	+	-	-	D	-
Säure aus Saccharose	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-
Voges-Proskauer (24 h)	d	+	d	-	+	-	-	-	+	D	-
ONPG-Hydrolyse (24 h)	+	d	-	-	-	+	+	+	+	+	+
Wachstum bei +43°C	+	d	-	+	+	+	d	-	-	D	+
Inhibition durch O/129 10 µg	S	S	S	R	R	S	R	R	S	R	d
150 µg	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S
Wachstum bei 0% NaCl	+	d	-	-	-	-	d	d	d	+	+
Wachstum bei 3% NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Wachstum bei 6% NaCl	-	+	+	+	+	+	+	+	d	-	-
Wachstum bei 8% NaCl	-	d	-	+	+	-	d	d	-	-	-
Wachstum bei 10% NaCl	-	-	-	-	+	-	d	-	-	-	-
Äsculinhydrolyse	-	d	-	-	-	-	d	-	-	D	-
Oxidase	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> zu NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Wachstum auf TCBS	gelb	grün	grün	grün	gelb	grün	gelb	gelb	gelb	-	-

- + 90 % oder mehr der Stämme sind positiv
- 90 % oder mehr der Stämme sind negativ
- d 11 - 89 % der Stämme sind positiv
- D verschiedene Reaktionen in verschiedenen Taxa
- S sensitiv
- R resistent
- O/129 2,4-diamino-6,7-diospropylpteridinphosphat

**Tabelle 4: Eigenschaften pathogener Vibrionen nach Oliver und Kaper (1997) (VENKATESWARAN, 1999)**

Eigenschaften	<i>V. alginolyticus</i>	<i>V. cholerae</i>	<i>V. fluvialis</i>	<i>V. furnissii</i>	<i>V. hollisae</i>	<i>V. metschnikovii</i>	<i>V. mimicus</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>V. vulnificus</i>	<i>V. damsela</i>
Oxidase	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
Indol	v	+	-	v	+	v	+	+	+	-
Voges-Proskauer	+	v	-	-	-	+	-	-	-	+
Simmons-Citrat	v	v	+	+	-	+	v	+	+	-
Lysin	+	+	-	-	-	v	+	+	+	v
Ornithindcarboxylase	v	+	-	-	-	-	+	+	+	-
Aginindihydrolase	-	-	+	+	-	v	-	-	-	+
Saccharose-Fermentation	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-
Lactose-Fermentation	-	(+)	-	-	-	v	(+)	-	+	-
L-Arabinose-Fermentation	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-
D-Mannitol-Fermentation	+	+	+	+	-	+	+	+	v	-
Maltose-Fermentation	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Cellobiose-Fermentation	-	-	v	v	-	-	-	-	+	-
Salicin-Fermentation	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Gas aus Glukose	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Nitrat zu Nitrit	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
Gelatinase	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
Wachstum bei 0% NaCl	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-
Wachstum bei 3% NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Wachstum bei 6% NaCl	+	-	+	+	+	+	-	+	v	+
Wachstum bei 10% NaCl	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

- + 90 % oder mehr der Stämme sind positiv
- 90 % oder mehr der Stämme sind negativ
- v variable Reaktion
- (+) positive Reaktion verzögert  $\geq 3$  Tage

## 5.2 Ökologie

Vibrionen gehören zur Bakterienflora der Meere weltweit. Sie kommen im freien Wasser, im Sediment oder assoziiert an Plankton, Seefisch und Krusten- und Schalentieren vor. Wegen ihrer verschiedenen Ansprüche an die Salzkonzentration und an andere Umweltbedingungen bewohnen die verschiedenen Spezies unterschiedliche aquatische Lebensräume. *V. cholerae* und *V. metschnikovii* benötigen nur relativ geringe Salzkonzentrationen (5 – 15 mM Na<sup>+</sup>) für optimales Wachstum. Diese beiden Spezies können daher sowohl aus Süßwasser als auch aus Flußmündungsgebieten isoliert werden. Im Gegensatz dazu liegt die optimale Salzkonzentration für *V. costicola* bei 600 bis 700 mM Na<sup>+</sup> (BAUMANN, 1984). Besonders verbreitet sind Vibrionen in Küstengewässern. Sie sind aus dem Wasser warmer, tropischer Regionen und in gemäßigten Zonen in den Sommermonaten nachweisbar. In den kühleren Monaten bei Wassertemperaturen unter 10°C sind sie im Wasser nicht nachweisbar, da sie sich zum Überwintern in das Bodensediment zurückziehen oder durch metabolische und ultrastrukturelle Veränderung in einen Zellschlaf eintreten (dormant, viable but nonculturable state) (DESMARCHELIER, 1999, OLIVER et al., 1995).

## 5.3 Infektionen des Menschen

Zu Infektion des Menschen kommt es durch direkten Kontakt mit Wasser oder indirekt über kontaminierte Lebensmittel oder kontaminiertes Trinkwasser. Lebensmittelinfektionen mit Vibrionen kommen in den meisten Ländern nur sporadisch vor, bestimmte Länder aber haben ein höheres Auftreten durch kulturelle Eßgewohnheiten (z.B. Japan) oder endemische Krankheitsherde infolge schlechter Entsorgung und Hygiene (Choleragebiete).

Infektionen mit Vibrionen lassen sich in zwei große Gruppen einteilen:

Vibrio cholera - Infektionen und  
noncholera Vibrio - Infektionen.

Da die meisten dieser Infektionen mit der Aufnahme kontaminierter Lebensmittel in Zusammenhang stehen, sind Vibrio-Infektionen in erster Linie Lebensmittelinfektionen. Vibrionen produzieren eine Reihe verschiedener extrazellulärer zytolytischer Toxine oder Zytotoxine und Enzyme, die zu schweren Gewebszerstörungen führen und eine wichtige Rolle bei der Entstehung einer Septikämie spielen (HOI HO, 2001) (Tabelle 5).

**Tabelle 5: Noncholera Vibrionen und durch ihre Toxine hervorgerufene Erkrankungen (HOI HO, 2001)**

<b>Klinische Symptome</b>	<b>Noncholera Vibrionen</b>	<b>Cytotoxine / Enzyme</b>
Gastroenteritis	<i>V. alginolyticus</i> <i>V. cholerae</i> non O1 <i>V. fluvialis</i> <i>V. furnissii</i> <i>V. hollisae</i> <i>V. mimicus</i> <i>V. parahaemolyticus</i> <i>V. vulnificus</i>	Cytotoxin Hämolysin
Wundinfektion	<i>V. alginolyticus</i> <i>V. cholerae</i> non O1 <i>V. carchariae</i> <i>P. damsela</i> <i>V. fluvialis</i> <i>V. mimicus</i> <i>V. parahaemolyticus</i> <i>V. vulnificus</i>	Protease Hämolysin Lipase DNAse Cytolysin
Septikämie	<i>V. cholerae</i> non O1 <i>V. cincinnatiensis</i> <i>P. damsela</i> <i>V. fluvialis</i> <i>V. vulnificus</i>	Protease endotoxische Lipopolysaccharide

Nachfolgende **Tabelle** bietet einen Überblick darüber, welche Erkrankungen die verschiedenen *Vibrio* sp. beim Menschen verursacht haben.

**Tabelle 6: Vibrionen und durch sie hervorgerufene Erkrankungen des Menschen (ELISA et. al., 2001)**

Species	Gastro-enteritis	Wundinfektion	Ohr-Infektion	Primäre Septikämie	Sekundäre Septikämie
<i>V. alginolyticus</i>	(+)	++	++	+	
<i>V. carchariae</i>		+			
<i>V. cholerae</i> non-O1	+++	++	+	+	+
<i>V. cholerae</i> O1	+++	+			
<i>V. cincinnatiensis</i>			+		
<i>V. damsela</i>		++			
<i>V. fluvialis</i>	++				
<i>V. furnissii</i>	(+)				
<i>V. hollisae</i>	++			+	
<i>V. metschnikovii</i>	(+)			(+)	
<i>V. mimicus</i>	++		+		
<i>V. parahaemolyticus</i>	+++	+	+		+
<i>V. vulnificus</i>	+	++		++	++

+++ häufig berichtet  
 ++ weniger häufig berichtet (6-100 Berichte)  
 + selten berichtet (1-5 Berichte)  
 (+) unklarer Zusammenhang

Die durch Vibrionen ausgelösten **Erkrankungen** des Menschen können in zwei Gruppen eingeteilt werden:

Intestinalinfektionen, wie Gastroenteritis, Durchfall, Übelkeit und Erbrechen, und Extraintestinalinfektionen, wie primäre Septikämien.

Während die Intestinalinfektionen nicht mit bestimmten Risikofaktoren zusammenzuhängen scheinen, stehen die durch *V. cholerae* non O1, *V. parahaemolyticus* und *V. vulnificus* verursachten primären Septikämien mit verschiedenen Risikofaktoren, wie Lebererkrankungen, Immunerkrankungen, HIV-Infektion, Diabetes mellitus, Kortisonbehandlung oder Chemotherapie in Zusammenhang (POWELL, 1999).

## **5.4 Humanpathogene *Vibrio* sp.**

### **5.4.1 *Vibrio alginolyticus***

*V. alginolyticus* wurde häufig aus der marinen Umwelt isoliert. Wegen seiner Ähnlichkeit mit *V. parahaemolyticus* wurde es zunächst als Biotyp 2 von *V. parahaemolyticus* angesehen, dann aber als eigenständige Spezies abgegrenzt. Es wird von den meisten Autoren als pathogene Vibriospezies, besonders als Wund- und Ohrinfektionserreger, aufgeführt (FARMER III et al., 1985). 1973 wurde die Humanpathogenität von *V. alginolyticus* festgestellt. *V. alginolyticus* ist vor allem ein Wundinfektionserreger. Es wurde aber auch bei Ohrinfektionen, Conjunctivitis und einer Reihe von Gastroenteritiden isoliert. Bei einem AIDS-Patienten verursachte *V. alginolyticus* eine chronische Diarrhoe (DANIELS und SHAFIAE, 2000).

### **5.4.2 *Vibrio mimicus***

Die Eigenschaften von *V. mimicus* und *V. cholerae* sind sehr ähnlich, woraus sich auch der Name für *V. mimicus* ergeben hat. DAVIS et al. (1981) untersuchte untypische Stämme von *V. cholerae* und konnte einen neuen Stamm, *V. mimicus* herausarbeiten. *V. mimicus* ist wie *V. cholerae* nicht halophil und somit ebenfalls nicht auf Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> und Mg<sup>++</sup> angewiesen. Beide Arten besitzen ein identisches H-Antigen. *V. mimicus* fermentiert jedoch im Gegensatz zu *V. cholerae* keine Saccharose und bildet kein Acetoin aus Glukose (Voges-Proskauer-negativ).

*V. mimicus* verursacht Gastroenteritiden mit Durchfall nach dem Verzehr von Meeresfrüchten, insbesondere rohen Austern, und Ohrinfektionen (Mittelohrentzündungen) nach Kontakt mit Salz- beziehungsweise Brackwasser (DANIELS und SHAFIAE, 2000, BAUMGART, 1998, FARMER III et al., 1985).

### 5.4.3 *Vibrio fluvialis*

*V. fluvialis* wurde 1975 erstmals als Auslöser einer Durchfallerkrankung identifiziert. Die größte Serie von *V. fluvialis* - Infektionen gab es in Bangladesh, bei der 500 Patienten betroffen waren. Die Hälfte davon waren Kinder. Die Patienten litten unter zumeist blutigen und schmerzhaften Durchfällen und Erbrechen, die zu Dehydratation und zum Teil Fieber führten. *V. fluvialis* ist biochemisch *Aeromonas hydrophila* sehr ähnlich. Eine Differenzierung ist jedoch aufgrund des Wachstums bei 6 % NaCl und der Sensitivität gegenüber dem Vibriostatikum O/129 möglich (DANIELS und SHAFIAE, 2000). Bei Schweinen und Rindern war *V. fluvialis* auch in Feten und Plazenten nach Aborten nachweisbar (STEPHAN et al., 2002).

LEE et al. gaben im Jahre 1981 einer Gruppe halophiler Vibrionen, die weltweit aus verschiedenen Umweltproben und auch aus Durchfallpatienten isoliert worden waren und unter der Bezeichnung „group F vibrios“ und „group EF6“ bekannt waren, den Namen *V. fluvialis*. LEE et al. teilten *V. fluvialis* anhand ihrer Herkunft und verschiedener biochemischer Eigenschaften in zwei Biogruppen (synonym Biovare) ein. *V. fluvialis* Biogruppe I bildet kein Gas aus Glukose und kann sowohl aus Umweltproben als auch Stuhlproben isoliert werden. *V. fluvialis* Biogruppe II bildet Gas aus Glukose und wurde nur in Umweltproben aber nicht in Stuhlproben nachgewiesen. Zwei Jahre später grenzten BRENNER et al. bestimmte Stämme aus der *V. fluvialis* Biogruppe II als neue Vibriospezies, *V. furnissii*, ab (FARMER III et al., 1985).



#### **5.4.4 *Vibrio furnisii***

*V. furnisii* bildet Gas aus Glukose und war wegen der großen Ähnlichkeit zunächst als „*V. fluvialis* Biogruppe II“, „*V. fluvialis* aerogenic“ oder „*V. fluvialis* gas<sup>+</sup>“ eingestuft worden. Durch genetische Analyse wurde es 1983 als eigenständige Spezies herausgestellt. Es wurde nachträglich als Auslöser zweier Gastroenteritisausbrüche 1969 auf einem Flugzeug identifiziert, welches sich mit amerikanischen Touristen auf dem Heimweg aus dem Orient befand. Bei einem Cholera-Überwachungsprogramm in Peru wurde es 1994 bei 14 Patienten isoliert. Sechs der Patienten hatten Durchfall und acht Patienten zeigten keine Symptome (DANIELS und SHAFIIE, 2000, FARMER III et al., 1985). *V. furnisii* wurde außerdem in Feten und Plazenten von Schweinen und Rindern nach Aborten sowie in Kotproben von Schweinen nachgewiesen (STEPHAN et al., 2002).

#### **5.4.5 *Vibrio damsela***

*V. damsela* ist ein Wundinfektionserreger ähnlich *V. vulnificus*. Zu Infektionen kommt es nach Kontakt offener Wunden mit Brackwasser oder durch Verletzungen an Salzwassertieren. Der Verlauf der Infektion kann, auch bei immunkompetenten Personen, schwer oder gar tödlich sein (DANIELS und SHAFIIE, 2000). Bei Fischen verursacht *V. damsela* Hautläsionen. Erstmals wurde *V. damsela* 1981 von LOVE et al. aus einer Hautläsion eines Fisches von der Kalifornischen Küste isoliert. Dieses Isolat vermochte beim Damsselfisch Hautläsionen hervorzurufen (FARMER III et al., 1985).

#### **5.4.6 *Vibrio hollisae***

*V. hollisae* wurde erstmals 1982 von HICKMAN et al. aus Stuhlproben von Durchfallpatienten isoliert und beschrieben. Es ist ein Auslöser von Gastroenteritiden mit Durchfall. Nur selten werden Wundinfektionen oder Septikämien beobachtet. MORRIS et al. beschrieben einen Fall, in dem *V. hollisae* aus einer Blutkultur eines

Patienten mit Leberzirrhose, hepatischer Enzephalopathie, Bronchopneumonie und Cryptococcose-Sepsis isoliert werden konnte. Da *V. hollisae* nur schlecht auf dem Selektivnährmedium TCBS wächst, ist eine Isolation mit diesem Medium schwierig und die Gefahr gegeben, dass ein Nachweis nicht gelingt (DANIELS und SHAFIAE, 2000, FARMER III et al., 1985).

#### **5.4.7 *Vibrio metschnikovii***

1884 wurde *V. metschnikovii* aus einem Vogel, der an einer choleraähnlichen Erkrankung verendet war, zum ersten Mal isoliert und als neue Spezies beschrieben. Es wird häufig in Umweltproben (Flusswasser, Abwasser), und auch in Krusten- und Schalentieren aber nur selten in Proben von Patienten nachgewiesen. Der erste Nachweis beim Menschen gelang aus einer Blutkultur einer 82 Jahre alten Frau mit Peritonitis und Gallenblasenentzündung. *V. metschnikovii* wurde auch aus Urinproben und nicht heilenden Wunden (Ulcera) isoliert (FARMER III et al., 1985). Bei einem Cholera-Überwachungsprogramm in Peru fand man es bei fünf Kindern mit Durchfall (DANIELS und SHAFIAE, 2000). *V. metschnikovii* ist der Erreger einer choleraartigen Gastroenteritis des Geflügels (vor allem bei Hühnern, Truthühnern, Fasanen und Sonnenvögeln). Betroffen sind besonders, durch zum Beispiel Transport oder Hitze, abwehrgeschwächte Jungvögel in den Sommermonaten (ROLLE und MAYR, 1993). KRAUSE und WINDRATH (1919) untersuchten die Eigenschaften von *V. metschnikovii*, den sie im Jahre 1914 aus verendeten Sonnenvögeln (chinesische Nachtigall) isoliert hatten, und wiesen die Pathogenität dieses Stammes für Tauben, Mäuse, Ratten und Meerschweinchen nach. STEPHAN et al. (2002) konnten in einer Untersuchungsreihe von Juli 1998 bis Ende März 2000 zum Vorkommen von halophilen und humanpathogenen Vibrionen in deutschen Nutztierbeständen *V. metschnikovii* häufig (73 Isolate) aus Feten und Plazenten von Schweinen, Rindern und Pferden nach Aborten und aus dem Darminhalt von verendeten oder zur Diagnostik getöteten Entenküken und Gänsen isolieren.

## 5.4.8 *Vibrio cincinnatiensis*

*V. cincinnatiensis* wurde bisher nur einmal beim Menschen nachgewiesen. 1986 wurde es aus der Cerebrospinalflüssigkeit und aus dem Blut eines Patienten mit zentralnervösen Störungen (Orientierungslosigkeit) an der Universität von Cincinnati isoliert. Der Patient war zwar Alkoholiker, hatte aber keine Leberschädigung. Ein Kontakt zu Seewasser oder Meeresfrüchten konnte nicht nachvollzogen werden (DANIELS und SHAFIAE, 2000). *V. cincinnatiensis* war in einer Untersuchungsreihe von Juli 1998 bis Ende März 2000 zum Vorkommen von halophilen und humanpathogenen Vibrionen in deutschen Nutztierbeständen am häufigsten (98 Isolate) nachweisbar. Die Isolierung gelang aus Feten und Plazenten von Schweinen, Rindern und Pferden nach Aborten und aus einer Kot- und einer Vaginalsekretprobe sowie aus dem Gehirn von einem Flugentenküken und einer Gans (STEPHAN et al., 2002).

Von den mit Erkrankungen des Menschen in Zusammenhang gebrachten (humanpathogenen) Vibrionen besitzen *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* und *V. vulnificus* die größte Bedeutung.

## 5.4.9 *Vibrio cholerae*

### 5.4.9.1 Charakteristische Eigenschaften

Im Gegensatz zu allen übrigen Vibrionen, außer *V. mimicus*, ist *V. cholerae* nicht auf  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  und  $\text{Mg}^{++}$  angewiesen, sodass es auch in Medien ohne Kochsalzzusatz wachsen kann. Optimale Wachstumsbedingungen liegen bei einem Kochsalzgehalt von 0,5 Prozent (Bereich 0,1 - 4,0 %), bei einer Temperatur von 37°C und einem aw-Wert von 0,984 vor (ICMSF, 1996). *V. cholerae* fermentiert Saccharose, wodurch es sich von *V. mimicus* (Saccharose-negativ) unterscheidet. Von *Aeromonas* und *Plesiomonas* unterscheidet sich *V. cholerae* durch folgende Decarboxylase-

Kombination: Arginin-negativ, Lysin-positiv und Ornithin-positiv (FARMER III et al., 1985).

### 5.4.9.2 Nomenklatur

Auf der Basis des somatischen O-Antigens werden zahlreiche Serovare bzw. Serogruppen von *V. cholerae* unterschieden. Zur Zeit sind 155 Serogruppen bekannt. Die zwei Haupt-Serovare sind *V. cholerae* O1 und *V. cholerae* non O1, die auch als „non-cholera“-Vibrionen (NCV) oder „non-agglutinating“-Vibrionen (NAG) bezeichnet werden (VARNAM und EVANS, 1991). Bei *V. cholerae* O1 werden anhand einiger biochemischer Eigenschaften und ihrer Empfindlichkeit gegenüber Bakteriophagen (**Tabelle 7**) die zwei Biovare *V. cholerae classical* und *V. cholerae eltor* (El Tor) differenziert, sowie die drei Antigen-Varianten (Serotypen) Ogawa und Inaba und der selten vorkommende Serotyp Hikojima unterschieden (FARUQUE et al., 1998).

**Tabelle 7: Differenzierung zwischen den Biovaren *V. cholerae classical* und *V. cholerae eltor* (VARNAM und EVANS, 1991)**

	<i>V. cholerae classical</i>	<i>V. cholerae eltor</i>
Hämolyse	-	± <sup>1)</sup>
Voges-Proskauer	-	+
Hämagglutination	-	+
Sensitivität gegenüber Polymyxin (50 iμ)	+	-
Classic phage IV	+	-
El Tor phage V	-	+

<sup>1)</sup> Die ursprünglich beschriebenen El Tor Isolate zeigten alle Hämolyse, die Isolate der letzten Jahre zeigten nur schwache oder keine Hämolyse.

### 5.4.9.3 Pathogenität und Erkrankungen

*V. cholerae* bildet Chitinase und besiedelt Plankton und andere Meerestiere. Das Auftreten ist wie auch bei anderen Vibrionen saisonal. Bei Wassertemperaturen von 20 bis 35°C ist die Nachweisbarkeit am größten und bei Wassertemperaturen unter 16°C oder anderen ungünstigen Umweltbedingungen ist keine Nachweisbarkeit mehr vorhanden - „dormant, viable but non-culturable state“ (MORRIS, 1993, WONG und DESMARCHELIER, 1999).

Die **Cholera** ist eine schwere Durchfallerkrankung, die durch das Bakterium *Vibrio cholerae* ausgelöst wird. Die Übertragung auf den Menschen erfolgt über Wasser oder Lebensmittel. Das natürliche Reservoir der Choleravibrionen ist nicht bekannt. Lange Zeit wurde der Mensch als Reservoir betrachtet, aber neuere Befunde lassen vermuten, dass der Lebensraum Wasser als Reservoir anzusehen ist (TODAR, 2000).

Die Symptome einer Infektion mit *V. cholerae* O1 reichen von milder Durchfallerkrankung bis zu schwerer lebensbedrohender Krankheit. Die schwerste Form (*Cholera gravis*) wird nur von choleratoxinbildenden Stämmen vom Serovar O1 verursacht (VARNAM und EVANS, 1991).

Die durch Chemotaxis gesteuerte Beweglichkeit mit Hilfe polarer Geißeln führt zu gerichteter Bewegung auf die Darmschleimhaut zu und stellt zusammen mit dem Enzym Mucase, welches die Schleimschutzschicht der Darmschleimhaut verflüssigt, einen wichtigen Pathogenitätsfaktor von *V. cholerae* dar (VARNAM und EVANS, 1991).

***V. cholerae* O1 und O139** produzieren „toxin co-regulated pili“ (TCP) und Cholera-(Enterotoxin) (CT). TCP sind in Bündeln an den Polen der Bakterienzellen angeordnete lange, filamentöse Fimbrien, welche die Kolonisation der Dünndarmzellen ermöglichen. Das Regulator-Protein ToxR reguliert die Expression von CT und TCP. Die Expression von ToxR wiederum wird durch Umweltfaktoren wie Temperatur, pH-Wert, Osmolarität und verschiedene Aminosäuren beeinflusst

(TODAR, 2000). Erst der synergistische Effekt mehrerer Pathogenitätsfaktoren, die von toxinogenen *V. cholerae* produziert werden, führt zur Entstehung der Choleraerkrankung. In endemischen Gebieten treten Choleraausbrüche saisonal, explosiv und in verschiedenen Gegenden gleichzeitig auf, sodass angenommen werden muss, dass Umweltfaktoren den epidemischen Prozess triggern (FARUQUE et al., 1998). Das Cholera-toxin ist ein oligomeres Protein mit einem Molekulargewicht von 84000 Dalton. Es setzt sich aus den Untereinheiten A1, A2 sowie fünf B-Untereinheiten zusammen. Die B-Untereinheiten binden an den Rezeptor Gangliosid G<sub>M1</sub> auf der Darmzelloberfläche. Die Untereinheit A1 wird (vermutlich unter Beteiligung der A2-Untereinheit) in das Cytosol freigesetzt und führt durch irreversible Aktivierung der Adenylatcyclase zur Erhöhung des intrazellulären Botenstoffs cAMP. Dadurch werden luminal gelegene Chloridkanäle aktiviert und die Chlorid-Sekretion in den Magen-Darm-Trakt drastisch erhöht. Wasser und Natriumionen folgen passiv aus osmotischen Gründen, wodurch es zu starken, wässrigen Durchfall und Erbrechen kommt. Die Inkubationszeit beträgt 6 bis 72 Stunden (bis 7 Tage). In extremen Fällen sterben die Patienten innerhalb von zwei bis drei Stunden nach Auftreten der Symptome. Bei den meisten Fällen kommt es innerhalb von vier bis zwölf Stunden zum Schock und innerhalb von 18 Stunden bis zu mehreren Tagen zum Tod. Der Verlust von Flüssigkeit, der bis zu einem Liter pro Stunde betragen kann, und von Elektrolyten führt zu Austrocknung, Anurie, Azidose und Schock. Es kommt zu Nierenfunktionsstörungen und zu sekundären Symptomen wie Schüttelfrost, Beinkrämpfen, extremen Durst, Heiserkeit und Schwäche. Der typische Reiswasserdurchfall entsteht durch Beimengungen von Schleim und Epithelzellen. Der Verlust von Kalium führt zu Herzproblemen und Kreislaufversagen (TODAR, 2000, VARNAM und EVANS, 1991). Ohne Behandlung ist die Letalität hoch (70 %). Bei schnell einsetzender Behandlung (vor allem Flüssigkeits- und Elektrolytersatz) ist die Prognose gut (MORRIS, 1993, WONG und DESMARCHELIER, 1999). Zu Todesfällen kommt es häufiger durch Infektionen mit *V. cholerae classical*, während Infektionen mit *V. cholerae eltor* (El Tor) in der Regel weniger schwer verlaufen.

***V. cholerae non-O1***-Stämme kommen weltweit in Küstenregionen vor und produzieren ein choleraähnliches Toxin und ein hitzestabiles Enterotoxin (NAG-ST),

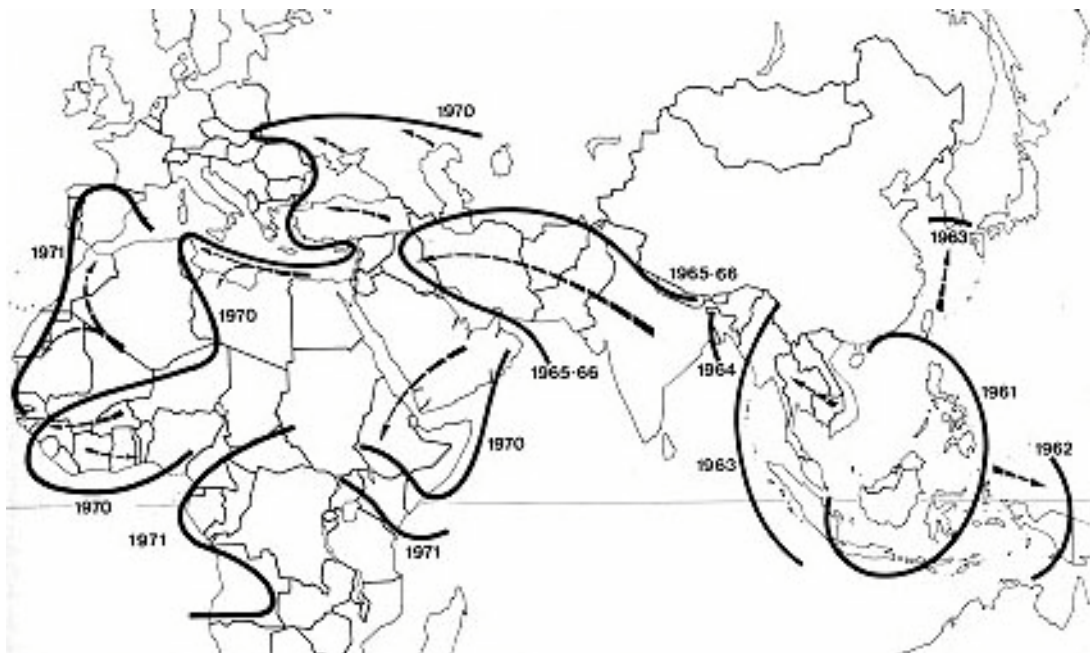
welches dem *Escherichia coli* ST-Toxin ähnelt (POWELL, 1999). Sie führen zu Gastroenteritiden, die mit Durchfall, der zuweilen blutig und mit Abdominalkrämpfen verläuft, einhergehen, und milder verlaufenden choleraähnlichen Erkrankungen. Sehr selten kommt es zu Wund- oder Ohrinfektion und bei immungeschwächten Personen eventuell auch zu Septikämie. Die Inkubationszeit beträgt weniger als 24 Stunden und die Krankheit verläuft in der Regel mild. Nur eine Minderheit der Stämme ist humanpathogen, doch lassen sich pathogene und nicht pathogene Stämme nicht klar unterscheiden (MORRIS, 1993, MORRIS, 1999). Viele *V. cholerae* non-O1-Stämme besitzen eine Polysaccharid - Kapsel, welche vermutlich vor dem Immunsystem und vor Umwelteinflüssen schützt. Diese Stämme werden mit invasiver Septikämie und schweren Wundinfektionen in Zusammenhang gebracht (POWELL, 1999).

#### **5.4.9.4 Epidemiologie der Cholera**

*V. cholerae* O1 hat seit 1817 zu sieben Cholera-Pandemien geführt. Sie begannen im Indischen Subkontinent, meist im Ganges-Delta. Die zweite Pandemie erreichte 1830 die Britischen Inseln und über infizierte Immigranten aus Irland auch Kanada. In den Jahren 1847 bis 1854 stellte JOHN SNOW durch epidemiologische Untersuchungen in London fest, dass die Krankheit über das Wasser übertragen wird. Während der dritten Pandemie von 1852 bis 1859 wütete die Cholera unter anderem auch in den Vereinigten Staaten. Zum Ende der vierten Pandemie in den 1870ern waren die Menschen entlang des Mississippi, Missouri und Ohio besonders betroffen. Die fünfte Pandemie betraf vor allem Südamerika. Es kam zu großen Epidemien in vielen Ländern. Besonders in Argentinien, Chile und Peru war die Mortalität hoch. ROBERT KOCH isolierte während dieser fünften Pandemie aus Reiswasserstühlen von Cholera-Patienten in Ägypten 1883 und in Indien 1884 die choleraauslösenden Organismen und zählte sie zu den „Kommabakterien“. Die sechste Pandemie (1899 - 1923) breitete sich über den nahen und mittleren Osten sowie über den Balkan aus und wurde, wie vermutlich auch die fünfte Pandemie, von *V. cholerae classical* ausgelöst. Die siebte Pandemie begann 1961, ausgelöst durch *V. cholerae classical* und *V. cholerae eltor* (El Tor), in Indonesien auf der Insel Sulawesi und breitete sich bis Ende 1962 über die Inseln Südostasiens aus. Bis 1969

erstreckte sie sich über weite Teile von Asien bis in den mittleren Osten und die Sowjetunion. 1970 erreichte sie Israel und West-Afrika, wo sie sich entlang der Küste und der entlang der Wasserläufe auch ins Landesinnere ausbreitete und zu explosionsartigen Ausbrüchen mit hoher Mortalität führte (**Abbildung 9**). 1991 setzte sich die siebte Pandemie nach einer explosionsartigen Epidemie in Peru in Lateinamerika fort. Damit kehrte die Cholera nach über einem Jahrhundert nach Südamerika zurück. 1994 kam es zu einem schweren Choleraausbruch unter Ruandischen Flüchtlingen in Flüchtlingslagern in Zaire. Schätzungsweise 12000 Ruandische Flüchtlinge starben innerhalb von drei Wochen. Heute hat die Cholera in Süd-Asien und Teilen von Afrika und Lateinamerika endemische Herde, wo es zu saisonalen Ausbrüchen kommt.

**Abbildung 9: Die weltweite Ausbreitung der Cholera während der siebten Pandemie 1961 bis 1971 (TODAR, 2000)**



Akut infizierte Personen scheiden  $10^{13}$  Keime pro Tag aus. Die Verbreitung erfolgt in Endemiegebieten über fäkale Kontamination des Wassers. Die Infektionsdosis liegt bei Aufnahme der Erreger mit dem Wasser bei über  $10^6$  Keimen (MORRIS, 1993). In



der übrigen Welt außerhalb der Endemiegebiete gehört *V. cholerae* zur normalen Bakterienflora von Flussmündungs- und Küstengewässern ohne im Zusammenhang mit fäkaler Kontamination oder Krankheitsherden zu stehen (STEPHAN und KNABNER, 1996). So kommt es in Australien durch die Aufnahme von unbehandeltem Flusswasser und in den USA durch den Verzehr roher oder unzureichend erhitzter, kontaminierter Meeresfrüchte (Infektionsdosis  $> 10^3$  Keime) zu sporadischen Cholera-Fällen. *V. cholerae* ist zwar empfindlich gegenüber der Magensäure, jedoch wird diese durch die aufgenommene Nahrung abgepuffert (WONG und DESMARCHELIER, 1999).

1992 trat in Indien und Bangladesh *V. cholerae* O139 synonym **Bengal** in Erscheinung und führte zu mehreren Cholera-Ausbrüchen. Diese Epidemie dauerte das Jahr 1993 über an. Es wurden auch aus Pakistan, Nepal, China, Thailand, Kasachstan, Afghanistan und Malaysia Erkrankungsfälle gemeldet. In Großbritannien und in den Vereinigten Staaten gab es importierte Cholera-Fälle. In Indien und Bangladesh verursacht *V. cholerae* O139 weiterhin Choleraausbrüche und coexistiert mit *V. cholerae eltor*. Es ist möglich, dass sich hieraus eine achte Cholera-Pandemie entwickelt (FARUQUE et al., 1998).

## **5.4.10 *Vibrio parahaemolyticus***

### **5.4.10.1 Charakteristische Eigenschaften**

Optimale Wachstumsbedingungen sind für *V. parahaemolyticus* bei einem Kochsalzgehalt von 2 bis 4 Prozent (Bereich 0,5 - 10 %) und bei einer Temperatur von 37°C (Bereich 5 - 43°C) gegeben. Wachstum ist über einen breiten pH-Bereich von 4,8 bis 11 möglich. Optimal sind pH-Werte zwischen 7,8 und 8,6. Die optimale Wasseraktivität liegt bei einem aw-Wert von 0,981 (Bereich 0,940-0,996) (ICMSF, 1996, BAUMGART, 1998).

### 5.4.10.2 Nomenklatur

*V. parahaemolyticus* wird anhand seiner O- und K-Antigene serotypisiert. Es sind zur Zeit 11 O-Gruppen und 65 K-Antigene bekannt (VARNAM und EVANS, 1991). (Tabelle 8)

**Tabelle 8: Serotypisierung von *Vibrio parahaemolyticus***

O-Gruppe	K-Typ
1	1, 25, 26, 32, 38, 41, 56, 58, 64, 69
2	3, 28
3	4, 5, 6, 7, 29, 30, 31, 33, 43, 45, 48, 54, 57, 58, 59, 65
4	4, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 34, 42, 49, 53, 55, 63, 67
5	15, 17, 30, 47, 60, 61, 68
6	18, 46
7	19
8	20, 21, 22, 39, 70
9	2, 3, 44
10	19, 24, 52, 66, 71
11	36, 40, 50, 51, 61

*V. parahaemolyticus* wird in Kanagawa-positive und Kanagawa-negative Stämme unterteilt. Kanagawa-positive Stämme zeigen das Kanagawa-Phänomen, nämlich  $\beta$ -Hämolyse auf Wagatsuma-Agar, einem Nährmedium hergestellt mit menschlichen Erythrozyten, hervorgerufen durch die extrazelluläre Substanz „thermostable direct haemolysin“ Vp-TDH. Das Kanagawa-Phänomen korreliert eng mit der Humanpathogenität (DESMARCHELIER, 1999). Es zeigen 96 Prozent der Isolate aus Patientstühlen aber nur 1 Prozent der Isolate aus Lebensmitteln das Kanagawa-Phänomen (MORRIS, 1999).

### 5.4.10.3 Pathogenitätsfaktoren

**Vp-TDH** ist ein hitzestabiles, trypsinempfindliches Protein mit einem Molekulargewicht von 44000 Dalton. Es setzt sich aus zwei monomeren Untereinheiten zusammen. Die Produktion dieses Hämolsins wird durch den pH-Wert beeinflusst. Es wird nur bei pH-Werten zwischen 5,5 und 6,5 produziert. Seine minimale hämolytische Dosis ist mit 0,1 Mikrogramm gering (VARNAM und EVANS, 1991). Vp-TDH wird als Enterotoxin angesehen, welches zu Durchfall führt, die Gefäßpermeabilität erhöht und kardiotoxisch ist (ICMSF, 1996). Seine Rolle als Hauptpathogenitätsfaktor ist jedoch nicht bewiesen (DESMARCHELIER, 1999). Aus Stämmen von Patientenstühlen wurde weiterhin ein hitzelabiles Hämolsin isoliert, welches nach intraperitonealer Injektionen bei Mäusen in 30 bis 40 Prozent der Fälle zum Tode führt (MORRIS, 1999). Weitere Hämolsine von *V. parahaemolyticus* sind Phospholipase A, Lysophospholipase und Glycerylphosphorylcholine. Die Gruppe der „Vp-TDH-related haemolysins“ oder **Vp-TRH** wurde auch in Kanagawa negativen Isolaten gefunden. Sie sind immunologisch mit Vp-TDH verwandt und zeigen die gleiche biologische Aktivität (VARNAM und EVANS, 1991). Stämme von Patientenstühlen, die TDH und/oder TRH enthalten, hydrolysieren außerdem Harnstoff (Urease-positiv). Jedoch enthalten nicht alle Urease-positiven Stämme gleichzeitig TDH oder TRH. So wird die Urease-Aktivität als möglicher Pathogenitätsfaktor oder -marker diskutiert (MORRIS, 1999). Als weitere Pathogenitätsfaktoren sind ein Shiga-toxin-ähnliches Zytotoxin und verschiedene Adhäsionsfaktoren bekannt (DESMARCHELIER, 1999). *V. parahaemolyticus* ist invasiv. Es haftet an Epithelzellen und penetriert die *Lamina propria*. In Tierversuchen wurde nachgewiesen, dass es sich von dort zu Herz, Milz, Bauchspeicheldrüse und Leber ausbreitet (VARNAM und EVANS, 1991).

### 5.4.10.4 Vorkommen und Erkrankungen

Der natürliche Lebensraum von *V. parahaemolyticus* sind Flussmündungs- und Küstengewässer, nicht aber das offene Meer. Gelegentlich gelangen auch Nachweise in Süßwasser und Süßwasserfisch. Dies ließ sich dadurch erklären, dass es zu lokalen Anstiegen der Salzkonzentration gekommen war (VARNAM und

EVANS, 1991). Es findet sich auf dem Exoskelett von Krustentieren und vor allem in den Kiemen von Schalentieren bedingt durch deren Futteraufnahme durch Filtration des Wassers. Konzentrationen von *V. parahaemolyticus* von  $10^2$  bis  $10^3$  je Gramm entsprechen einer natürlichen Kontamination von rohen Meeresfrüchten und sind nicht mit Erkrankungen gesunder Erwachsener in Verbindung zu bringen. Zu Lebensmittelinfektionen kommt es nach Verzehr sowohl roher als auch gegarter Meeresfrüchte, wenn diese nicht ausreichend erhitzt oder durch unhygienische Verhältnisse rekontaminiert wurden. Eine für den Menschen infektiöse Dosis ( $> 10^5$ ) wird durch Vermehrung der Erreger (innerhalb von 2 - 3 Stunden bei 20 - 35°C) in zu warm bzw. zu lange gelagerten Lebensmitteln erreicht (DESMARCHELIER, 1999, ICMSF, 1996). *V. parahaemolyticus* hat eine Generationszeit von nur 9 bis 10 Minuten bei 37°C. Eine Infektion führt nach einer Inkubationszeit von 4 bis 30 Stunden (2 – 48 h (BAUMGART, 1998)) zu einer akuten Gastroenteritis, die eventuell mit blutigem Durchfall, Bauchschmerzen, Übelkeit und Erbrechen einhergeht und in der Regel von alleine wieder abklingt (DESMARCHELIER, 1999, ICMSF, 1996). Weniger häufige aber signifikante Symptome sind Erbrechen, Kopfschmerzen, geringgradiges Fieber und Schüttelfrost. *V. parahaemolyticus* wurde auch aus Wunden sowie Augen- und Ohrinfektionen isoliert. Todesfälle nach *V. parahaemolyticus* - Infektionen sind äußerst selten (VARNAM und EVANS, 1991). *V. parahaemolyticus* wurde zum ersten Mal 1951 in Japan bei der Untersuchung eines Ausbruchs meeresfrüchtesassoziierter Enteritis isoliert (VARNAM und EVANS, 1991). Es war in den sechziger Jahren in Japan für 70 Prozent aller Gastroenteritiden verantwortlich (POWELL, 1999). In anderen Ländern ist die Rate deutlich niedriger und saisonal auftretend (DESMARCHELIER, 1999). In den USA trat der erste Fall 1971 nach dem Verzehr nicht ausreichend erhitzter Krabben auf. Seither kam es immer wieder zu Ausbrüchen in Nordamerika, vor allem nach Verzehr roher Austern, die entlang der Pazifikküste geerntet wurden (POWELL, 1999).

## 5.4.11 *Vibrio vulnificus*

### 5.4.11.1 Charakteristische Eigenschaften

*V. vulnificus* wächst optimal bei einem Kochsalzgehalt von 2,5 Prozent (Bereich 0,5 - 5 %) und bei einer Temperatur von 37°C (Bereich 8 - 43°C) sowie bei einem pH-Wert von 7,8. Wachstum ist über einen breiten pH-Bereich von 5 bis 10 möglich. Die optimale Wasseraktivität liegt bei einem  $a_w$ -Wert von 0,98 (Bereich 0,96-0,997) (ICMSF, 1996, BAUMGART, 1998).

### 5.4.11.2 Pathogenitätsfaktoren

Eine Polysaccharid - Kapsel, die vor Phagozytose und Komplement-Aktivität schützt, sowie ein Zytolysin, welches für Gewebszerstörungen verantwortlich gemacht wird, stellen die zwei wichtigen Virulenzfaktoren von *V. vulnificus* dar. Es ist zur Zeit nicht möglich, zwischen potentiell pathogenen und nicht pathogenen Stämmen zu unterscheiden (MORRIS, 1999). *V. vulnificus* synthetisiert zwei Hämolysine. Im Verlaufe der Infektion wird das hitzelabile Protein mit einem Molekulargewicht von 56000 Dalton in vivo gebildet. Es ist tödlich für Mäuse, zytotoxisch für Chinese-hamster-ovary (CHO)-Zellen und hämolysiert menschliche Erythrozyten. Das zweite Hämolysin ist ein Protein mit einem Molekulargewicht von 50000 Dalton. Es wirkt auf Mastzellen und führt zur Ausschüttung von Zytolysinen und Histamin. Es wirkt außerdem selbst zytolytisch auf Leukozyten. Virulente Stämme produzieren ein lösliches Enterotoxin, welches bei Durchfallerkrankungen eine Rolle spielt (VARNAM und EVANS, 1991).

### 5.4.11.3 Krankheitsbilder

*V. vulnificus* ist hochinvasiv und verursacht zwei Krankheitsbilder.

Zu einer primären Septikämie kommt es infolge oraler Aufnahme der Erreger. Nach einer Inkubationszeit von 7 bis 24 Stunden (STENGEL, 1997) bis zu wenigen Tagen (ICMSF, 1996) kommt es zu einer Allgemeinerkrankung mit Fieber, Schüttelfrost und Übelkeit. Gastroenteritiden sind selten und gehen mit Bauchschmerzen, Erbrechen

und Durchfall einher. In zwei Drittel der Fälle jedoch kommt es sekundär zu schmerzhaften Hautläsionen wie Rötungen, Blasen und Nekrosen.

Nach Wundinfektion kommt es zu einer sekundären Septikämie. Bei Kontakt mit erregerehaltigem Wasser oder Meerestieren (z.B. bei der Verarbeitung) dringen die Keime in äußere Wunden ein (STENGEL, 1997).

Infektionen mit *V. vulnificus* sind sporadisch. Sie treten fast ausschließlich im Zusammenhang mit dem Verzehr roher Muscheln auf. Vor allem wildlebende Austern sind, wahrscheinlich aufgrund ihrer Lebensweise im Sediment oder an Felsen, in Bereichen in denen sich auch Vibrionen anreichern, stark mit *V. vulnificus* belastet. Von Mai bis Oktober kann *V. vulnificus* in 100 Prozent der Austern, die an der Golfküste und Chesapeake Bay geerntet werden, nachgewiesen werden (POWELL, 1999). Aber auch andere Meeresfrüchte sind als Infektionsquelle für *V. vulnificus* bekannt. Es wird angenommen, dass die infektiöse Dosis gering ist. Besonders empfänglich für die Infektion sind Personen mit chronischen Grundleiden wie Lebererkrankungen, Nierenerkrankungen, Alkoholabhängigkeit, Diabetes mellitus, Krebs und anderen immunsupprimierenden Erkrankungen. Die Mortalität ist in diesem Personenkreis hoch (40 - 60 %). *V. vulnificus* vermehrt sich nicht in menschlichem Blutserum mit normalem Eisengehalt. Es benötigt erhöhte Gehalte wie sie bei den obengenannten empfänglichen Personen auftreten können (DESMARCHELIER, 1999). Virulente Stämme von *V. vulnificus* können Eisen aus eisenbindenden Serumproteinen, wie Transferrin und Laktoferrin nur gewinnen, wenn diese Proteine mit Eisen gesättigt sind. Avirulente Stämme können dies nicht. Im Gegensatz zu anderen Bakterien kann *V. vulnificus* Eisen auch dann aus Hämoglobin lösen, wenn dieses als Komplex mit Haptoglobin vorliegt. Haptoglobin ist ein Bestandteil des normalen Blutserums und bindet spezifisch und irreversibel an Hämoglobin. Dadurch wirkt es bakteriostatisch auf die meisten Bakterien (VARNAM und EVANS, 1991).

*V. vulnificus* wurde in den frühen siebziger Jahren mit Wundinfektionen in Zusammenhang gebracht und Ende der siebziger Jahre taxonomisch definiert. Die erste Isolation aus Blutkulturen gelang 1976 HOLLIS et al. (VARNAM und EVANS,

1991). 1980 erhielt es seine jetzige Spezies - Bezeichnung. Bis zum Auftreten einer lebensbedrohlichen Infektion im August 1994 war *V. vulnificus* in Deutschland praktisch unbekannt. Eine 73-jährige Frau zog sich beim Wasserwaten in der Ostsee bei Zinnowitz/Usedom über eine kleine Hautverletzung eine Wundinfektion mit Sepsis zu. Bei Wasseruntersuchungen in Zinnowitz/Usedom durch das Robert-Koch-Institut im Jahre 1995 gelang der kulturelle Nachweis von *V. vulnificus* in den Monaten von Anfang August bis Mitte Oktober. Zu dieser Zeit betrug die Wassertemperatur über 20°C. 1996 gelang der Nachweis trotz ausgedehntem Untersuchungsareal nicht mehr. In diesem Jahr blieben die Wassertemperaturen unter 20°C. Im September 1996 konnte *V. vulnificus* in der Flensburger Bucht nachgewiesen werden. In Bremerhaven wurde 1995 *V. vulnificus* aus einem Lebensmittel (importierte thailändische Garnelen) isoliert (STENGEL, 1997, STEPHAN und KNABNER, 1996, ROBERT KOCH INSTITUT, 1997). STEPHAN et al. (2002) gelang im Rahmen einer Untersuchungsreihe von Juli 1998 bis Ende März 2000 zum Vorkommen von halophilen und humanpathogenen Vibrionen in deutschen Nutztierbeständen der Nachweis von *V. vulnificus* aus Fetten und Plazenten von Schweinen und Rindern nach Aborten.

## 5.5 Nachweismethoden

In der Literatur werden verschiedene Nachweismethoden für Vibrionen allgemein und besondere Nachweismethoden für bestimmte *Vibrio* sp. beschrieben.

### 5.5.1 Nachweismethoden für Vibrionen allgemein

FARMER III et al. (1985) empfahlen zum Nachweis von Vibrionen in Blut-, Stuhl- oder Sekretproben eine Anreicherung in alkalischem Peptonwasser über fünf bis acht Stunden und dann einen Ausstrich von der Oberfläche der Flüssigkeit auf TCBS-Agar sowie parallel dazu eine direkte Plattierung auf TCBS-Agar und Bebrütung des TCBS-Agars über Nacht. Sie zogen zur biochemischen Identifizierung die Verwendung eigens dafür hergestellter Medien den kommerziellen Testsystemen vor, da diese nicht immer die optimale Zusammensetzung hätten.

STEPHAN und LINDENA (1998) führten eine Anreicherung über Nacht bei 37°C in alkalischem Peptonwasser (pH 7,8) und einen Ösenausstrich auf TCBS-Agar durch. Aus der Anreicherung wurde eine Hauptanreicherung ebenfalls in alkalischem Peptonwasser beimpft, über Nacht bei 37°C bebrütet und ebenfalls ein Ösenausstrich auf TCBS-Agar vorgenommen. Die Bebrütung der Platten erfolgte über Nacht bei 37°C.

BAUMGART (1998) beschreibt in „Mikrobiologische Untersuchung von Lebensmitteln“ eine achtstündige Voranreicherung von 20 g Lebensmittel in 200 ml alkalischem Peptonwasser (pH 8,6 - 9,0) und eine anschließende Anreicherung in Monsur's Broth (Tellurit-Galle-Kochsalz-Bouillon) über Nacht bei jeweils 37°C. Dazu wird das Lebensmittel mit einer Schere in kleine Stücke geschnitten, zwei Minuten mit alkalischem Peptonwasser geschüttelt und wieder aus der Anreicherungsbouillon entfernt. Aus der Anreicherung wird ein Ösenausstrich auf TCBS-Agar vorgenommen und 18 Stunden bei 37°C bebrütet. Zur Keimzählung wird direkt auf TCBS-Agar gespatelt und 18 Stunden bei 37°C bebrütet.



STEPHAN et al. (2002) führten zum Nachweis von Vibrionen bei Säugetieren parallel eine Direktkultur auf TCBS und eine Anreicherung von 10 g Untersuchungsmaterial in 50 ml alkalischem Peptonwasser (1 % NaCl, pH 8,6) über 18 bis 24 Stunden bei 25°C und einen Ösenausstrich auf Blutplatten und TCBS-Agar, welches keinen Zusatz von Natriumcholat enthält, durch. Die Bebrütung der Agarplatten erfolgte zunächst über 18 bis 24 Stunden bei 37°C und bei schlechtem Wachstum zusätzlich bei 25°C. Die biochemische Identifizierung erfolgte mit dem api 20 NE-System in Kombination mit zusätzlichen nicht kommerziellen Tests bzw. durch ein eigens etabliertes Testsystem.

### **5.5.2 Nachweismethoden für *V. cholerae***

Im "Microorganisms in foods – microbiological specifications of food pathogens", ICMSF (1996), wird eine Anreicherung in alkalischem Peptonwasser (1 % NaCl, pH 8,5) bei 35 bis 37°C mit einem Ösenausstrich auf TCBS oder TTG (Taurocholat-Tellurit-Gelatine-Agar) nach 6 bis 8 und 18 Stunden vorgeschlagen.

### **5.5.3 Nachweismethoden für *V. parahaemolyticus***

BAUMGART (1998) beschreibt in „Mikrobiologische Untersuchung von Lebensmitteln“ eine Anreicherung von 100 g Lebensmittel in 100 ml SPB-Bouillon (Salz-Polymyxin-Bouillon) über 18 Stunden bei 37°C mit anschließendem Ösenausstrich auf TCBS.

SAKAZAKI et al. (1986) haben eine Vergleichsstudie für den Nachweis von *V. parahaemolyticus* mit zwei Anreicherungsmedien, GSTB (Glukose-Salz-Teepol-Bouillon) und SPB (Salz-Polymyxin-Bouillon) durchgeführt. Hierbei wurden 50 g Probenmaterial in 450 ml „peptone dilution water“ homogenisiert und daraus eine Verdünnungsreihe angelegt. Von verschiedenen Verdünnungsstufen wurden je drei Röhrchen mit GSTB und SPB beimpft, 18 bis 24 Stunden bebrütet und bei sichtbarem Wachstum auf TCBS ausgestrichen. Die Differenzierung verdächtiger

Kolonien erfolgte anhand folgender Parameter: Wachstum in Dreizucker-Eisen-Agar, Voges Proskauer, Beweglichkeit, Indol, Oxidase, Gramfärbung, Wachstum bei 0 %, 8 % und 10 % NaCl-Konzentration, Lysin- und Ornithindecaboxylase und Wachstum bei 42°C. Da keines der beiden Anreicherungsmedien bessere Ergebnisse als das andere erbrachte, schlugen SAKAZAKI et al. vor, beide Medien parallel einzusetzen bis bessere Medien beziehungsweise Methoden etabliert sind.

KARUNASAGAR et al. (1986) haben die MPN-Verfahren zum Nachweis von *V. parahaemolyticus* unter Verwendung von GSTB (Glukose-Salz-Teepol-Bouillon) und SPB (Salz-Polymyxin-Bouillon) und zwei weiteren Anreicherungsmedien verglichen mit dem Spatelverfahren auf TCBS und sind zu dem Ergebnis gekommen, dass das Spatelverfahren auf TCBS die besten Resultate erbrachte. Sie stellten dabei fest, dass die verwendete Polymyxin-Konzentration das Wachstum von *V. parahaemolyticus* hemmte. Zur Differenzierung wurden folgende Parameter herangezogen: Oxidase, Wachstum in Dreizucker-Eisen-Agar, O/129-Sensitivität, Lysin-, Ornithin- und Arginindecaboxylase und Wachstum bei 0 %, 8 % und 11 % NaCl-Konzentration.

Im „Bacteriological Analytical Manual“ des USFDA ist ein Dreiröhrchen-MPN-Verfahren beschrieben. Alkalisches Peptonwasser wird als Anreicherungsmedium verwendet und 18 Stunden bei 35°C bebrütet. Danach erfolgt ein Ausstrich auf TCBS-Agar und eine anschließende biochemische Identifizierung grün wachsender Kolonien (VENKATESWARAN, 1999).

#### **5.5.4 Nachweismethoden für *V. vulnificus***

STENGEL (1997) führte den Nachweis von *V. vulnificus* mit einer Anreicherung in modifiziertem alkalischem Peptonwasser (pH 8,6, Polymyxin-B-sulfat  $2,0 \times 10^4$  U) und anschließendem Ösenausstrich auf TCBS- und CPC-Agar (Colistin-Polymyxin-B-Cellobiose Agar) durch. Die Bebrütung erfolgte jeweils 24 Stunden bei 37°C. Colistin und Polymyxin-B hemmen die Begleitflora. *V. vulnificus* baut Cellobiose unter Säurebildung ab und bildet auf CPC zwei bis drei Millimeter große, gelbe Kolonien.

## 6 MEMBRANFILTRATION

### 6.1 Prinzip und Anwendung

Bei der Membranfiltration werden Mikroorganismen, die größer als der Porendurchmesser des Membranfilters sind, auf dem Filter zurückgehalten. Nach Bebrütung des Membranfilters auf einem festen Nährmedium (Agarplatten oder mit Flüssigkeit getränkte Nährkartonscheiben) werden diese als Koloniebildende Einheiten sichtbar. Für den Nachweis von Bakterien werden Porengrößen von 0,22 bis 0,45 Mikrometern verwendet. Hefen und Schimmelpilze werden auf Membranen mit einer Porengröße von 0,65 Mikrometer zurückgehalten. Die Membranen bestehen aus Cellulosenitrat, Celluloseacetat oder ähnlichen Materialien und können bereits sterilisiert im Handel bezogen werden. Die Membranen müssen luftblasenfrei auf das Nährmedium aufgelegt werden. Die verwendeten Agarplatten sollten nicht mehr als 1,0 bis 1,5 Prozent Agar enthalten. So ist eine gleichmäßige Diffusion der Nährstoffe aus dem Nährmedium in die Membran gewährleistet. Es besteht auch die Möglichkeit, die Membranfilter in Nährbouillons zu geben. Die Filtrationssysteme bestehend aus Trichter, Fritte, und Absaugvorrichtung mit Saugflasche und Vakuumpumpe sind ebenfalls über den Handel zu beziehen. Die Trichter sind entweder aus Edelstahl und damit abflammbar oder autoklavierbar oder als sterile Einmalartikel aus Kunststoff gefertigt. Die Fritten können ebenfalls abgeflammt werden.

Das Membranfiltrationsverfahren ist ein Verfahren zur mechanischen Anreicherung von Mikroorganismen aus beliebigen Mengen einer Flüssigkeit oder filtrierbaren Lebensmitteln bei der die Möglichkeit der Keimzählung erhalten bleibt. Flüssige Lebensmittel und Wasser können meist ohne Vorbehandlung filtriert werden. Leichtlösliche Lebensmittel, wie zum Beispiel Honig, Gelatine oder Zucker, werden zur Filtration in steriler Verdünnungsflüssigkeit gelöst. Mayonnaise, Butter und andere fetthaltige Lebensmittel sind schwerlöslich und müssen in erwärmter Emulgatorlösung aufgeschwemmt werden. Als Emulgatoren lassen sich Tween 80<sup>®</sup>, Atlas-Renex 698<sup>®</sup>, Triton X-100<sup>®</sup> oder Emulgin 286<sup>®</sup> verwenden. Nach der

Filtration sollte mit physiologischer Kochsalzlösung nachgespült werden, um Reste des verwendeten Emulgators zu entfernen, da dieses sich sonst hemmend auf das Keimwachstum auswirken kann. Unlösliche Lebensmittel werden in Verdünnungsflüssigkeit oder Emulgatorlösung homogenisiert. Dies kann mit einem Homogenisierstab (Ultra Turrax) oder im Stomacherbeutel geschehen. Um einen Belag oder gar eine Verstopfung der Filtermembran mit Feststoffteilchen zu verhindern, kann ein Vorfilter mit einer Porenweite von etwa 12 Mikrometern vorgeschaltet werden. Zwischenstücke aus Edelstahl für die Filtrationsanlage sowie sterile Vorfilter sind ebenfalls im Handel erhältlich. Der Vorfilter soll zwar die Mikroorganismen passieren lassen, dennoch sollte dieser ebenfalls auf einem zweiten Nährboden bebrütet werden, um hängen gebliebene Mikroorganismen mit zu erfassen. Werden hohe Keimzahlen erwartet, wird vor der Filtration eine dekadische Verdünnungsreihe angelegt und aus jeder Verdünnung 1 Milliliter filtriert. Bei Filtration nur geringer Mengen, das heißt Mengen unter 10 Milliliter, werden 10 Milliliter physiologische Kochsalzlösung in den Trichter vorgelegt, um eine gleichmäßige Keimverteilung auf der Filtermembran zu erreichen. Die Membranfilter sind in verschiedenen Farben und mit aufgedrucktem Gitternetz erhältlich, um die Keimzählung zu erleichtern (BAUMGART, 1998, PICHHARDT, 1998).

## **6.2 Hydrophobic Grid-Membrane Filter (HGMF)**

Eine Besonderheit sind Membranfilter mit aufgebrachtem hydrophoben Gitternetz: Hydrophobic Grid-Membrane Filter (HGMF). Das Gitternetz des ISO-GRID<sup>®</sup> HGMF unterteilt den Membranfilter in 1600 gleich große Felder. Mikroorganismen können die Gitternetzbarrieren nicht überwinden. Bei einem üblichen MPN-Verfahren werden drei bis fünf Röhrchen je Verdünnungsstufe beimpft. Ein Filtrationsvorgang mit dem HGMF entspricht aber einer Beimpfung von 1600 MPN-„Röhrchen“ mit dem selben Volumen aus einer Verdünnungsstufe und ist somit viel präziser. Die HGMF können mit einem Zählgerät automatisch ausgewertet werden. Es existieren einige offizielle Methoden der Keimzahlbestimmung in Lebensmitteln mit dem HGMF-Verfahren beim AOAC International und Government of Canada (ENTIS, 1999). ENTIS und

BOLESZCZUK (1983) beschreiben ein Keimzählverfahren für *Vibrio parahaemolyticus* in Meeresfrüchten mit dem HGMF-System.

### **6.3 Vor- und Nachteile der Membranfiltration**

Die Membranfiltration bietet dem Benutzer viele Vorteile aber auch einige Nachteile. Der Hauptvorteil und häufigste Grund für die Anwendung der Membranfiltration ist die Möglichkeit, größere Volumina flüssiger Lebensmittel beziehungsweise Wasser zu untersuchen. Ein weiterer wichtiger Effekt der Membranfiltration ist aber auch, dass Wachstumsinhibitoren, die aus dem Lebensmittel stammen, oder Substanzen, die mit dem Nährmedium reagieren könnten, mit der Verdünnungsflüssigkeit entfernt werden. Durch Nachspülen mit weiterer Verdünnungsflüssigkeit oder physiologischer Kochsalzlösung wird dieser Effekt noch verbessert. Die Membranfilter können von einem Nährboden auf den Nächsten gelegt werden. Diese Möglichkeit kann in zweifacher Hinsicht genutzt werden. Vor dem eigentlichen Nachweis oder der Keimzahlbestimmung auf dem entsprechendem Selektivnährmedium, kann ein Wiederbelebungsschritt auf einem nicht oder wenig selektiven Wiederbelebungsnährmedium erfolgen, da die Mikroorganismen auf der Filtermembran an ihrem Ort erhalten bleiben. Weiterhin können durch Wechsel des Nährmediums verschiedene biochemische Bestätigungsschritte erfolgen.

Von Nachteil ist jedoch die deutlich kleinere Fläche, die auf dem Membranfilter zur Verfügung steht. Bei der Membranfiltration steht nur eine Fläche mit einem Durchmesser von etwa 45 Millimetern zur Verfügung, während eine Nähragarplatte in der Regel einen Durchmesser von etwa 85 Millimetern hat. Die Kolonien liegen folglich enger beieinander und sind dadurch oftmals kleiner. Auch ist die Gefahr größer, dass die Kolonien zusammenfließen. Dieses Problem ist laut SHARPE und PETERKIN (1987) bei der HGMF nicht von Bedeutung, da hier keine Kolonien, sondern Wachstum beziehungsweise kein Wachstum je Feld auf dem Gitternetz ausgewertet wird. Da nicht alle Lebensmittel ohne weiteres filtrierbar sind, werden weitere Arbeitsschritte notwendig. Im ungünstigsten Fall misslingt die Filtration. Die Membranfilter sind relativ teuer. Des Weiteren ist eine zusätzliche Investition in die

Filtrationsanlage nötig, bevor mit der Arbeit begonnen werden kann. Diese Nachteile und Kosten müssen gegenüber den Vorteilen abgewogen werden (SHARPE und PETERKIN, 1987).

## 6.4 Die Membranfiltration zum Nachweis von Vibrionen

VENKATESWARAN et al. (1989) beschrieben eine Membranfiltrationsmethode für den Nachweis von *V. parahaemolyticus* und *V. cholerae* aus Wasser, Sediment und Plankton, die einen sechsständigen Wiederbelebungsschritt beinhaltet (*pad pre-enrichment technique*). Sie benutzten auch diese Methode, um kälte- und hitzestressbehaftete beziehungsweise geschädigte Keime nachzuweisen und verglichen sie mit einer Methode ohne Wiederbelebungsschritt. Nach erfolgter Filtration wurden die Membranfilter auf Nährkatonscheiben gebracht, die mit alkalischem Peptonwasser (1 % Pepton, 0,5 % Hefeextrakt, 0,05 % Natriumdeoxycholat, pH 8,6) mit Kochsalzzusatz getränkt wurden, und sechs Stunden bei 30°C bebrütet. Nach diesem Wiederbelebungsschritt wurden die Membranfilter auf TCBS-Agar gelegt und 18 bis 20 Stunden bei 30°C bebrütet. So konnten sie aus Wasser, Sediment und Plankton insgesamt um 15,6 Prozent höhere Keimzahlen nachweisen als mit der Methode ohne Wiederbelebungsschritt. Die Nachweise der kälte- und hitzestressbehafteten Keime lagen sogar um 26,7 Prozent beziehungsweise 36,1 Prozent höher.

Die Membranfiltrationsmethode von ENTIS und BOLESZCZUK (1983) zur Keimzahlbestimmung von *Vibrio parahaemolyticus* in Meeresfrüchten mit dem HGMF-System beinhaltet ebenfalls einen Wiederbelebungsschritt von vier bis fünf Stunden bei 35°C auf einem nicht selektiven Agar. Nach dem Wiederbelebungsschritt erfolgte eine Bebrütung auf VPS-Agar (*Vibrio parahaemolyticus* Saccharose-Agar) über Nacht bei 42°C. Sie erreichten mit dieser Methode bessere Nachweisraten kälte- und hitzestressbehafteter Keime als mit der FDA-Methode (Food and Drug Administration), einem Dreiröhrchen-MPN-Verfahren mit Glukose-Salz-Teepol Bouillon und TCBS-Agar.

# EIGENE UNTERSUCHUNGEN

## 7 MATERIAL

### 7.1 Probenmaterial

Die Probennahme erfolgte im Zeitraum zwischen Januar 2001 und Mai 2002 durch den Wirtschaftskontrolldienst (WKD) im Regierungsbezirk Karlsruhe. Der WKD ist ein Fachdienst der Schutzpolizei, den es in dieser Form nur in Baden-Württemberg gibt. Er erhält vom Chemischen und Veterinäruntersuchungsamt Karlsruhe zehnmal im Jahr einen Plan über die Art und den Umfang der Lebensmittelproben, die er zur Untersuchung zu erheben hat. Über diese Planprobenanforderungen wurden auch diejenigen Proben angefordert, die im Rahmen der vorgelegten Arbeit untersucht wurden. Die Anforderung dieser Proben erfolgte schriftlich in folgender Schreibweise:  
„Warencode 120000: Garnelen nicht gekocht, gefroren oder getaut“,  
„Warencode 120000: frische Muscheln“ und  
„Warencode 120215“.

Der Code 120215 steht für „Garnelen gekocht nicht geschält“. Der Warencode ist ein Codiersystem, um eine bundeseinheitliche Nomenklatur für die Erfassung und Darstellung der Untersuchungsergebnisse der amtlichen Lebensmittelüberwachung zu schaffen. Der Warencode-Katalog für Lebensmittel für die amtliche Lebensmittelüberwachung wurde vom Arbeitskreis Lebensmittelchemischer Sachverständiger (ALS) und Arbeitskreis Lebensmittelhygienischer Tierärztlicher Sachverständiger (ALTS) koordiniert und gemeinsam mit zahlreichen Sachkennern aus der amtlichen Lebensmittelüberwachung erstellt. Er wird von der Zentralen Erfassungs- und Bewertungsstelle für Umweltchemikalien (ZEBS) des Bundesinstituts für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BgVV) herausgegeben (KLEIN und ARNOLD, 1997).

Ob die angeforderten Proben im Großhandel, Einzelhandel oder in Gaststätten oder ähnlichem erhoben wurden, und welcher Art die Proben waren, ob Fertigpackungen oder offene Ware, blieb dabei dem WKD freigestellt. Zur Untersuchung gelangte so ein Querschnitt der Produkte aus der angeforderten Warengruppe, wie er im Regierungsbezirk Karlsruhe für den WKD zu erhalten war.

Es wurden ausschließlich Garnelen und Muscheln angeliefert. Anhand des Zubereitungsgrades lassen sich die Proben in drei Kategorien einteilen:

1. nicht verzehrfertige Erzeugnisse / Rohware
2. nicht verzehrfertige Erzeugnisse / erhitzte Ware
3. gegarte Ware / verzehrfertige Erzeugnisse

### **7.1.1 Nicht verzehrfertige Erzeugnisse / Rohware**

Zu dieser Kategorie zählen 19 Proben frische Muscheln und 20 Proben Garnelen, die keinem Erhitzungsverfahren unterzogen worden waren. Vier der Proben roher Garnelen waren mit Zusatzstoffen versehen. Zur Verwendung kamen E 220 (Schwefeldioxid), E 223 (Natriummetabisulfit) und E 452 (Polyphosphat). Die rohen Garnelen wurden mit Ausnahme von zwei Proben, die aufgetaut als offene Ware angeboten wurden, ausschließlich als Tiefkühlware in Fertigpackungen in Verkehr gebracht. Im Einzelnen waren dies Süßwasser-Riesengarnelen aus Bangladesh und aus Aquakulturen im Indischen Ozean beziehungsweise der südchinesischen See, Kaisergranat aus dem Nordatlantik und Salzwassergarnelen aus Bangladesch, Indonesien und Thailand. Bei den frischen Muscheln handelte es sich überwiegend um *Mytilus edulis* (Miesmuschel) aus der holländischen Nordsee, eine Probe stammte aus der dänischen Nordsee. Aus Italien stammten fünf Proben Muscheln: *Mytilus galloprovincialis*, *Tapes semidecussatus* unter der Bezeichnung „Vongole veraci“ (**Farbtafel 1**) und Muscheln unter der Bezeichnung „Fasolari“ und „Vongole verage“. In diese Kategorie der nicht verzehrfertigen Erzeugnisse / Rohware wurde auch eine Probe rohe Miesmuscheln aus Irland eingeordnet, die zu einem Tiefkühl-Fertiggericht verarbeitet wurden, welches vor dem Verzehr gegart werden muss.



## 7.1.2 Nicht verzehrfertige Erzeugnisse / erhitzte Ware

Dieser Kategorie wurden die Proben zugeordnet, die einem Erhitzungsverfahren unterzogen worden waren, jedoch nicht verzehrfertig waren. Dies waren Garnelen, die erhitzt worden waren und als „roh – blanchiert“, n = 9 Proben (**Farbtafel 2**), oder als „roh“, n = 3 Proben, bezeichnet wurden oder mit dem Hinweis „Nur in durchgegartem Zustand verzehren!“ oder „wie ein frisches Produkt verwenden“, n = 3 Proben versehen waren. Sechs Proben dieser Kategorie waren ausserdem mit E 450 (Diphosphat) behandelt. Diese sechs Proben stammten vom gleichen Hersteller.

## 7.1.3 Gegarte Ware / verzehrfertige Erzeugnisse

44 Proben gegarte tiefgefrorene und gekühlte Garnelen, Garnelen in Öl, Lake oder in Feinkostsalaten verarbeitete Garnelen sowie eine Probe „vorgegarte“ tiefgefrorene Grüne Muscheln (*Perna canaliculus*) in der Halbschale aus Neuseeland bilden die Kategorie der verzehrfertigen Erzeugnisse. In Fertigpackungen angebotene gegarte Garnelen waren häufig mit Zusatzstoffen versehen. Zur Verwendung kamen E 200 (Sorbinsäure), E 202 (Kaliumsorbat), E 210 (Benzoessäure), E 212 (Kalziumbenzoat), E 220 (Schwefeldioxid), E 223 (Natriummetabisulfit), E 330 (Citronensäure), E 450 (Diphosphat) und E 452 (Polyphosphat) sowie Schutzgas bei einigen gekühlt angebotenen Garnelen.

Die Garnelen lassen sich anhand ihres Verarbeitungsgrades in drei Gruppen einteilen.

1. geschälte Garnelen beziehungsweise Garnelenfleisch
2. Garnelen ohne Kopf mit Schale oder Schwanzsegment
3. Garnelen mit Kopf und Schale

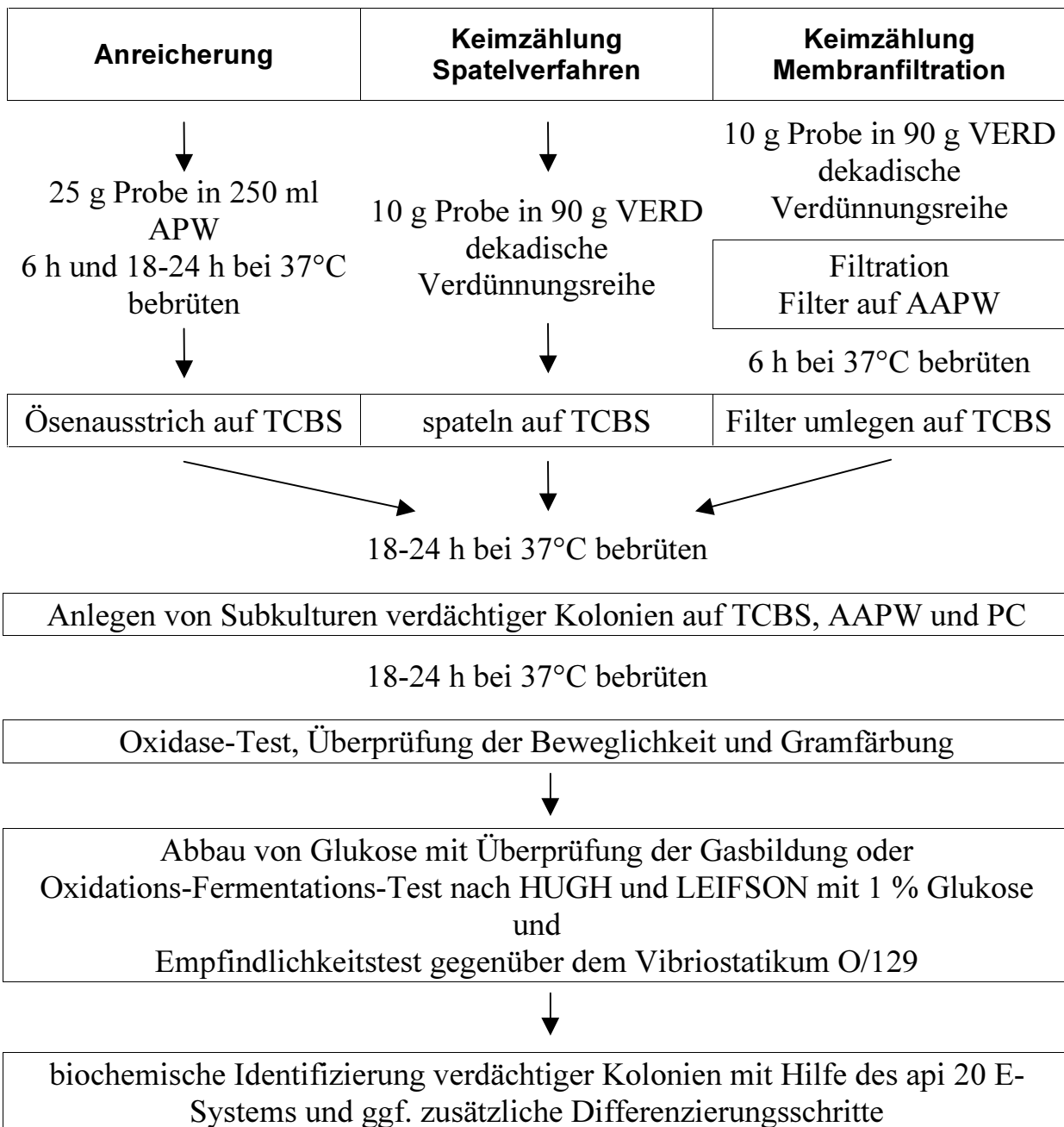
## **7.2 Untersuchungsmaterial**

Die für den kulturellen Nachweis von Vibrionen verwendeten Nährmedien, Testsysteme, Reagenzien, Chemikalien, Geräte und Hilfsmittel sind im Anhang aufgeführt.

## 8 METHODEN

Die Isolierung und Identifizierung der Vibrionen erfolgte nach dem in **Abbildung 10** dargestellten Ablaufschema mittels eines Anreicherungs- sowie zwei Keimzählverfahren, dem Spatelverfahren und dem Membranfiltrationsverfahren. Dabei handelt es sich um aus der Literatur übernommene und modifizierte Methoden. Das **Anreicherungsverfahren** wurde von dem im "Microorganisms in foods – microbiological specifications of food pathogens" des ICMSF vorgeschlagenen Verfahren abgeleitet. Zur Keimzählung mit dem **Spatelverfahren** wurde die im Labor vorhandene Standardvorgehensweise durchgeführt. Das **Membranfiltrationsverfahren** zur Untersuchung fester Lebensmittel wurde als völlig neue Methode in die Laborroutine eingeführt. Sie leitet sich von der durch VENKATESWARAN et al. (1989) beschriebenen „*pad pre-enrichment technique*“ ab.

**Abbildung 10 Darstellung der Nachweis- und Differenzierungsschritte**



- AAPW    Agar aus alkalischem Peptonwasser
- APW    Alkalisches Peptonwasser
- TCBS    Thiosulfat Zitrat Galle Saccharose-Agar
- PC    Plate Count Agar (Nähragar ohne NaCl-Zusatz)
- VERD    Verdünnungslösung

## 8.1 Isolierung von Vibrionen

Für die Untersuchung wurden die Garnelen mit sterilem Besteck aus ihrer Schale gelöst. Die Muscheln wurden steril geöffnet und ebenfalls aus ihrer Schale gelöst.

### 8.1.1 Anreicherungsverfahren

Zur Anreicherung wurden 25 g Probenmaterial in Stücke geschnitten und in 250 ml alkalisches Peptonwasser gegeben. Nach sechsständiger und 18- bis 24-stündiger Bebrütung bei 37°C wurde je ein fraktionierter Ösenausstrich auf Thiosulfat-Zitrat-Galle-Saccharose-Agar (TCBS) vorgenommen.

Bei der Anreicherung in alkalischem Peptonwasser handelt es sich um eine selektive Anreicherung. Die Selektivität von alkalischem Peptonwasser basiert auf dem hohen pH-Wert von 8,5 bei dem Vibrionen sich schnell vermehren können. Alkalisches Peptonwasser enthält keine zusätzlichen selektiven Substanzen (wie z.B. Polymyxin oder Ethylviolett) und eignet sich daher auch dazu, infolge von Lebensmittelverarbeitung oder Kühl- und Gefrierlagerung geschädigte und gestresste Keime wieder „aufzupäppeln“. Da es jedoch durch Bakterienwachstum zu einem raschen Abfall des pH-Wertes kommen kann, wurde bereits nach sechsständiger Bebrütung der erste Ösenausstrich vorgenommen.

TCBS ist ein Selektiv-Agar für den Nachweis von Vibrionen. Er wird als fertig gegossene Platten (Heipha Diagnostika) bezogen. Seine Selektivität beruht auf dem Zusatz von Rindergalle, Natriumthiosulfat und Zitrat sowie seinem hohen pH-Wert von  $8,6 \pm 0,2$ . Der Zusatz von Saccharose dient dazu, zwischen Saccharose-fermentierenden und -nicht-fermentierenden Vibrionen zu unterscheiden. *V. cholerae* und *V. alginolyticus* zum Beispiel fermentieren Saccharose und bilden gelbe Kolonien. *V. parahaemolyticus* und *V. vulnificus* und *V. mimicus* sind Saccharose-negativ und bilden grün-bläuliche Kolonien. Die Kolonien haben einen Durchmesser von 2 bis 3 mm und sind knopfförmig. *V. alginolyticus* bildet große, gelbe, schleimige

Kolonien, die jedoch nach kurzer Zeit bei Raumtemperatur schmutzig hellgrün werden (nachgrünen).

## **8.1.2 Keimzählverfahren**

Für die Keimzählungen wurden 10 g Probematerial in 90 g Verdünnungslösung (0,85 %ige Kochsalz-Pepton-Lösung) mit dem Stomacher zwei Minuten lang homogenisiert (Homogenat).

### **8.1.2.1 Spatelverfahren**

Vom Homogenat wurde eine dekadische Verdünnungsreihe bis Stufe 2 angelegt und direkt auf TCBS ausgespatelt. Für die Keimzählung der Verdünnungsstufe 1 wurde 1 ml der Verdünnungsstufe 1 auf drei Agarplatten verteilt.

### **8.1.3.2 Membranfiltrationsverfahren**

Von jeder Verdünnungsstufe wurden 1 ml durch einen Cellulosenitratfilter mit einer Porenweite von 0,45 µm filtriert. Um die Filtration zu erleichtern und eine gleichmäßige Keimverteilung auf dem Filter zu erreichen, wurden etwa 10 ml Alkalisches Peptonwasser mit einem Zusatz von 1 % Tween80<sup>®</sup> in den Trichter vorgelegt. Der Filter wurde zunächst sechs Stunden bei 37°C auf einem Agar aus Alkalischem Peptonwasser (AAPW) bebrütet und dann auf TCBS umgelegt.

Die Bebrütung auf Thiosulfat-Zitrat-Galle-Saccharose-Agar (TCBS) erfolgte jeweils bei 37°C für 18 bis 24 Stunden.

Die Auswertung des TCBS-Agars erfolgte durch die Beurteilung der Koloniefarbe, Kolonieförmigkeit und Koloniegröße. Zur weiteren Differenzierung wurden sowohl kräftig gelbe als auch bläulich grüne Kolonien herangezogen.

## **8.2 Identifizierung**

### **8.2.1 Wachstum auf TCBS, AAPW und PC**

Zur Differenzierung wurde von verdächtigen Kolonien eine Subkultur auf TCBS, AAPW (Agar aus alkalischem Peptonwasser) und auf PC (Plate Count Agar, Nähragar ohne Zusatz von NaCl) angelegt und über Nacht bei 37°C bebrütet. Vibrionen wachsen auf TCBS als gelbe oder grüne, runde, glatte Kolonien mit einem Durchmesser von etwa 2 bis 5 mm. Auf AAPW wachsen sie als cremefarbene und ebenfalls runde, glatte Kolonien mit einem Durchmesser von etwa 2 bis 5 mm. Auf Plate Count Agar wachsen die halophilen Vibrionen nicht. *Vibrio cholerae* und *Vibrio mimicus* wachsen als runde, glatte, elfenbeinfarbene Kolonien mit geringerem Durchmesser als auf AAPW.

### **8.2.2 Oxidasetest**

Von allen Subkolonien wurde ein Oxidasetest durchgeführt. Dazu wurde mit einem Teststick ein Teil einer Kolonie auf AAPW aufgenommen und die Farbreaktion des Teststicks beobachtet. Eine innerhalb weniger Sekunden auftretende Violettverfärbung zeigt eine positive Reaktion an. Vibrionen sind alle bis auf *Vibrio metschnikovii* Oxidase-positiv.

### **8.2.3 Beweglichkeit**

Von verdächtigen Kolonien wurde die Beweglichkeit überprüft. Dazu wurde eine geringe Menge Koloniematerial vom AAPW auf einem Objektträger in einem Tropfen physiologischer Kochsalzlösung suspendiert und sofort unter dem Mikroskop bei stark zugezogener Blende mit dem 40er Objektiv betrachtet. Vibrionen sind als Stäbchen mit deutlicher und zum Teil sehr schneller Vorwärtsbewegung erkennbar.

## **8.2.4 Gramfärbung**

Nach dem Mikroskopieren wurde der Tropfen, in dem Beweglichkeit beobachtet wurde, an der Luft getrocknet eine Gramfärbung angefertigt.

## **8.2.5 Oxidativer und fermentativer Abbau von Glukose**

Handelte es sich um bewegliche, Oxidase-positive (bei Verdacht auf *Vibrio metschnikovii* auch Oxidase-negative) und gramnegative Stäbchen, wurde der oxidative und fermentative Abbau von Glukose im Oxidations-Fermentations-Testnährboden nach HUGH und LEIFSON überprüft. Hierzu wurde je ein Röhrchen ohne Paraffinüberschichtung und ein Röhrchen mit Paraffinüberschichtung mit der Testkolonie mit einem Stich durch den halbfesten Agar bis zum Röhrchengrund beimpft und bei 37°C 24 bis 48 Stunden bebrütet. Vibrionen sind sowohl zum oxidativen als auch fermentativen Glukoseabbau befähigt, und bilden mit Ausnahme von *V. furnissii* kein Gas aus Glukose. Eine positive Reaktion, also der oxidative und fermentative Abbau von Glukose wurde durch einen Farbumschlag des Agars von grün nach gelb angezeigt. Gasbildung ist durch Gasblasen im Agar erkennbar.

## **8.2.6 Abbau von Glukose mit Überprüfung der Gasbildung**

Alternativ zur Überprüfung des oxidativen und fermentativen Abbaus von Glukose im Oxidations-Fermentations-Testnährboden nach HUGH und LEIFSON wurde bei zahlreichen Proben die Glukoseverwertung und Gasbildung aus Glukose in Glukose-Pepton-Bouillon mit Durhamröhrchen überprüft. Der Abbau von Glukose ist am Farbumschlag von violett nach gelb zu erkennen. Bei Bildung von Gas sammelt sich dieses im Durhamröhrchen.

## **8.2.7 Empfindlichkeit gegenüber dem Vibriostatikum O/129**

Verdächtige Kolonien wurden weiterhin auf die Empfindlichkeit gegenüber dem Vibriostatikum O/129 (2,4-Diamino-6,7-diisopropyl-pteridin-phosphat), erhältlich als O/129-Scheiben mit 10 µg und 150 µg beladen, getestet. Die Testkolonie wurde



flächlich auf AAPW ausgeimpft. Je eine Scheibe mit 10 µg und 150 µg O/129-Gehalt wurde auf diesen beimpften Agar aufgelegt. Nach einer Bebrütung über Nacht bei 37°C wurden die Hemmhöfe beurteilt. Waren Hemmhöfe ausgebildet, wurde eine biochemische Identifizierung vorgenommen.

### 8.2.8 api 20 E-System

Die Identifizierung wurde mit Hilfe des api 20 E-Systems durchgeführt. Mit diesem System können biochemische Reaktionen (**Tabelle 9**) zur Identifizierung von Enterobakteriaceen und anderen nicht anspruchsvollen gramnegativen Stäbchen überprüft werden. Es besteht aus einem Kunststoffstreifen mit 20 Mikroröhrchen mit sich nach oben öffnenden Bechern. Die Mikroröhrchen wurden mit der zu untersuchenden Bakteriensuspension beimpft. Die in den Mikroröhrchen enthaltenen Trockensubstrate wurden dadurch gelöst. Für die Identifizierung von Vibrionen wurde zur Herstellung der Bakteriensuspension eine sterile physiologische Kochsalzlösung verwendet. Gemäß der Anleitung wurden bei der Beimpfung des api-Streifens je nach Anforderung zusätzlich bestimmte Becher bis zum Rand gefüllt (CIT, VP und GEL) sowie einige Röhrchen mit Paraffin überschichtet (ADH, LDC, ODC, H<sub>2</sub>S und URE), um anaerobe Bedingungen zu schaffen. Nach einer Bebrütungsdauer von 24 Stunden bei 37°C in den mitgelieferten Inkubationswannen, die mit demineralisiertem Wasser beschickt wurden, um eine feuchte Kammer zu erzeugen, wurden die biochemischen Reaktionen anhand von Farbumschlägen entweder direkt oder nach Zugabe bestimmter Reagenzien abgelesen. Waren nach 24 Stunden noch keine Reaktionen sichtbar, wurde die Bebrütungsdauer auf bis zu 48 Stunden ausgedehnt und erst dann in bestimmte Mikroröhrchen je ein Tropfen der benötigten Reagenzien zugegeben:

TDA-Test: Zugabe von TDA-Reagenz und Ablesung sofort

IND-Test: Zugabe von JAMES-Reagenz und Ablesung sofort

VP-Test: Zugabe von VP 1 und VP 2 und Ablesung nach 10 Minuten.

Die Reaktionen api-Streifens und das Ergebnis der Oxidase-Reaktion wurden als positiv beziehungsweise negativ in die mitgelieferten Ergebnisblätter eingetragen. Mit

diesen Ergebnisblättern wird ein Zahlencode ermittelt. Mit diesem Zahlencode wurde die Identifizierung mit dem Analytischen Profil Index vorgenommen. Jedem Zahlencode ist eine Spezies, ein Biotyp oder eine Spezies - Gruppierung, welche mit dem api 20 E-System differenziert werden können, zugeordnet.

**Tabelle 9      Ablesetabelle des api 20 E-Systems**

TESTS	SUBSTRATE	REAKTIONEN / ENZYME	ERGEBNISSE	
			negativ	positiv
ONPG	ortho-nitro-phenyl-β-D-Galaktopyranosid (ONPG) Isopropylthiogalaktopyranosid (IPTG)	beta-Galaktosidase	farblos	gelb
ADH	Arginin	Arginindihydrolase	gelb	rot / orange
LDC	Lysin	Lysin-decarboxylase	gelb	rot / orange
ODC	Ornithin	Ornithin-decarboxylase	gelb	rot / orange
CIT	Natriumcitrat	Citratverwertung	blassgrün / gelb	blau-grün / blau
H <sub>2</sub> S	Natriumthiosulfat	H <sub>2</sub> S-Bildung	farblos / gräulich	schwarzer Niederschlag
URE	Harnstoff	Urease	gelb	rot / orange
TDA	Tryptophan	Tryptophan-desaminase	gelb	rötlich-dunkelbraun
IND	Tryptophan	Indolbildung	farblos blassgrün / gelb	rosa
VP	Kreatin Natriumpyruvat	Acetoinbildung	farblos	rosa / rot
GEL	Kohn Gelatine	Gelatinase	keine Diffusion	Diffusion der schwarzen Tusche
GLU	Glukose	Fermentation / Oxidation	blau / blau-grün	gelb
MAN	Mannit	Fermentation / Oxidation	blau / blau-grün	gelb
INO	Inosit	Fermentation / Oxidation	blau / blau-grün	gelb
SOR	Sorbit	Fermentation / Oxidation	blau / blau-grün	gelb
RHA	Rhamnose	Fermentation / Oxidation	blau / blau-grün	gelb
SAC	Saccharose	Fermentation / Oxidation	blau / blau-grün	gelb
MEL	Melibiose	Fermentation / Oxidation	blau / blau-grün	gelb
AMY	Amygdalin	Fermentation / Oxidation	blau / blau-grün	gelb
ARA	Arabinose	Fermentation / Oxidation	blau / blau-grün	gelb

## **8.2.9 Abbau von Laktose**

Ergänzend zum api 20 E-System wurde gegebenenfalls die Laktoseverwertung in Laktose-Pepton-Bouillon überprüft. Der Abbau von Laktose ist am Farbumschlag von violett nach gelb zu erkennen.

## **8.2.10 Wachstum in 6,5%iger NaCl-Bouillon**

Zur Bestätigung wurde gegebenenfalls das Wachstum in 6,5%iger NaCl-Bouillon bei 37°C anhand der Trübung des Mediums beurteilt.

## **8.2.11 O1-Antiserum**

Beim Nachweis von *V. cholerae* wurde mit polyvalentem O1-Antiserum serologisch überprüft, ob es sich um *V. cholerae* O1 handelt. Dazu wurde eine geringe Menge Koloniematerial vom AAPW mit dem Antiserum auf einem Objektträger verrieben und beobachtet, ob es zu einer Agglutination kommt.

## **8.2.12 Nationales Referenzzentrum**

In Fällen, in denen eine Identifizierung mit dem api 20 E-System und weiteren Tests nicht erfolgreich durchgeführt werden konnte, wurde das verdächtige Isolat an die Abteilung Bakteriologie des Hygiene Instituts Hamburg, zugleich Nationales Referenzzentrum für Enteritiserreger geschickt. Dort erfolgte die Stammtypisierung dieser Isolate, wie auch die Untersuchung auf das Vorhandensein der Gene des Cholera-toxins bei *V. cholerae*-Isolaten und der Gene der Hämolyse TDH und TRH bei *V. parahaemolyticus*-Isolaten.

# ERGEBNISSE

## 9 NACHWEIS VON VIBRIO SP. IN DER GESAMTHEIT DER UNTERSUCHTEN PROBEN

Mit den in dieser Versuchsanordnung verwendeten Nachweismethoden, dem Spatelverfahren, dem Membranfiltrationsverfahren und den Anreicherungsverfahren, konnten in 22 Prozent der untersuchten Proben Vibrionen nachgewiesen werden. Dabei handelte es sich um 9 verschiedene Vibrio-Spezies:

<i>V. alginolyticus</i>	n = 10
<i>V. anguillarum</i>	n = 2
<i>V. cholerae</i> non O1	n = 3
<i>V. fluvialis</i>	n = 1
<i>V. hollisae</i>	n = 1
<i>V. metschnikovii</i>	n = 2
<i>V. mimicus</i>	n = 1
<i>V. vulnificus</i>	n = 1
<i>V. parahaemolyticus</i>	n = 2

In zwei Proben wurden Vibrionen nachgewiesen, die jedoch nicht näher differenziert werden konnten. Die Einzelergebnisse sind in **Tabelle 10** im Anhang aufgeführt.



## 10 NACHWEIS VON VIBRIONEN IN DEN ERZEUGNISGRUPPEN

Es konnten sowohl in Muscheln als auch in Garnelen Vibrionen nachgewiesen werden.

Alle **Muscheln**, in denen Vibrionen nachweisbar waren, waren roh und wurden als frische Muscheln angeboten. Es wurden 20 Proben roher Muscheln untersucht. In 10 dieser Proben waren Vibrionen nachweisbar. Die frischen, lebenden Muscheln wurden bis auf zwei Proben gekühlt gelagert und transportiert. Zwei Proben wurden nach der Probenahme durch den WKD eingefroren und zur Untersuchung im Kühlschrank bei + 7°C wieder aufgetaut. Vibrionen waren in Miesmuscheln / *Mytilus edulis* aus der niederländischen und dänischen Nordsee, in Miesmuscheln / *Mytilus galloprovincialis* aus Italien sowie in *Tapes semidecussatus*, „Vongole veraci“ und in als „Fasolari“ und „Vongole verage“ bezeichneten Muscheln aus Italien nachweisbar.

Es wurde eine Probe gegarte Muscheln untersucht. Bei dieser Probe handelte es sich um tiefgefrorene, gegarte grüne Muscheln (*Perna canaliculus*) in der Halbschale aus Neuseeland. In dieser Probe waren keine Vibrionen nachweisbar.

Bei den **Garnelen** lag die Nachweisrate in rohen Erzeugnissen deutlich über der Nachweisrate in hitzebehandelten Erzeugnissen.

In 35 Prozent der untersuchten rohen Garnelen konnten Vibrionen nachgewiesen werden. Bei diesen Proben handelte es sich um Garnelen, die mit Schale und, bis auf zwei Proben, mit Kopf angeboten wurden. Sie stammten aus Thailand, Indonesien und Bangladesh und waren als Tiefkühlprodukt im Handel. Zwei dieser Proben waren bei der Probenahme bereits zur Weiterverarbeitung beziehungsweise zum Verkauf aufgetaut. Die Herkunft dieser beiden Proben wurde bei der Probenahme nicht festgehalten.

Von den 44 untersuchten Proben gegarter und verzehrfertiger Garnelen konnten in 4 Proben Vibrionen nachgewiesen werden, nämlich in tiefgefrorenen *Pandalus borealis* aus Grönland mit Kopf und Schale, in tiefgefrorenen Cocktailgarnelen aus Bangladesh und in aufgetauten und auf Eis liegenden Cocktailgarnelen aus Thailand, jeweils mit Schwanzsegment in Schale sowie in gekühlt gehandelten Eismeergarnelen, die bis zur mikrobiologischen Untersuchung eingefroren wurden.

In keiner der 15 Proben erhitzter aber nicht verzehrfertiger Garnelen konnten Vibrionen nachgewiesen werden. Damit liegt die Nachweisrate in hitzebehandelten Garnelen insgesamt bei 6,8 Prozent.

In nur einer von 24 Proben mit Zusatzstoffen (E 200 (Sorbinsäure), E 202 (Kaliumsorbat), E 210 (Benzoessäure), E 212 (Kalziumbenzoat), E 220 (Schwefeldioxid), E 223 (Natriummetabisulfit), E 330 (Citronensäure), E 450 (Diphosphat) und E 452 (Polyphosphat) sowie Schutzgas) behandelte oder in Lake oder Öl eingelegte Garnelen wurden Vibrionen nachgewiesen. Bei dieser Probe handelte es sich um rohe Riesengarnelen mit Kopf und Schale aus Thailand, die mit E 220 und E 450 behandelt waren.



# **11 VERGLEICH DER UNTERSUCHUNGSVERFAHREN ZUM ERREGERNACHWEIS**

## **11.1 Vergleich Anreicherung mit Keimzählverfahren**

84 Proben wurden sowohl mit dem Anreicherungsverfahren als auch mit beiden Keimzählverfahren, dem Spatel- und dem Membranfiltrationsverfahren untersucht. Davon konnten in 7 Proben sowohl mit dem Anreicherungsverfahren als auch mit mindestens einem der beiden Keimzählverfahren Vibrionen nachgewiesen werden. Allein mit dem Anreicherungsverfahren waren in 7 Proben und in 6 Proben mit mindestens einem der beiden Keimzählverfahren nicht aber mit dem Anreicherungsverfahren Vibrionen nachweisbar.

## **11.2 Vergleich Anreicherung mit Spatelverfahren**

92 Proben wurden mit dem Anreicherungsverfahren und parallel mit dem Spatelverfahren untersucht. Davon konnten in 7 Proben sowohl mit dem Anreicherungsverfahren als auch mit dem Spatelverfahren Vibrionen nachgewiesen werden. 8-mal war ein Nachweis nur mit dem Anreicherungsverfahren und 5-mal nur mit dem Spatelverfahren nicht aber mit dem Anreicherungsverfahren möglich.

## **11.3 Vergleich Anreicherung mit Membranfiltrationsverfahren**

84 Proben wurden mit dem Anreicherungsverfahren und parallel mit dem Membranfiltrationsverfahren untersucht. Davon konnten in 7 Proben sowohl mit dem

Anreicherungsverfahren als auch mit dem Membranfiltrationsverfahren Vibrionen nachgewiesen werden. 7-mal war ein Nachweis nur mit dem Anreicherungsverfahren und 3-mal nur mit dem Membranfiltrationsverfahren nicht aber mit dem Anreicherungsverfahren möglich.

## **11.4 Vergleich Anreicherung 6 h mit 18-24 h**

Bei 70 Ansätzen erfolgte sowohl nach sechs Stunden als auch nach 18 bis 24 Stunden Bebrütungsdauer in alkalischem Peptonwasser ein Ösenausstrich auf TCBS-Agar. Davon waren 12 Anreicherungsansätze positiv. Bei 6 Ansätzen wurden sowohl nach sechs Stunden als auch nach 18 bis 24 Stunden Bebrütungsdauer Vibrionen nachgewiesen. In 5 Fällen konnten jedoch nur nach 18 bis 24 Stunden Bebrütungsdauer und bei einer Probe nur nach sechs Stunden, nicht aber nach 18 bis 24 Stunden Bebrütungsdauer Vibrionen nachgewiesen werden.

## **11.5 Vergleich Membranfiltrations- mit Spatelverfahren**

Die von VENKATESWARAN et al. (1989) beschriebenen höheren Nachweisraten mit der eine Wiederbelebungsphase beinhaltenden Membranfiltrationsmethode konnten in dieser Arbeit nicht erzielt werden. 87 Proben wurden parallel mit dem Membranfiltrations- und dem Spatelverfahren untersucht. Bei 9 Proben erbrachten beide Methoden jeweils den Nachweis von Vibrionen. In 3 Fällen konnte jedoch nur mit dem Spatelverfahren aber nicht mit der Membranfiltrationsmethode ein positives Ergebnis erzielt werden. Einmal war nur mit der Membranfiltrationsmethode ein positives Ergebnis, nicht aber mit dem Spatelverfahren zu erzielen.

## 12 VORKOMMEN IM EINZELNEN

Nachfolgend sind in chronologischer Reihenfolge die nachgewiesenen Vibrionen aufgeführt.

V. alginolyticus wurde in Miesmuscheln, *Mytilus galloprovincialis* aus Italien (Probe Nr.01-004829) mit dem in Anreicherungs-, dem Spatelverfahren und der Membranfiltration nachgewiesen. Die Keimzahlen betragen jeweils unter  $2,0 \times 10^2$  KbE/g.

In Salzwasser Riesengarnelen aus Bangladesh, die mit Kopf, mit Schale und tiefgefroren angeboten wurden (Probe Nr.01-007445), wurde V. mimicus nachgewiesen. Zu dem positiven Ergebnis führte eine einzige Kolonie, die im Spatelverfahren in der Verdünnungsstufe 1 auf TCBS gewachsen war. Ein Nachweis aus der Anreicherung (verdächtige Kolonien stellten sich in der Subkultivierung als untypisch heraus: mit schwarzem Zentrum und Oxidase negativ) sowie aus der Membranfiltration gelang nicht, zudem war die Verdünnungsstufe 1 nicht filtrierbar. Die Identifizierung mit dem api 20 E-System ist gelungen (Code 5146104).

V. cholerae war in Garnelen, „Jamberoni“ gefroren (Offene Ware) und unbekannter Herkunft (Probe Nr.01-007608) aus der Anreicherung nachweisbar. Die Identifizierung mit dem api 20 E-System ist gelungen (Code 5146125). Eine Untersuchung am Hygiene Institut Hamburg ergab keinen Nachweis der Nukleinsäure des *Vibrio cholerae*-Toxins. Die Quantitative Untersuchung mit dem Spatelverfahren und der Membranfiltration verlief negativ. Verdünnungsstufe 1 war nicht filtrierbar.

V. fluvialis wurde in Muscheln, *Tapes semidecussatus* („Vongole veraci“) aus Italien (Probe Nr.01-007973) im Spatelverfahren und in der Membranfiltration mit jeweils unter  $2,0 \times 10^2$  KbE/g nachgewiesen. Der Identifizierungscode des api 20 E-Systems war nicht eindeutig. Das Ergebnis lautete „Aeromonas oder *Vibrio fluvialis*“. Eine Identifizierung als *Vibrio fluvialis* wurde durch Überprüfung von Wachstum in 6%iger

NaCl-Bouillon vorgenommen. Ein Zweites Ergebnis des api 20 E-Systems war „*Vibrio fluvialis* oder *Vibrio alginolyticus*“. Eine weitere Differenzierung wurde nicht vorgenommen. Die Kolonien zeigten sich auf TCBS jeweils im Durchmesser 1 bis 2 mm groß, gelb und schleimig. Ein Nachweis aus der Anreicherung gelang nicht, verdächtige Kolonien konnten nicht bestätigt werden.

*V. alginolyticus* wurde in Grönland-Garnelen, *Pandalus borealis* in der Schale, gekocht und tiefgefroren (Probe Nr.01-009305) im Anreicherungsverfahren nachgewiesen. Nach sechsständiger Anreicherung war noch kein Wachstum zu verzeichnen. Die Kolonien hatten auf TCBS einen Durchmesser von 5 mm und waren gelb und schleimig. Die Identifizierung mit dem api 20 E-System ist gelungen (Code 0144125). Ein Nachweis im Spatelverfahren und in Membranfiltration gelang nicht.

*V. alginolyticus* wurde in Muscheln, „Fasolari“ aus Italien (Probe Nr.01-009565) mit dem Anreicherungsverfahren sowie im Spatelverfahren und in der Membranfiltration mit jeweils unter  $2,0 \times 10^2$  KbE/g gefunden. Die Kolonien hatten auf TCBS einen Durchmesser von 5 mm und waren gelb und schleimig. Die Identifizierung mit dem api 20 E-System ist gelungen (Code 0046124 und 4146124).

*V. alginolyticus* wurde in Muscheln, „Vongele verage“ aus Italien (Probe Nr.01-009566) mit dem Anreicherungsverfahren, im Spatelverfahren und in der Membranfiltration mit jeweils unter  $2,0 \times 10^3$  KbE/g gefunden. Die Verdünnungsstufe 1 war jeweils nicht zählbar, da sehr viele verschiedene Koloniemorphologien vorhanden waren und die Kolonien dicht gedrängt wuchsen. Die Kolonien aus den Keimzählungen waren auf TCBS im Durchmesser 2 mm groß und gelb. Im Anreicherungsverfahren waren sie im Durchmesser 3 bis 4 mm groß, gelb-nachgrünend und schleimig. Die Identifizierung mit dem api 20 E-System ist gelungen (Code 0046124 und 4146124 und 4044125).

In Riesengarnelen, „Freshwater-Qualität“, roh, ohne Kopf, in der Schale, tiefgefroren aus Bangladesh (Probe Nr.01-009919) war *V. cholerae* nach 18- bis 24-stündiger Anreicherung nachweisbar. Nach sechsständiger Anreicherung war noch kein

Wachstum zu verzeichnen. Ein Nachweis mit Spatelverfahren und Membranfiltration gelang nicht. Die Identifizierung mit dem api 20 E-System ist gelungen (Code 5346124). Eine eigene Serotypisierung ergab *Vibrio cholerae* non O1. Eine Untersuchung am Hygiene Institut Hamburg ergab keinen Nachweis der Nukleinsäure des *Vibrio cholerae*-Toxins.

In gekochten Eismeergarnelen mit Kopf und Schale (Probe Nr.01-011513) wurde *V. alginolyticus* gefunden. Der Nachweis gelang im Anreicherungsverfahren und die Identifizierung mit dem api 20 E-System (Code 0046124). Die Kolonien zeigten auf TCBS einen Durchmesser von 4 mm und waren gelb nachgrünend. Der Nachweis in sechsständiger Anreicherung, im Spatelverfahren und in der Membranfiltration gelang nicht.

*V. alginolyticus* wurde in Cocktailgarnelen, „Seawater-Qualität“, geschält, Darm gezogen, mit Schwanzsegment, in der Schale, gekocht, tiefgefroren aus Bangladesh (Probe Nr.01-013183) in der Anreicherung nachgewiesen. Nach sechsständiger Anreicherung war noch kein Wachstum zu verzeichnen. Die Kolonien waren auf TCBS grün und hatten einen Durchmesser von 5 mm. Die Identifizierung mit dem api 20 E-System ist gelungen (Code 0146124). Ein Nachweis im Spatelverfahren und in der Membranfiltration gelang nicht.

*V. cholerae* wurde in Riesengarnelen, roh, mit Kopf und Schale, tiefgefroren aus Indonesien (Probe Nr.01-013287) im Anreicherungsverfahren nachgewiesen. Nach sechsständiger Anreicherung war noch kein Wachstum zu verzeichnen und ein Nachweis mit Spatelverfahren und Membranfiltration gelang nicht. Die Identifizierung mit dem api 20 E-System ist gelungen (Code 5146124). Die eigene Serotypisierung und die Untersuchung am Hygiene Institut Hamburg ergab *Vibrio cholerae* Gruppe non O1.

In der Anreicherung und sowohl im Spatelverfahren als auch im Membranfiltrationsverfahren wurde *V. alginolyticus* jeweils unter  $2,0 \times 10^2$  KbE/g in Muscheln, *Tapes semidecussatus* („Vongole veraci“) aus Italien (Probe Nr.01-015553) nachgewiesen. Die Kolonien hatten auf TCBS einen Durchmesser von

4 mm und waren gelb und schleimig. Die Identifizierung mit dem api 20 E-System ist gelungen (Code 4146124).

In den Muscheln (Probe Nr.01-015553), *Tapes semidecussatus* („Vongole veraci“) aus Italien wurde weiterhin *V. vulnificus* nachgewiesen. Die Kolonien hatten auf TCBS einen Durchmesser von 3 mm und waren grün. Die Identifizierung mit dem api 20 E-System gelang zunächst nicht. Das Isolat reagierte sensibel gegenüber O/129. In späterer Wiederholung (das Isolat wurde in Cryoröhrchen bei  $-70^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt) ist die Identifizierung mit dem api 20 E-System gelungen (Code 1046105). Der Nachweis wurde durch das Hygiene Institut Hamburg bestätigt.

*V. parahaemolyticus* wurde in Riesengarnelen, Black Tiger, „Seawater-Qualität“, mit Kopf und Schale, roh, tiefgefroren aus Thailand, Indopazifik (Probe Nr. 01-015566) im Anreicherungs-, im Spatel- und im Membranfiltrationsverfahren jeweils unter  $2,0 \times 10^2$  KbE/g nachgewiesen. Die Kolonien waren auf TCBS grün und hatten einen Durchmesser von 4 bis 5 mm. Die Identifizierung mit dem api 20 E-System ist gelungen (Code 4346117). Eine Untersuchung am Hygiene Institut Hamburg ergab keinen Nachweis der Nukleinsäure der Hämolsine TDH (Kanagawa-Phänomen) und TRH.

*V. anguillarum* wurde in frischen Miesmuscheln, *Mytilus edulis* aus den Niederlanden (Probe Nr.01-015592) mit der Membranfiltration in einer Höhe von unter  $2,0 \times 10^2$  KbE/g nachgewiesen. Die Identifizierung mit dem api 20 E-System war nicht eindeutig (Code 1046524) und ergab die „Möglichkeit von *Vibrio fluvialis*“. Die Identifizierung wurde am Hygiene Institut Hamburg vorgenommen. Die Kolonien waren auf TCBS im Durchmesser 3 mm groß, gelb und durchscheinend. Ein Nachweis aus der Anreicherung und mit dem Spatelverfahren gelang nicht, verdächtige Kolonien konnten nicht bestätigt werden.

*V. hollisae* wurde in frischen Miesmuscheln, *Mytilus edulis* aus den Niederlanden (Probe Nr.01-015592) mit dem Spatelverfahren gefunden ( $< 2,0 \times 10^2$  KbE/g). Die Identifizierung mit dem api 20 E-System war gelungen (Code 1040004), die Kolonien im Durchmesser 3 mm groß und grün. Ein Nachweis aus der Anreicherung und mit

der Membranfiltration gelang nicht, verdächtige Kolonien konnten nicht bestätigt werden.

In frischen SeemuscheIn, *Mytilus edulis* (Probe Nr.01-015593) wurde mit der Membranfiltration *Vibrio sp.* nachgewiesen ( $< 2,0 \times 10^2$  KbE/g). Die Kolonien waren auf TCBS gelb und im Durchmesser 3 mm groß, fermentierten Glukose unter Säure- aber ohne Gasbildung und waren O/129 sensibel. Eine Identifizierung mit dem api 20 E-System ist nicht gelungen.

*V. metschnikovii* wurde in Riesengarnelen, roh, ohne Kopf, mit Schale, getaut (Offene Ware) (Probe Nr.01-015594) mit dem Spatelverfahren nachgewiesen ( $< 2,0 \times 10^2$  KbE/g). Die Identifizierung mit dem api 20 E-System war nicht eindeutig (Code 1046120) und ergab die „Möglichkeit von *Vibrio metschnikovii*“. Die Identifizierung wurde am Hygiene Institut Hamburg vorgenommen. Die Kolonien waren auf TCBS im Durchmesser 3 mm groß und gelb. Ein Nachweis aus der Anreicherung und mit der Membranfiltration gelang nicht; verdächtige Kolonien konnten nicht bestätigt werden.

*V. alginolyticus* wurde in frischen MuscheIn aus den Niederlanden (Probe Nr.01-017038) im Anreicherungsverfahren nachgewiesen. Auf TCBS hatten die Kolonien einen Durchmesser von 5 mm und waren schleimig und gelb nachgrünend. Die Identifizierung mit dem api 20 E-System ist gelungen (Code 0046124). Das Spatelverfahren und die Membranfiltration wurden nicht durchgeführt.

In frischen MuscheIn aus der Nordsee (Probe Nr.01-018859) wurde *V. alginolyticus* nach sechsständiger, nicht aber nach 18- bis 24-stündiger Anreicherung gefunden. Die Kolonien waren auf TCBS im Durchmesser 4 mm groß, schleimig und gelb nachgrünend. Die Identifizierung mit dem api 20 E-System ist gelungen (Code 1146124). Ein Nachweis mit dem Spatelverfahren gelang nicht. Die Membranfiltration wurde nicht durchgeführt.

*V. anguillarum* wurde in frischen MiesmuscheIn, *Mytilus edulis* aus Dänemark (Probe Nr.01-019479) mit dem Spatelverfahren nachgewiesen ( $< 2,0 \times 10^2$  KbE/g). Die

Identifizierung mit dem api 20 E-System ergab die „Möglichkeit von *Vibrio hollisae*“. Die Identifizierung am Hygiene Institut Hamburg ergab *V. anguillarum*. Die Kolonien hatten auf TCBS einen Durchmesser von 3 mm und waren gelb und halbdurchscheinend. Ein Nachweis mit der Membranfiltration und aus der Anreicherung gelang nicht. Verdünnungsstufe 1 war nicht filtrierbar und jeweils gewachsene Kolonien waren unverdächtig.

*V. alginolyticus* war in Riesengarnelen, Black Tiger, mit Kopf und Schale, roh, tiefgefroren aus Thailand (Probe Nr. 02-000844) in der Anreicherung und mit einer Kolonie in Verdünnungsstufe 1 im Spatelverfahren und mit einer Kolonie in Verdünnungsstufe 2 in der Membranfiltration nachweisbar. Die Kolonien hatten auf TCBS einen Durchmesser von 5 mm und waren schleimig und gelb nachgrünend. Die Identifizierung mit dem api 20 E-System ist gelungen (Code 0146124, 4046124 und 4146124).

In Cocktailgarnelen, gegart, ohne Kopf, geschält, mit Schwanzsegment in der Schale, getaut (Probe Nr.02-001913) wurde *V. metschnikovii* nach 18- bis 24-stündiger Anreicherung nachgewiesen. Das api 20 E-System erbrachte kein ganz eindeutiges Ergebnis (Code 3006520). Die Identifizierung gelang mit einem zusätzlichen Voges-Proskauer-Test. Die Kolonien waren auf TCBS im Durchmesser 3 mm groß und gelb. Ein Nachweis aus sechsstündiger Anreicherung und mit dem Spatelverfahren und der Membranfiltration gelang nicht.

*V. parahaemolyticus* war in Gambas, Salzwasser Riesengarnelen, mit Kopf und Schale, roh, tiefgefroren und mit einem Zusatz von E 220 und E 452 aus Thailand, (Probe Nr. 02-007302) mit allen drei Methoden nachweisbar ( $< 2,0 \times 10^2$  KbE/g). Die Kolonien wuchsen auf TCBS grün mit einem Durchmesser von 3 bis 4 mm. Die Identifizierung mit dem api 20 E-System ist gelungen (Code 4146105) und die Untersuchung auf Nukleinsäure der Hämolytase TDH (Kanagawa-Phänomen) und TRH am Hygiene Institut Hamburg ergab ein negatives Ergebnis.

In den Gambas (Probe Nr. 02-007302), Salzwasser Riesengarnelen, mit Kopf und Schale, roh, tiefgefroren und mit einem Zusatz von E 220 und E 452 aus Thailand



war weiterhin Vibrio sp. in der sechsstündigen Anreicherung und in der Membranfiltration ( $< 2,0 \times 10^2$  KbE/g) nachweisbar. Die Kolonien hatten auf TCBS einen Durchmesser von 3 bis 4 mm und waren gelb. Eine Identifizierung mit dem api 20 E-System gelang nicht und zeigte eine indifferente Tryptophan-Reaktion. Eine Untersuchung am Hygiene Institut Hamburg ergab *Vibrio species* ähnlich *V. anguillarum* l.

### 13 ANDERE ISOLIERTE KEIME AUF TCBS-AGAR

In Freshwater King Prawns (Offene Ware) (Probe Nr.01-009561) und in Riesengarnelen mit Schale aus Südostasien (Probe Nr.01-017035) war laut api 20 E-System mit einer sehr guten Identifizierung (Code 7246105 bzw. 7046105) Aeromonas sobria nachweisbar. Auffällig war jedoch jeweils das positive Wachstum in 6%iger NaCl-Lösung. Die Kolonien waren auf TCBS grün und hatten einen Durchmesser von 1 mm, auf AAPW 4 mm und auf PC 2 bis 2,5 mm.

Grampositive Kokken wurden in Garnelen, eingelegt in Salzlake (Probe Nr.01-011405) gefunden. Die Kolonien waren auf TCBS hellgelb und hatten einen Durchmesser von 1 mm und auf AAPW und PC von 2 mm.

In „Scampi-Spiessen“, Garnelen roh, geschält, tiefgefroren wurden Sporenbildner gefunden. Die Kolonien waren auf TCBS bläulich und hatten einen Durchmesser von 1,5 bis 3 mm, auf AAPW 2 mm und wuchsen auf PC winzig.

Gramnegative Kokken wurden in Garnelen (*Penaeus* sp.), gekocht, geschält, tiefgefroren aus dem Indischen Ozean als blassgelbe, auf TCBS im Durchmesser 1 mm große Kolonien gefunden.

Pseudomonas sp. wurde in Riesengarnelen, King Prawn, gegart, ohne Kopf, geschält, mit Schwanzsegment in der Schale, getaut gefunden. Auf TCBS hatten die Kolonien einen Durchmesser von 1 mm und waren grün.

## 14 ERFAHRUNGEN MIT DEM TCBS-AGAR

Die verschiedenen in dieser Arbeit nachgewiesenen Vibrionen zeigten jeweils unterschiedliche Koloniemorphologien auf dem Selektivnährmedium TCBS-Agar (Thiosulfat-Zitrat-Galle-Saccharose-Agar). Alle Saccharose-verwertenden Vibrionen bildeten gelbe und solche Vibrionen, die keine Saccharose abbauen, bildeten grüne Kolonien auf TCBS-Agar. Die Saccharose-verwertenden Vibrionen boten eine breite Palette verschiedener Gelbtöne von dottergelb und opak (*V. fluvialis*), über dottergelb und halbdurchscheinend (*V. metschnikovii*) bis schmutziggelb und opak (*V. alginolyticus*). Erschwerend für die Beurteilung der Koloniefarbe kam hinzu, dass bei einigen Isolaten die gelbe Färbung mehr oder weniger schnell verloren ging und die Kolonien zunehmend grüner wurden. Kolonien von *V. cholerae* non O1 und *V. alginolyticus* verloren besonders schnell ihre gelbe Färbung. Bereits innerhalb einer Stunde bei Lagerung der bebrüteten Agarplatten bei Raumtemperatur ist die Koloniefarbe von *V. alginolyticus* von gelb nach hellgrün umgeschlagen (**Farbtafel 3 und 4**). Die Koloniefarbe der nicht-Saccharose-verwertenden Vibrionen war dagegen relativ einheitlich kräftig dunkelgrün. Der Farbton ähnelte dem der dunkelgrünen TCBS-Agarfarbe (**Farbtafel 5**). Uneinheitlich waren auch die Kolonieförmigkeiten. *V. anguillarum* bildete flache, knopfförmige und *V. alginolyticus* sehr schleimige Kolonien. Die Kolonien der übrigen nachgewiesenen Vibrionen waren erhaben und je nach Spezies unterschiedlich feucht. Allen gemeinsam war eine runde Form mit glattem Rand und glatter Oberfläche. Aufgrund dieser beschriebenen unterschiedlichen Koloniemorphologien der Vibrionen auf TCBS-Agar in Verbindung mit dem Wachstum anderer Mikroorganismen, wie zum Beispiel Aeromonaden, Sporenbildner und Kokken, war das Auffinden der Vibrio-Kolonien insbesondere bei stark bewachsenen Agarplatten erschwert. Besonders beim Anreicherungsverfahren in alkalischen Peptonwasser und bei der Membranfiltrationsmethode, die eine sechsstündige Bebrütung des Membranfilters auf Agar aus alkalischem Peptonwasser vorsieht, war zum Teil sehr starkes Wachstum von Fremdkeimen zu verzeichnen.

## 15 UNTERSUCHUNGSVERFAHREN ZUR ERREGERIDENTIFIZIERUNG

### 15.1 Vergleich Glukose-Pepton-Bouillon mit OF- Testnährboden

Der oxidative und fermentative Abbau von Glukose im halbfesten Oxidations-Fermentations-Testnährboden nach HUGH und LEIFSON (OF-Testnährboden) soll durch einen Farbumschlag der grünen Nährböden mit und ohne Paraffinüberschichtung nach Gelb angezeigt werden. Bei einer Überprüfung der Nährböden (mit und ohne Paraffinüberschichtung) mit verschiedenen *Vibrio*-Stämmen zeigte sich jedoch, dass nicht alle Stämme zu einem deutlichen Farbumschlag führten. Während der verwendete *Vibrio cholerae* non O1-Teststamm nach einer Bebrütungszeit von 24 Stunden bei 37°C zu einer eindeutigen Gelbfärbung der OF-Testnährböden geführt hat, führten der *Vibrio parahaemolyticus*- und der *Vibrio alginolyticus*-Teststamm nur zu einer leichten Verfärbung nach hellgrün (**Farbtafel 6**). Auch nach Verlängerung der Bebrütungszeit auf 48 Stunden wurde der Farbumschlag nicht deutlicher.

In der Glukose-Pepton-Bouillon zeigten alle drei Teststämme nach einer Bebrütungszeit von 24 Stunden bei 37°C einen deutlichen Farbumschlag von Violett nach Gelb (**Farbtafel 6**).

### 15.2 Erfahrungen und Probleme mit dem api 20 E-System

Das api 20 E-System ist nur zur Identifizierung der in der zugehörigen Datenbasis aufgeführten Keime bestimmt. In der aktuellen Version sind folgende Spezies aus der Familie der *Vibrionaceae* enthalten: *Aeromonas hydrophila* Gruppe I, *Aeromonas hydrophila* Gruppe II, *Aeromonas salmonicida* ssp. *salmonicida*, *Photobacterium (Vibrio) damsela*, *Plesiomonas shigelloides*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio cholerae*,

*Vibrio fluvialis*, *Vibrio hollisae*, *Vibrio mimicus*, *Vibrio parahaemolyticus* und *Vibrio vulnificus*. In einer älteren Version war außerdem noch *Vibrio metschnikovii* und *Aeromonas sobria* enthalten. Wegen zu großer Verwechslungsgefahr mit anderen Keimen wurden sie jedoch aus der Liste gestrichen. In der Datenbasis nicht aufgeführte Keime können mit diesem System nicht identifiziert werden. Sucht man jedoch nur nach den in gesundheitsgefährdender Hinsicht bedeutsameren Spezies *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* und *Vibrio vulnificus*, ist das api 20 E-System gut zur Identifizierung geeignet (**Farbtafel 7**).

*Vibrio fluvialis* und *Aeromonas hydrophila* sind in ihren biochemischen Eigenschaften sehr ähnlich. Sie können allein aufgrund der Reaktionen im api 20 E-System nicht unterschieden werden. Eine Differenzierung ist jedoch aufgrund des Wachstums bei 0 Prozent und 6 Prozent NaCl-Konzentration und der Sensitivität gegenüber dem Vibriostatikum O/129 möglich. *Vibrio fluvialis* zeigt im Gegensatz zu *Aeromonas hydrophila* gutes Wachstum in 6 %iger Kochsalz-Bouillon. Während *Aeromonas hydrophila* resistent gegenüber dem Vibriostatikum O/129 ist, reagiert *Vibrio fluvialis* sensibel (**Farbtafel 8**).



# DISKUSSION

## 16 BEWERTUNG DER UNTERSUCHUNGSMETHODEN

### 16.1 Membranfiltrationsverfahren

In dieser Versuchsreihe konnte mit dem Membranfiltrationsverfahren keine höhere Nachweisrate erzielt werden als mit dem Spatelverfahren. Das Membranfiltrationsverfahren beinhaltet einen sechstündigen Wiederbelebungsschritt, nämlich die Bebrütung des Membranfilters auf einem Agar aus alkalischem Peptonwasser. Da alkalisches Peptonwasser nur eine sehr geringe Selektivität aufweist, wird nicht nur das Wachstum der Vibrionen gefördert. Nach dem Umlegen des Membranfilters auf den TCBS-Agar scheint dieser dann nicht mehr ausreichend in der Lage zu sein, die neben den gesuchten Vibrionen gewachsenen Keime zu unterdrücken. Bei Proben mit insgesamt stärkerer Keimbelastung ist das Koloniewachstum auf dem Membranfilter derart dicht, dass keine Einzelkolonien zur Beurteilung mehr zur Verfügung stehen. Der Membranfilter ist nicht auswertbar. Die Auswertung wird auch dadurch erschwert, dass die Fläche des Membranfilters deutlich kleiner ist als die einer Petrischale. Die Kolonien liegen deutlich enger beieinander und sind kleiner. Während beim Spatelverfahren 1 Milliliter der Verdünnungsstufe 1 auf drei Agarplatten jeweils mit einem Durchmesser von 85 Millimetern verteilt wird, steht beim Membranfiltrationsverfahren für die gleiche Probenmenge nur die Fläche eines Membranfilters mit einem Durchmesser von 45 Millimetern zur Verfügung. Auf dem Membranfilter zurückbleibendes Probenmaterial stört das Koloniewachstum und erschwert dadurch die Auswertung (**Farbtafel 9**).

## 16.2 Anreicherungsverfahren

Insgesamt war mit dem Anreicherungsverfahren die größte Nachweisrate zu erzielen. In etwa einem Drittel der Fälle führte jedoch mindestens eines der beiden Keimzählverfahren zu einem Nachweis, nicht aber das Anreicherungsverfahren. Mit dem alkalischen Peptonwasser wurde bewusst ein sehr wenig selektives Anreicherungsmedium gewählt, um auch geschädigte oder gestresste Keime mit zu erfassen. Aufgrund der geringen Selektivität kann es jedoch zu einer Unterdrückung der Vibrionen durch zu starke Begleitflora und Abfall des pH-Wertes kommen.

In dieser Versuchsreihe konnte also die Nachweisrate insgesamt durch den Einsatz der Keimzählverfahren erhöht werden. Für einen effektiveren Nachweis von *Vibrio* sp. aus Lebensmitteln sollte daher das Anreicherungsverfahren mit dem Spatelverfahren kombiniert werden.

## 16.3 Anwendbarkeit in der Routinediagnostik

Die zum Nachweis von Vibrionen benötigten Nährmedien und Reagenzien sind entweder im Handel erhältlich oder in der eigenen Nährbodenküche herzustellen. Jedoch muss an dieser Stelle darauf hingewiesen werden, dass die Selektivität eines kommerziellen TCBS-Agars von Charge zu Charge schwanken kann und daher eine Qualitätskontrolle erfolgen sollte (ICMSF, 1996, WONG und DESMARCHELIER, 1999). STEPHAN et al. (2002) rät, einen TCBS-Agar ohne Natriumcholat-Zusatz zu verwenden, da er festgestellt hatte, dass Natriumcholat das Wachstum der Vibrionen zu stark hemmte.

Innerhalb von fünf Tagen kann man mit den hier vorgestellten Nachweismethoden zu einem Ergebnis auf Speziesebene gelangen. Im Falle von *V. cholerae* und *V. parahaemolyticus* muss noch eine weitergehende Differenzierung z.B. durch ein Referenzlabor erfolgen. Das hier vorgestellte Anreicherungs- und Spatelverfahren zum Nachweis von Vibrionen kann jeweils ohne besonderen Aufwand in den



Routinebetrieb eines Labors integriert werden. Für das Membranfiltrationsverfahren muss eine Filtrationsanlage vorhanden sein beziehungsweise erst angeschafft werden.



## 17 BEDEUTUNG FÜR DIE LEBENSMITTELHYGIENE

Nach der Literatur besitzt diese Erregergruppe als Lebensmittelinfektionserreger nur Bedeutung, sofern die Ernährungsgewohnheiten den Genuss roher oder halbroher Erzeugnisse aus Krusten- und Schalentieren sowie Fischen einschließt.

Vibrionen sind natürliche Kontaminanten von rohen Meeresfrüchten. Durch Erhitzen werden sie jedoch schnell abgetötet. Dennoch kommt es zu Lebensmittelinfektionen, wenn beim Erhitzen im Kern die für die Abtötung notwendige Temperatur von 65°C nicht erreicht wurde, was bei Krustentieren vorkommen kann, da das Fleisch schon vorher gegart erscheint und die erwünschte schmackhafte Konsistenz hat. Durch das Kochen wird die Konkurrenzflora abgetötet und Wachstumsinhibitoren werden zerstört. Überlebende oder durch Rekontamination in das Lebensmittel gelangte Vibrionen können sich nun ungehindert vermehren (DESMARCHELIER, 1999, MORRIS, 1993, WONG und DESMARCHELIER, 1999).

Vibrionen überleben in Schalen- und Krustentieren je nach Temperatur 15 bis 45 Tage. In gefrorenen Meeresfrüchten können sie bis zu sechs Monate überleben. Meeresfrüchte, besonders Importware aus wärmeren Ländern, bergen somit stets die Gefahr, mit pathogenen Vibrionen belastet zu sein. Personen mit erhöhtem Infektionsrisiko sollten auf rohe Meeresfrüchte, insbesondere auf Austern, verzichten (DESMARCHELIER, 1999, WONG und DESMARCHELIER, 1999). Aber auch aus europäischen Küstengewässern konnten pathogene Vibrionen isoliert werden. So z.B. aus der italienischen Adria, wo Meeresfrüchte geerntet werden und Badestrände verbreitet sind (BARBIERI und FALZANO, 1999). Und STEPHAN und KNABNER stellten fest, dass die Nordsee und Ostsee als ein natürlicher Standort für die Spezies *V. vulnificus* betrachtet werden müssen (STEPHAN und KNABNER, 1996).

Im Rahmen der Lebensmittelhygiene nehmen die Vibrionen in Deutschland vielleicht keine herausragende Stellung ein. Es ist jedoch festzuhalten, dass sie mit der

Umstellung der Ernährungsgewohnheiten in unseren Regionen zunehmend als Krankheitserreger in das Bewusstsein der Öffentlichkeit gerückt sind.

Die Ergebnisse der eigenen Untersuchungen verdeutlichen, dass ein recht hoher Anteil der in Deutschland im Handel befindlichen Muscheln und Garnelen mit Vibrionen belastet ist. Besonders hervorzuheben ist dabei, dass auch in gegarten und verzehrfertigen Garnelen Vibrionen nachweisbar waren. So muss davon ausgegangen werden, dass in Deutschland im Handel befindliche Meeresfrüchte mit pathogenen Vibrionen kontaminiert sein können. In dieser Arbeit wurden Vibrionen nur qualitativ nachgewiesen oder nur geringe Keimgehalte ermittelt. Bei unsachgemäßer Behandlung der Produkte, wie durch zu warme Lagerung oder mangelnde Hygiene bei der Zubereitung, kann es jedoch durch starke Keimvermehrung zu kritischen Keimgehalten kommen. Besonders für kranke und immungeschwächte Personen stellt der Verzehr roher Meeresfrüchte, wie Austern, sowie unzureichend erhitzter oder rekontaminierter Meeresfrüchte ein ernstzunehmendes Infektionsrisiko dar.

In Deutschland ist nach dem gegenwärtigen Stand der Rechtslage in der Fischhygieneverordnung (N.N., 2000b) festgelegt, dass lebende Muscheln nur in den Verkehr gebracht werden dürfen, wenn sie weniger als 300 Fäkalcoliforme oder 230 *Escherichia coli* pro 100 g Muschelfleisch und Schalenflüssigkeit enthalten. In 25 g Muschelfleisch dürfen keine Salmonellen nachweisbar sein. Für gekochte Krebs- und Weichtiere ist für *Staphylococcus aureus* ein Grenzwert von 1000 pro Gramm Krebs- oder Weichtierfleisch und für Salmonellen ebenfalls eine Null-Toleranz festgelegt. Bei der Einfuhr sind Fischereierzeugnisse und lebende Muscheln mikrobiologisch nach näherer Anweisung der zuständigen Behörde zu untersuchen. Wer Erzeugnisse in Betrieben herstellt und behandelt, hat durch betriebseigene Kontrollen die Einhaltung der mikrobiologischen Normen für gekochte Krebs- und Weichtiere der Entscheidung der Kommission von 15. Dezember 1992 (93/51/EWG) zu überwachen. Hier sind für *Staphylococcus aureus* und thermophile Coliforme beziehungsweise *Escherichia coli* Grenzwerte und für Salmonellen ebenfalls wieder eine Null-Toleranz festgelegt. Ferner dürfen pathogene Keime und ihre Toxine nicht in gesundheitsschädlicher Menge vorhanden sein. Vibrionen sind nicht ausdrücklich erwähnt und daher unter

der allgemeinen Erfassung eingeschlossen. Im Hinblick auf die aufgezeigte Problematik dürfte die Festlegung von Grenzwerten beziehungsweise einer Null-Toleranz eine angemessene Forderung sein.

## 18 KONKRETE GESUNDHEITSGEFAHR

Die minimale infektiöse Dosis beträgt für *V. parahaemolyticus* über  $10^5$  Keime (BAUMGART, 1998). In den Jahren 1997 und 1998 kam es zu Erkrankungen durch *V. parahaemolyticus* durch den Verzehr von Krusten- und Schalentieren und Erzeugnissen daraus, die aus nordamerikanischen Küstengewässern stammten. Austern, die aus betroffenen Gebieten geerntet worden waren, wiesen jedoch mit 200 KbE/g deutlich geringere Keimzahlen an *V. parahaemolyticus* auf, sodass vermutet werden kann, dass Erkrankungen schon durch geringere Keimzahlen möglich sind (WECHSLER, 1999). Laut VENKATESWARAN fordern die US Food and Drugs Administration (USFDA) und Japanische Standards für *V. parahaemolyticus* eine Null-Toleranz in Lebensmitteln (VENKATESWARAN, 1999). Im Anhang 5 der FDA und EPA Guidance Levels (Stand Januar 1998) ist jedoch ein Toleranzwert von  $1 \times 10^4$ /g für *V. parahaemolyticus* (Kanagawa-positiv oder -negativ) angegeben. Auf der 51. Arbeitstagung des Arbeitskreises Lebensmittelhygienischer Tierärztlicher Sachverständiger (ALTS) 1998 wurde festgehalten, dass beim Nachweis von *V. parahaemolyticus* auf das Kanagawa-Phänomen zu untersuchen ist und in keiner der untersuchten Proben Kanagawa-positive *V. parahaemolyticus*-Stämme nachweisbar sein dürfen.

Da zur Zeit nicht möglich ist, zwischen stark virulenten und weniger virulenten Stämmen von *V. vulnificus* zu unterscheiden, und die Erkrankungsraten auch bei hoher Kontamination der Muscheln gering sind, auf der anderen Seite aber die Mortalität bei Menschen mit beeinträchtigtem Immunsystem hoch ist (40 - 60 %), sind Grenzwerte für eine akzeptable Anzahl von *V. vulnificus* in rohen Meeresfrüchten

schwierig festzulegen (DESMARCHELIER, 1999). Im Anhang 5 der FDA und EPA Guidance Levels (Stand Januar 1998) ist für *V. vulnificus* (pathogene Organismen) eine Null-Toleranz in verzehrfertigen Lebensmitteln festgelegt. Für toxinogene O1 oder non-O1 *V. cholerae* ist im Anhang 5 der FDA und EPA Guidance Levels (Stand Januar 1998) ebenfalls eine Null-Toleranz in verzehrfertigen Lebensmitteln festgelegt.

Angesichts des weltweiten Tourismus haben sich auch in Europa Verzehrsgewohnheiten verbreitet bei den Fisch, Muscheln und Fischereiprodukte halbgar oder roh genossen werden (STOLLE, 2002). Der Anteil an älteren und immungeschwächten und damit gefährdeten Menschen hat zugenommen. Bekannte Infektionen mit *Vibrio* sp. sind in Deutschland zwar rar, jedoch war in den letzten Jahren ein Anstieg vor allem in der Vorkommenshäufigkeit bei der Gruppe der „übrigen Formen“ der infektiösen Enteritiden, das heißt in der Gruppe, in der die Angabe über den Erreger fehlt, zu verzeichnen. Hinzu kommt die Dunkelziffer nicht gemeldeter oder nicht erkannter Infektionen.

Es erscheint also angezeigt, unter diesen Aspekten dem bisherigen Auftreten sporadischer Einzelfälle dieser Erregergruppe mehr Aufmerksamkeit zu schenken und mikrobiologische Grenzwerte zu beachten.

# ZUSAMMENFASSUNG

Ziel der Arbeit war es, zu untersuchen, inwieweit aus dem Handel stammende Krusten- und Schalentiere und Erzeugnisse daraus mit Vibrionen belastet sind und hierfür eine möglichst einfache und routinemäßig anwendbare Untersuchungsmethode zu entwickeln.

Im Zeitraum von Januar 2001 bis Mai 2002 wurden durch den Wirtschaftskontrolldienst im Regierungsbezirk Karlsruhe insgesamt 100 Proben Muscheln und Garnelen als rohe, erhitzte aber nicht verzehrfertige und als gegarte und verzehrfertige Ware aus dem Handel gezogen. Diese Proben wurden mittels eines Anreicherungs- und zwei Keimzählverfahren auf das Vorhandensein von *Vibrio* sp. untersucht. Das Anreicherungsverfahren wurde von dem im "Microorganisms in foods – microbiological specifications of food pathogens" des ICMSF vorgeschlagenen Anreicherungsverfahren abgeleitet. Zur Keimzahlbestimmung wurde die Direktplattierung auf TCBS-Agar mit dem Spatelverfahren durchgeführt und ein von der durch VENKATESWARAN et al. (1989) beschriebenen „*pad pre-enrichment technique*“ abgeleitetes Membranfiltrationsverfahren angewendet. Die modifizierten Methoden werden ausführlich dargestellt. Beim Nachweis von *V. parahaemolyticus* und *V. cholerae* wurde anschließend am Nationalen Referenzzentrum für Enteritiserreger in Hamburg auf das Vorhandensein von Pathogenitätsfaktoren untersucht.

Insgesamt konnten in 22 Prozent der untersuchten Proben Vibrionen nachgewiesen werden. Bei den rohen, frischen Muscheln war die Nachweisrate mit 50 Prozent am höchsten. Die Nachweisrate lag bei den rohen Garnelen mit 35 Prozent deutlich über der Nachweisrate in hitzebehandelten Garnelen mit 6,8 Prozent. Die meisten Nachweise gelangen mit dem Anreicherungsverfahren. Die Vorzüge je Methode werden hinsichtlich der positiven Befunde im Einzelnen dargestellt.

Eine Gesundheitsgefahr besteht vor allem dann, wenn es durch unsachgemäßen Umgang mit dieser Lebensmittelgruppe zu Keimvermehrungen kommt und keine

oder keine ausreichende Keimabtötung vor dem Verzehr stattfindet. Angesichts der geänderten Verzehrsgewohnheiten (Genuss roher und halbroher Fischereierzeugnisse) und dem gestiegenen Vorkommen der „übrigen Formen“ der infektiösen Enteritiden sollte dem bisherigen Auftreten sporadischer Einzelfälle dieser Erregergruppe mehr Aufmerksamkeit geschenkt werden.



# SUMMARY

## Detection and Differentiation of *Vibrio* sp. in Crustaceans, Molluscs, and Products thereof with Regard to Routine Diagnostic

The purpose of this study was to reveal the contamination rate by vibrios of commercially available crustaceans, and molluscs, and products thereof. Beside this, a simple quick routine method for the detection should be established.

Between January 2001 and May 2002 the administrative „Wirtschaftskontrolldienst“ sampled in the district of Karlsruhe 100 samples of shrimps and shells either raw or heat treated, but not ready to eat, besides this heated and ready to eat food samples. These samples were tested by means of one enrichment system and two bacterial counting methods for *Vibrio* sp. The enrichment system was modified from the enrichment system described by ICMSF in „Microorganisms in foods – microbiological specifications of food pathogens“. The modification is explained thoroughly. Strains of *V. parahaemolyticus* and *V. cholerae* were tested afterwards at the „Nationales Referenzzentrum für Enteritiserreger“ in Hamburg for the existence of pathogenic potential. A total of 22 percent of the samples were positive for *Vibrio*; raw shells have the highest contamination rate with 50 percent, raw shrimps (35 % positive) distinctly higher than boiled shrimps (6,8 % positive). Most of the positive results succeeded using the enrichment system. The advantages of the different investigation systems are explained in detail.

A potential health risk exist preferably, if improper handling of these seafood leads to an increase of the microbiological load and no or insufficient decontamination prior to eating was performed. Regarding new habits of consumption (raw sea products) and the increase of so called „other forms“ of infectious enteritis more attention should be paid to the sporadic occurrence of this microorganisms.



# ANHANG

## 19 UNTERSUCHUNGSMATERIAL FÜR DEN NACHWEIS VON *VIBRIO* SP.

### 19.1 Medien zur Anreicherung, Isolierung und Differenzierung von *Vibrio* sp.

#### 19.1.1 Nährmedien

##### Agar aus Alkalischem Peptonwasser

Zusammensetzung:

Pepton aus Fleisch	merck, 1.07224	5 g
Pepton aus Casein	merck, 1.07213	5 g
Hefeextrakt	merck, 1.03753	5 g
Natriumchlorid	merck, 1.06404	20 g
Agar-Agar	merck, 1.01614	9 g

Zubereitung:

1. Komponenten einwiegen
2. unter Erhitzen und Schütteln lösen in 1000 ml demin. Wasser
3. pH-Wert einstellen:  $8,5 \pm 0,2$  (bei 25°C)
4. autoklavieren: 15 min / 121 °C
5. in Petrischalen abfüllen
6. pH-Wert kontrollieren:  $8,5 \pm 0,2$  (bei 25°C)

### **Alkalisches Peptonwasser**

Zusammensetzung:

Pepton aus Fleisch	merck, 1.07224	1 g
Natriumchlorid	merck, 1.06404	20 g

Zubereitung:

1. 1 g Pepton aus Fleisch und
2. 20 g Natriumchlorid suspendieren in 1000 ml demin. Wasser
3. pH-Wert einstellen:  $8,5 \pm 0,2$  (bei  $25^{\circ}\text{C}$ )
4. abfüllen in 500 ml Erlenmeyerkolben zu je 250 ml
5. autoklavieren: 15 min /  $121^{\circ}\text{C}$
6. pH-Wert kontrollieren:  $8,5 \pm 0,2$  (bei  $25^{\circ}\text{C}$ )

### **Alkalisches Peptonwasser mit einem Zusatz von 1% Tween80**

Zusammensetzung:

Pepton aus Fleisch	merck, 1.07224	1 g
Natriumchlorid	merck, 1.06404	20 g
Tween80	merck, 8.22187	10 g

Zubereitung:

1. Komponenten einwiegen
2. in 1000 ml demin. Wasser suspendieren
3. pH-Wert einstellen:  $8,5 \pm 0,2$  (bei  $25^{\circ}\text{C}$ )
4. abfüllen in Röhrchen zu je 10 ml
5. autoklavieren: 15 min /  $121^{\circ}\text{C}$
6. pH-Wert kontrollieren:  $8,5 \pm 0,2$  (bei  $25^{\circ}\text{C}$ )

### **Glukose-Pepton-Bouillon**

Zusammensetzung:

DEV-Glukose-Pepton-Bouillon      merck, 1.10686      28 g

Zubereitung:

1. 28 g DEV-Glukose-Pepton-Bouillon suspendieren in 1000 ml demin. Wasser
2. jeweils ca. 4 ml in Reagenzgläser, die mit Durhamröhrchen (klein) beschickt sind, abfüllen
3. Reagenzgläser mit Metallkappen verschließen
4. autoklavieren: 20 min / 115°C
5. pH-Wert kontrollieren:  $7,2 \pm 0,2$  (bei 25°C)

### **Laktose-Pepton-Bouillon**

Zusammensetzung:

DEV-Lactose-Pepton-Bouillon      merck, 1.10690      35 g

Zubereitung:

1. 35 g DEV-Lactose-Pepton-Bouillon in 1000 ml demin. Wasser lösen
2. jeweils 4 ml in Reagenzgläser, die mit Durhamröhrchen (klein) beschickt sind, abfüllen
3. Röhrchen mit Metallkappen verschließen
4. autoklavieren: 20 min / 115°C
5. pH- Wert kontrollieren:  $7,2 \pm 0,2$  (bei 25°C)

### **Nährbouillon, $w_{\text{NaCl}} = 6,5 \%$**

Zusammensetzung :

Hirn-Herz-Glukose-Bouillon	oxid, CM 225	37 g
Natriumchlorid	merck, 1.06404	65 g

Zubereitung:

1. 37 g Hirn-Herz-Glukose-Bouillon und 65 g Natriumchlorid suspendieren in 1000 ml demin. Wasser
2. jeweils 4 ml in Reagenzröhrchen abfüllen
3. mit Metallkappen verschließen
4. autoklavieren: 15 min / 121°C
5. pH-Wert kontrollieren:  $7,4 \pm 0,2$  (bei 25°C)

### **Oxidation-Fermentation-Testnährboden nach HUGH und LEIFSON mit 1% Glukose**

Zusammensetzung:

OF-Testnährboden	merck, 1.10282	11 g
D(+)-Glukose	merck, 1.08342	10 g
Paraffin dickflüssig	merck, 1.07160	

Zubereitung:

1. 11 g OF-Testnährboden und
2. 10 g D(+)-Glukose
3. suspendieren in 1100 ml demin. Wasser
4. in Röhrchen ca. 5 cm hoch abfüllen
5. die Hälfte der Röhrchen 1 cm dick mit Paraffin überschichten
6. autoklavieren: 20 min / 115°C
7. pH-Wert kontrollieren:  $7,1 \pm 0,2$  (bei 25°C)

### **Plate Count-Agar (Caseinpepton-Glukose-Hefeextrakt-Agar)**

bezogen als fertig gegossene Platten

HEIPHA DIAGNOSTIKA, Artikel-Nummer 306e

Zusammensetzung:

Caseinpepton	5 g
Hefeextrakt	2,5 g
Glukose	1 g
Agar	12 g

pH 7,0 ± 0,2

### **Thiosulfat-Zitrat-Galle-Saccharose-Agar (TCBS)**

bezogen als fertig gegossene Platten

HEIPHA DIAGNOSTIKA, Artikel-Nummer 160e

Zusammensetzung:

Hefeextrakt	5 g
Fleischpepton	10 g
Natriumthiosulfat	10 g
Natriumcitrat	10 g
Rindergalle	8 g
Saccharose	20 g
Natriumchlorid	10 g
Eisen(II)-citrat	1 g
Bromthymolblau	40 mg
Thymolblau	40 mg
Agar	14 g

pH 8,6 ± 0,2

### **Voges-Proskauer-Medium**

Zusammensetzung:

Tryptone Peptone	difco, 0123-17-3	3,5 g
Glukose	merck, 1.08337	2,5 g
Potassium-Phosphate	sigma, P3786	2,5 g
Natriumchlorid	merck, 1.06404	8,5 g

Zubereitung:

1. Komponenten einwiegen
2. Unter Erhitzen und Schütteln in demin. Wasser auflösen
3. 5 ml Portionen in Reagenzgläser abfüllen
4. 15 min bei 121 °C autoklavieren
5. pH-Wert kontrollieren:  $7,0 \pm 0,2$  (bei 25°C)

### **Ammoniumcitrat-Agar (Simmons-Citrat-Agar)**

Zusammensetzung:

SIMMONS-Citrat-Agar	merck, 1.02501	22,5 g
---------------------	----------------	--------

Zubereitung

1. 22,5 g SIMMONS-Citrat-Agar in 1000 ml demin. Wasser lösen
2. jeweils 4 ml in Reagenzgläser abfüllen
3. Röhrrchen mit Metallkappen verschließen
4. autoklavieren: 15 min / 121°C
5. pH- Wert kontrollieren:  $6,6 \pm 0,2m$  (bei 25°C)
6. zum Erstarren des Nährbodens Röhrrchen schräg legen



## 19.1.2 Aufbewahrungsmedium

### Mikrobank / Cryobank

Mikrobank / Cryobank Kryoröhrchen

MAST DIAGNOSTICA

## 19.2 Testsysteme, Reagenzien und Chemikalien

### api 20 E

System zur biochemischen Identifizierung von Enterobakteriazeen und anderen nicht anspruchsvollen gramnegativen Stäbchen

BIOMÉRIEUX

### Serotypisierung

polyvalentes O1-Antiserum

BECTON DICKINSON

### Immersionsöl

518 C

ZEISS

### 0,9%ige NaCl-Lösung

Zusammensetzung:

Natriumchlorid

merck, 1.06404

9,0 g

Zubereitung:

9,0 g Natriumchlorid in demin. Wasser auflösen

pH-Wert einstellen:  $6,0 \pm 0,2$  (bei 25°C)

15 min bei 121 °C autoklavieren

pH-Wert kontrollieren:  $6,0 \pm 0,2$  (bei 25°C)

### **Gramfärbung**

Neissers Lösung 1b, Kristallviolettlösung für die Bakteriologie	MERCK, 1.09239
Lugols Lösung für die Mikroskopie Iod-Kaliumiodidlösung 1%	MERCK, 1.09261
Fuchsin Lösung für die Mikroskopie	FLUKA BIOCHEMIKA

### **Oxidasetest (Teststick)**

Oxidase-Teststäbchen, BR64A	OXOID
-----------------------------	-------

### **Vibriostatikum O/129**

2,4-Diamino-6,7-diisopropyl-pteridin-phosphat, erhältlich als O/129-Scheiben mit 10 µg und 150 µg beladen	OXOID
---	-------

### **Verdünnungslösung (0,85%ige Kochsalz-Pepton-Lösung)**

Zusammensetzung:

Natriumchlorid	merck, 1.06404	8,5 g
Pepton aus Casein	merck, 1.07213	1,0 g

Zubereitung:

1. 8,5 g NaCl und
2. 1,0 g Pepton suspendieren in 1000 ml demin. Wasser
3. in Rohrchen abfüllen (9 ml)
4. 15 min bei 121°C autoklavieren
5. pH-Wert kontrollieren  $7,0 \pm 0,2$  (bei 25°C)

## 19.3 Geräte und Hilfsmittel

### Waagen

Elektronische Präzisionswaage LA 5200 P-OCE	SARTORIUS
Elektronische Präzisionswaage BP 2100	SARTORIUS
Elektronische Präzisionswaage LA 2200S-OCE	SARTORIUS
Elektronische Präzisionswaage YDP03-OCE	SARTORIUS

### Verdünnungsautomat

Bioflow SynergA	KIESTRALAB AUTOMATION
-----------------	-----------------------

### Stomacher

Bagmixer 400 P	INTERSCIENCE
----------------	--------------

### Reagenzglasmixer

Vortex 7-2020	NEOLAB
---------------	--------

### Kühlschrank

FKS 5000	LIEBHERR
Aqualytic 200031	LIEBHERR

### Pipetten

Glaspipette 10ml/0,1ml/Ex+15s 20°C ± 0,05ml	FORTUNA
Demeterpipette 20°C	DINKELBERG

### **Pipettierhilfe**

macro

BRAND

### **Kühlbrutschränke**

KB 53

WTB BINDER

KB 115

WTB BINDER

KB 240

WTB BINDER

KB 720

WTB BINDER

### **Kartuschenbrenner**

Soudogaz X 2000 PZ

CAMPINGAZ

### **Stomacherbeutel mit Filtereinsatz**

Bagfilter

INTERSCIENCE

### **Mikroskop**

Standard 20

ZEISS

### **Objektträger**

gereinigt, Kanten geschnitten, beidseitiger Mattrand,  
ca. 76x26x1mm

MARIENFELD

feinbekantet, geputzt ~ 75x25mm

MARIENFELD

### **Impfösen**

ecoLab-Einmal-Impfösen Steril 10µl

NEOLAB

ecoLab-Einmal-Impfösen Steril 1µl

NEOLAB

**Färbebank**

Färbebank

FRITZ GÖSSNER

**Sicherheitswerkbank**

HS 12

KENDRO

**Autoklaven**

5075 ELV

TUTTNAUER CO LTD.

5075 EL

TUTTNAUER CO LTD.

**Sterilisator**

Sterilisator FED 240

WTB-BINDER

**Reagenzgläser**

Ø 16 mm / L 160 mm

MERCK / VWR

**Aufbewahrungsgefäße**

Erlenmeyerkolben 500 ml 25/500 ks

SIMAX KAVALIER

**Alufolie**

Alufolie Ø ca. 15 cm, Dicke 0,03 mm

NEOLAB

**Kryo-Aufbewahrungsboxen**

Kryo-Aufbewahrungsboxen

NEOLAB

### **Petrischalen**

92 x 16 mm mit Nocken No./Ref 82.1473

SARSTEDT

### **Handschuhe**

Einmal-Handschuhe Latexhandschuh puderfrei Gel-  
Beschichtung

JFM JOSEF F MÜLLER  
GMBH

### **Vakuumfiltrationsanlage mit Zubehör**

Edelstahlabsaugvorrichtung (6fach) mit 100 ml

SARTORIUS

Aufsätzen

Saugflasche, Duran, Erlenmeyerform, Olive/Tubus  
PP, 2000 ml

MERCK / VWR

Silikonstopfen mit Bohrung

MERCK / VWR

Glaskrümmen

MERCK / VWR

Woulff'sche Flasche 500 ml

MERCK / VWR

Verbindungsgummischläuche

MERCK / VWR

Membran-Vakuumpumpe

MERCK / VWR

### **Membranfilter**

Cellulosenitrat-Membranfilter, Porenweite 0,45µm,  
Durchmesser 50mm, steril, einzeln verpackt

SARTORIUS

### **Gefahrgutverpackung**

Bauartgeprüfte UN-Gefahrgutverpackung für infektiöse Substanzen der Klasse 6.2  
entsprechend Randnummer 2653 ADR (Europäisches Übereinkommen über die  
Beförderung gefährlicher Stoffe auf der Straße vom 27.04.2001)

**Kühlraum**

Kühlanlage R404A

DOSTER GMBH

**pH - Messgerät mit Tischdrucker**

pH-Meter 765

KNICK

Tischdrucker PS-180

GMF

**Wasserbad**

ETR 452825

DINKELBERG LABORTECHNIK

**Magnetrührer mit Heizplatte**

IKA-Combimag RCT

IKA-WERKE

IKA-Mag REO

IKA-WERKE

**Trockenschrank**

Trockenschrank

MEMMERT

**Dosierfix**

Dosierfix

WELATEC

**Abfüllautomat mit Druckeinrichtung**

Abfüllautomat MP 1000

NEW BRUNSWICK SCI.

Tintenstrahldrucker A 100 (für Petrischalen)

DOMINO AMJET GMBH





## 20 ÜBERSICHT ÜBER DIE GESAMTHEIT DER UNTERSUCHTEN PROBEN

Tabelle 10 Art und Herkunft der Proben und Ergebnisse der Untersuchungen

Probenummer	Spezies	Bezeichnung	Herkunft	Zubereitungsgrad	Aufbewahrung	Zusatzstoffe	Verarbeitungsgrad	Anreicherung	Spatelverfahren	Membranfiltrationsverfahren	Probleme bei Filtration
012000129	Garnelen	King Prawns	Indo-Pazifik	roh-blanchiert	tiefgefroren	E450	mit Schale	...	nn	nn	keine
012000919	Muscheln	Frische Seemuscheln Mytilus edulis	Niederlande	roh	gekühlt	ohne	lebend	...	nn	nn	keine
012001490	Garnelen	Grönländische Garnelen in Lake	Verarbeitung Dänemark	gegart verzehrsfertig	gekühlt	in Lake Benzoesäure Sorbinsäure	geschält	...	...	nn	keine
012001547	Muscheln	Föhler Muscheln Mytilus edulis	Niederlande	roh	gekühlt	ohne	lebend	...	...	nn	keine
012002978	Garnelen	Party Gambas	unbekannt, offene Ware	gegart verzehrsfertig	gekühlt	ohne	geschält	...	...	nn	keine
012003661	Garnelen	Riesengarnelen	unbekannt, Fertigpackung	gegart verzehrsfertig	tiefgefroren	ohne	geschält	nn	nn	nn	keine
012003963	Garnelen	Krabben-Salat Tiefseekrabben	Pazifik	gegart verzehrsfertig	gekühlt	Kaliumsorbat Natriumbenzoat	geschält	nn	nn	nn	keine
012003966	Garnelen	King Prawns Scampi in Knoblauchöl	Verarbeitung Deutschland	gegart verzehrsfertig	gekühlt	E202 E212	geschält	nn	nn	nn	keine
012004220	Garnelen	Tiefseeegarnelen getaut	unbekannt, offene Ware	gegart verzehrsfertig	tiefgefroren getaut	ohne	mit Schale	nn	nn	nn	keine
012004619	Garnelen	Eismeerkrabben	unbekannt, Fertigpackung	gegart verzehrsfertig	gekühlt	in Lake	geschält	nn	nn	nn	keine

Tabelle 10 (Fortsetzung)

## Art und Herkunft der Proben und Ergebnisse der Untersuchungen

Probe-nummer	Spezies	Bezeichnung	Herkunft	Zubereitungs-grad	Auf-bewahrung	Zusatzstoffe	Verarbeitungs-grad	Anreicherung	Spatel-verfahren	Membran-filtrations-verfahren	Probleme bei Filtration
012004829	Muscheln	Frische Muscheln Mytilus galloprovincialis	Italien	roh	gekühlt	ohne	lebend	V. alginolyticus	V. alginolyticus (<2,0E2)	V. alginolyticus (<2,0E2)	keine
012005020	Garnelen	Black Tiger Riesengarnelen	Indo-Pazifik Thailand	erhitzt (Hinweis)	tiefgefroren	ohne	mit Kopf und Schale	nn	nn	nn	keine
012005487	Garnelen	Tiefsee-Shrimps Crevettes	Indischer Ozean	gegart verzehrsfertig	tiefgefroren	ohne	geschält	nn	nn	nn	keine
012005488	Garnelen	Black Tiger Shrimps	Verarbeitung Frankreich	gegart verzehrsfertig	tiefgefroren	ohne	geschält	nn	nn	nn	keine
012005489	Garnelen	Shrimps-Ring Riesengarnelen	Indonesien	gegart verzehrsfertig	tiefgefroren	ohne	geschält	nn	nn	nn	keine
012006715	Garnelen	Tiefseeegarnelen getaut	unbekannt, offene Ware	gegart verzehrsfertig	tiefgefroren getaut	ohne	mit Kopf und Schale	nn	nn	nn	keine
012007084	Garnelen	Riesengarnelen Freshwater	Bangladesch	roh	tiefgefroren	ohne	mit Schale	nn	nn	nn	keine
012007085	Garnelen	Riesengarnelen Freshwater	Indischer Ozean, Südchinesische See	roh	tiefgefroren	ohne	mit Schale	nn	nn	nn	keine
012007086	Garnelen	King Prawns	Verarbeitung Frankreich	roh	tiefgefroren	ohne	geschält	nn	nn	nn	keine
012007444	Garnelen	Gambas Riesengarnelen	Bangladesch	roh	tiefgefroren	ohne	mit Kopf und Schale	nn	nn	nn	Filter verstopft bei Verd. 1
012007445	Garnelen	Gambas Riesengarnelen	Bangladesch	roh	tiefgefroren	ohne	mit Kopf und Schale	nn	V. mimicus (<2,0E2)	nn	keine
012007607	Garnelen	King Prawns Freshwater Süßwasser-Riesengarnelen	unbekannt, Fertigpackung	roh	tiefgefroren	ohne	mit Schale	nn	nn	nn	Filter verstopft bei Verd. 1

Tabelle 10 (Fortsetzung)

## Art und Herkunft der Proben und Ergebnisse der Untersuchungen

Probenummer	Spezies	Bezeichnung	Herkunft	Zubereitungsgrad	Aufbewahrung	Zusatzstoffe	Verarbeitungsgrad	Anreicherung	Spatelverfahren	Membranfiltrationsverfahren	Probleme bei Filtration
012007608	Garnelen	"Jamberoni"	unbekannt, offene Ware	roh	tiefgefroren getaut	ohne	mit Kopf und Schale	V. cholerae non O1	nn	nn	Filter verstopft bei Verd. 1
012007807	Garnelen	Gambas	unbekannt, offene Ware	gegart verzehrsfertig	tiefgefroren getaut	ohne	mit Schale	nn	nn	nn	Filter verstopft bei Verd. 1
012007973	Muscheln	Tapes semidecussatus "Vongole Veraci"	Italien	roh	gekühlt	ohne	lebend	nn	V. fluvialis (<2,0E2)	V. alginolyticus / fluvialis	keine
012008277	Garnelen	Krabben in Öl	unbekannt, offene Ware	gegart verzehrsfertig	gekühlt	in Öl	geschält	nn	nn	...	...
012009218	Garnelen	Tiefseegarnelen getaut	unbekannt, offene Ware	gegart verzehrsfertig	tiefgefroren getaut	ohne	mit Kopf und Schale	nn	nn	nn	keine
012009248	Garnelen	Garnelen Krevetten	Verarbeitung Frankreich	erhitzt (Hinweis)	tiefgefroren	E223	mit Kopf und Schale	nn	nn	nn	keine
012009305	Garnelen	Grönland-Garnelen Pandalus Boralis	Grönland	gegart verzehrsfertig	tiefgefroren	ohne	mit Kopf und Schale	V. alginolyticus	nn	nn	keine
012009523	Garnelen	Garnelen	unbekannt, offene Ware	gegart verzehrsfertig	tiefgefroren getaut	ohne	geschält	nn	nn	nn	keine
012009524	Muscheln	Seemuscheln Miesmuscheln	Irland	roh	tiefgefroren Fertiggericht	ohne	mit Schale	nn	nn	nn	keine
012009561	Garnelen	King Prawns Freshwater	unbekannt, offene Ware	gegart verzehrsfertig	tiefgefroren getaut	ohne	geschält	nn	nn	nn	keine
012009565	Muscheln	"Fasolari"	Italien	roh	gefroren	ohne	lebend	V. alginolyticus	V. alginolyticus (<2,0E2)	V. alginolyticus (<2,0E2)	keine
012009566	Muscheln	"Vongele Verage"	Italien	roh	gefroren	ohne	lebend	V. alginolyticus	V. alginolyticus (<2,0E3)	V. alginolyticus (<2,0E3)	keine
012009919	Garnelen	Riesengarnelen	Bangladesch	roh	tiefgefroren	ohne	mit Schale	V. cholerae non O1	nn	nn	keine

Tabelle 10 (Fortsetzung)

## Art und Herkunft der Proben und Ergebnisse der Untersuchungen

Probenummer	Spezies	Bezeichnung	Herkunft	Zubereitungsgrad	Aufbewahrung	Zusatzstoffe	Verarbeitungsgrad	Anreicherung	Spatelverfahren	Membranfiltrationsverfahren	Probleme bei Filtration
012009925	Garnelen	Riesengarnelen	Indo-Pazifik	roh-blanchiert	tiefgefroren	E450	mit Schale	nn	nn	nn	keine
012009945	Muscheln	Grüne Muscheln Perna canaliculus	Neuseeland	gegart verzehrsfertig	tiefgefroren	ohne	in Halbschale	nn	nn	nn	keine
012010961	Garnelen	Riesengarnelen	Verarbeitung Deutschland	gegart verzehrsfertig	gekühlt	Schutzgas, E210 E200 E330	geschält	nn	nn	nn	keine
012011404	Garnelen	Grönland- krabben in Lake	unbekannt, Fertigpackung	gegart verzehrsfertig	gekühlt	in Lake	geschält	nn	nn	nn	keine
012011405	Garnelen	Garnelen in Salzlake	unbekannt, offene Ware	gegart verzehrsfertig	gekühlt	in Lake	geschält	nn	nn	nn	keine
012011510	Garnelen	Tiefseegarnelen	unbekannt, offene Ware	gegart verzehrsfertig	tiefgefroren getaut	ohne	mit Kopf und Schale	nn	nn	nn	keine
012011513	Garnelen	Eismeergarnelen	unbekannt, offene Ware	gegart verzehrsfertig	gekühlt	ohne	mit Kopf und Schale	V. alginolyticus	nn	nn	keine
012011514	Garnelen	Crevetten	unbekannt, offene Ware	gegart verzehrsfertig	gekühlt	ohne	mit Kopf und Schale	nn	nn	nn	keine
012011909	Garnelen	Black Tiger Prawns Garnelenring	Thailand	gegart verzehrsfertig	tiefgefroren	E452	geschält	nn	nn	nn	keine
012011913	Garnelen	King Prawns	Südost-Asien	roh (erhitzt)	tiefgefroren	ohne	geschält	nn	nn	nn	keine
012012992	Garnelen	Party-Gambas	Südost-Asien	gegart verzehrsfertig	gekühlt	Schutzgas, E210 E200	geschält	nn	nn	nn	keine
012013183	Garnelen	Cocktailgarnelen	Bangladesch	gegart verzehrsfertig	tiefgefroren	ohne	mit Schale	V. alginolyticus	nn	nn	keine
012013287	Garnelen	Riesengarnelen Gambas	Indonesien	roh	tiefgefroren	ohne	mit Kopf und Schale	V. cholerae non O1	nn	nn	keine

Tabelle 10 (Fortsetzung)

## Art und Herkunft der Proben und Ergebnisse der Untersuchungen

Probenummer	Spezies	Bezeichnung	Herkunft	Zubereitungsgrad	Aufbewahrung	Zusatzstoffe	Verarbeitungsgrad	Anreicherung	Spatelverfahren	Membranfiltrationsverfahren	Probleme bei Filtration
012013290	Garnelen	Black Tiger Prawns Garnelenspieße	Thailand	roh	tiefgefroren	E452	geschält	nn	nn	nn	keine
012013291	Garnelen	Riesengarnelen KingPrawns	unbekannt, Fertigpackung	gegart verzehrfertig	tiefgefroren	ohne	geschält	nn	nn	nn	keine
012013837	Garnelen	Riesengarnelen	Indo-Pazifik	roh-blanchiert	tiefgefroren	E450	geschält	nn	nn	nn	keine
012013838	Garnelen	Riesengarnelen	unbekannt, Fertigpackung	gegart verzehrfertig	tiefgefroren	ohne	geschält	nn	nn	nn	keine
012013841	Garnelen	SCAMPI, Kaisergranat	Nordatlantik	roh	tiefgefroren	E223	mit Kopf und Schale	nn	nn	nn	keine
012013866	Garnelen	Riesengarnelen ScampiSpieß	Indonesien	roh	tiefgefroren	ohne	geschält	nn	nn	nn	Filter verstopft bei Verd. 1
012013867	Garnelen	Black Tiger Prawns Garnelenspieße	Thailand	roh	tiefgefroren	E452	geschält	nn	nn	nn	keine
012014844	Garnelen	Riesengarnelen	Indo-Pazifik	roh-blanchiert	tiefgefroren	E450	mit Schale	nn	nn	nn	keine
012014846	Garnelen	Riesengarnelen	Indo-Pazifik	roh-blanchiert	tiefgefroren	E450	mit Schale	nn	nn	nn	keine
012015475	Garnelen	Garnelen in Lake	unbekannt, offene Ware	gegart verzehrfertig	gekühlt	in Lake	geschält	nn	...	...	...
012015552	Muscheln	Miesmuscheln	Niederlande	roh	gekühlt	ohne	lebend	nn	nn	nn	keine
012015553	Muscheln	Tapes semidecussatus "Vongole Veraci"	Italien	roh	gekühlt	ohne	lebend	V. alginolyticus, V. vulnificus	V. alginolyticus (<2,0E2), V. vulnificus	V. alginolyticus, V. vulnificus	keine
012015566	Garnelen	Riesengarnelen Gambas Black Tiger	Indo-Pazifik Thailand	roh	tiefgefroren	ohne	mit Kopf und Schale	V. para- haemolyticus	V. para- haemolyticus (<2,0E2)	V. para- haemolyticus (<2,0E2)	keine
012015567	Garnelen	Gambas	unbekannt, offene Ware	roh-blanchiert	gekühlt	ohne	mit Kopf und Schale	nn	nn	nn	keine

Tabelle 10 (Fortsetzung)

## Art und Herkunft der Proben und Ergebnisse der Untersuchungen

Probe-nummer	Spezies	Bezeichnung	Herkunft	Zubereitungs-grad	Auf-bewahrung	Zusatzstoffe	Verarbeitungs-grad	Anreicherung	Spatel-verfahren	Membran-filtrations-verfahren	Probleme bei Filtration
012015591	Garnelen	Riesengarnelen	unbekannt, offene Ware	roh-blanchiert	tiefgefroren	ohne	mit Schale	nn	nn	nn	keine
012015592	Muscheln	Frische Miesmuscheln Mytilus edulis	Niederlande	roh	gekühlt	ohne	lebend	nn	V. hollisiae (<2,0E2)	V. anguillarum	keine
012015593	Muscheln	Frische Seemuscheln Mytilus edulis	unbekannt, Fertigpackung	roh	gekühlt	ohne	lebend	nn	nn	Vibrio sp. (<2,0E2)	keine
012015594	Garnelen	Riesengarnelen	unbekannt, offene Ware	roh	tiefgefroren getaut	ohne	mit Schale	nn	V. metschnikovii (<2,0E2)	nn	keine
012015794	Garnelen	Riesengarnelen	Indo-Pazifik	roh-blanchiert	tiefgefroren	E450	mit Schale	nn	nn	nn	keine
012017035	Garnelen	Riesengarnelen	Südost-Asien	roh	tiefgefroren	ohne	mit Schale	nn	nn	nn	keine
012017038	Muscheln	Miesmuscheln	Niederlande	roh	gekühlt	ohne	lebend	V. alginolyticus	...	...	...
012017274	Muscheln	Frische Seemuscheln	unbekannt, Fertigpackung	roh	gekühlt	ohne	lebend	nn	nn	nn	keine
012017275	Muscheln	Frische Miesmuscheln Mytilus edulis	Niederlande	roh	gekühlt	ohne	lebend	nn	nn	nn	keine
012017445	Garnelen	King Prawns	Südost-Asien	roh (erhitzt)	tiefgefroren	ohne	geschält	nn	nn	nn	keine
012017533	Muscheln	Miesmuscheln	unbekannt, offene Ware	roh	gekühlt	ohne	lebend	nn	nn	nn	Filter verstopft bei Verd. 1+2
012017534	Muscheln	Frische Seemuscheln Miesmuscheln	unbekannt, offene Ware	roh	gekühlt	ohne	lebend	nn	nn	nn	Filter verstopft bei Verd. 1+2
012017535	Garnelen	Grönland-garnelen	unbekannt, offene Ware	gegart verzehrsfertig	gekühlt	ohne	mit Kopf und Schale	nn	nn	nn	Filter verstopft bei Verd. 1
012017540	Garnelen	Black Tiger	unbekannt, Fertigpackung	roh	tiefgefroren	ohne	mit Kopf und Schale	nn	nn	nn	Filter verstopft bei Verd. 1

Tabelle 10 (Fortsetzung)

## Art und Herkunft der Proben und Ergebnisse der Untersuchungen

Probe-nummer	Spezies	Bezeichnung	Herkunft	Zubereitungs-grad	Auf-bewahrung	Zusatzstoffe	Verarbeitungs-grad	Anreicherung	Spatel-verfahren	Membran-filtrations-verfahren	Probleme bei Filtration
012017773	Garnelen	King Prawns	Süd-Pazifik	roh (erhitzt)	tiefgefroren	ohne	geschält	nn	nn	nn	keine
012017899	Muscheln	Föhler Muscheln (Mytilus edulis)	Niederlande	roh	gekühlt	ohne	lebend	nn	nn	...	...
012018857	Garnelen	Black Tiger	Verarbeitung Deutschland	gegart verzehrsfertig	gekühlt	ohne	geschält	nn	nn	nn	keine
012018859	Muscheln	Föhler Muscheln (Miesmuscheln)	Nordsee	roh	gekühlt	ohne	lebend	V. alginolyticus	nn	...	...
012019479	Muscheln	Frische Seemuscheln Mytilus edulis	Dänemark	roh	gekühlt	ohne	lebend	nn	V. anguillarum (<2,0E2)	nn	Filter verstopft bei Verd. 1
012019768	Garnelen	Cocktail Garnelen	unbekannt, offene Ware	gegart verzehrsfertig	tiefgefroren getaut	ohne	geschält	nn	nn	...	...
012019770	Garnelen	Black Tiger	unbekannt, offene Ware	gegart verzehrsfertig	tiefgefroren getaut	ohne	geschält	nn	nn	...	...
012019806	Garnelen	Riesengarnelen	Indischer Ozean/Südchinesische See	roh-blanchiert	tiefgefroren	ohne	mit Schale	nn	nn	nn	keine
022000357	Garnelen	Cocktail Garnelen getaut	unbekannt, offene Ware	gegart verzehrsfertig	tiefgefroren getaut	ohne	mit Schale	nn	nn	...	...
022000844	Garnelen	Riesengarnelen Black Tiger Prawns	Thailand	roh	tiefgefroren	ohne	mit Kopf und Schale	V. alginolyticus	V. alginolyticus (<2,0E2)	V. alginolyticus (<2,0E3)	Filter verstopft bei Verd. 1
022001238	Garnelen	Riesengarnelen Cocktailgarnelen Freshwater	Bangladesch	gegart verzehrsfertig	tiefgefroren	ohne	mit Schale	nn	nn	...	...
022001239	Muscheln	Frische Miesmuscheln Mytilus edulis	Niederlande	roh	gekühlt	ohne	lebend	nn	nn	...	...

Tabelle 10 (Fortsetzung)

## Art und Herkunft der Proben und Ergebnisse der Untersuchungen

Probe-nummer	Spezies	Bezeichnung	Herkunft	Zubereitungs-grad	Auf-bewahrung	Zusatzstoffe	Verarbeitungs-grad	Anreicherung	Spatel-verfahren	Membran-filtrations-verfahren	Probleme bei Filtration
022001536	Garnelen	Crevettes Rose	auf See gefangen	gegart verzehrsfertig	tiefgefroren	ohne	mit Schale	nn	nn	nn	keine
022001913	Garnelen	Cocktailgarnelen	Thailand	gegart verzehrsfertig	tiefgefroren getaut	ohne	mit Schale	V. metschnikovii	nn	nn	keine
022003657	Garnelen	Westpazifik Shrimps	Thailand	gegart verzehrsfertig	tiefgefroren	ohne	geschält	nn	nn	nn	keine
022004067	Garnelen	Grönland-Krabben	Atlantik	gegart verzehrsfertig	gekühlt	in Lake	geschält	nn	nn	...	...
022005380	Garnelen	Party-Riesengarnelen-Ring King Prawns	Indo-Pazifik	gegart verzehrsfertig	tiefgefroren	E450 E220	mit Schale	nn	nn	nn	keine
022005799	Garnelen	Crevettes rose Penaeus duorarum	Afrika, Verarbeitung Frankreich	erhitzt (Hinweis)	tiefgefroren	E223 E330	mit Kopf und Schale	nn	nn	nn	keine
022006224	Garnelen	Grönland Krabben Pandalus boealis	Nordost-atlantik	gegart verzehrsfertig	tiefgefroren	ohne	mit Schale	nn	nn	nn	keine
022007302	Garnelen	Gambas Riesengarnelen	Thailand	roh	tiefgefroren	E220 E452	mit Kopf und Schale	V. para-haemolyticus, Vibrio sp.	V. para-haemolyticus (<2,0E2)	V. para-haemolyticus (<2,0E3), Vibrio sp.	Filter verstopft bei Verd. 1
022007307	Garnelen	Garnelen Penaeus spp.	Indischer Ozean	gegart verzehrsfertig	tiefgefroren	ohne	geschält	nn	nn	nn	keine
022007314	Garnelen	Skagarak Garnelen Pandalus borealis	unbekannt, Fertigpackung	gegart verzehrsfertig	gekühlt	in Lake	geschält	nn	nn	nn	keine



**Tabelle 10 (Fortsetzung)**

**Art und Herkunft der Proben und Ergebnisse der Untersuchungen**

Probenummer	Spezies	Bezeichnung	Herkunft	Zubereitungsgrad	Aufbewahrung	Zusatzstoffe	Verarbeitungsgrad	Anreicherung	Spatelverfahren	Membranfiltrationsverfahren	Probleme bei Filtration
022008943	Garnelen	Riesengarnelen KingPrawns	unbekannt, Fertigpackung	gegart verzehrfsfertig	tiefgefroren	ohne	mit Schale	nn	nn	nn	keine
022009202	Garnelen	Garnelen	Argentinien	roh	gekühlt	ohne	mit Kopf und Schale	nn	nn	nn	Filter verstopft bei Verd. 1

... Untersuchung wurde nicht durchgeführt  
 nn nicht nachweisbar  
 (<2,0E2) unter  $2,0 \times 10^2$  KbE/g  
 erhitzt (Hinweis) Proben waren einem Erhitzungsverfahren unterzogen worden und mit dem Hinweis „Nur in durchgegartem Zustand verzehren!“ oder „wie ein frisches Produkt verwenden“ versehen  
 roh (erhitzt) Proben waren einem Erhitzungsverfahren unterzogen worden und als „roh“ bezeichnet worden  
 Verd. 1 Verdünnungsstufe 1



# FARBTAFELN

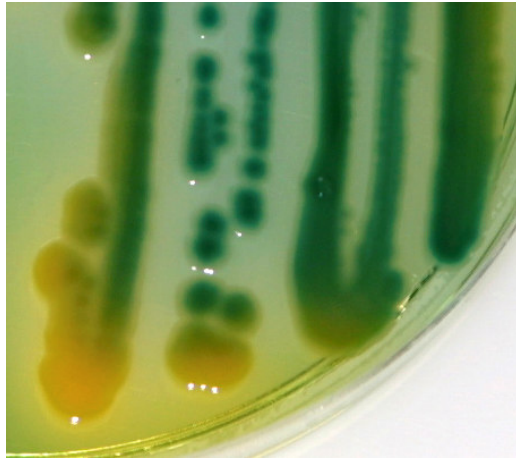
Farbtafel 1 Frische Muscheln, „Vongole veraci“



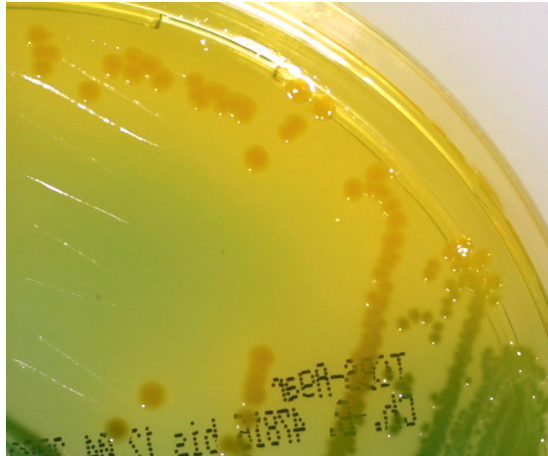
Farbtafel 2 Garnelen, roh-blanchiert



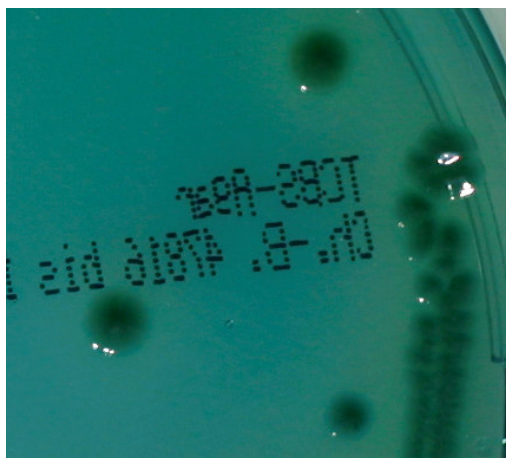
**Farbtafel 3** *Vibrio alginolyticus* auf TCBS-Agar



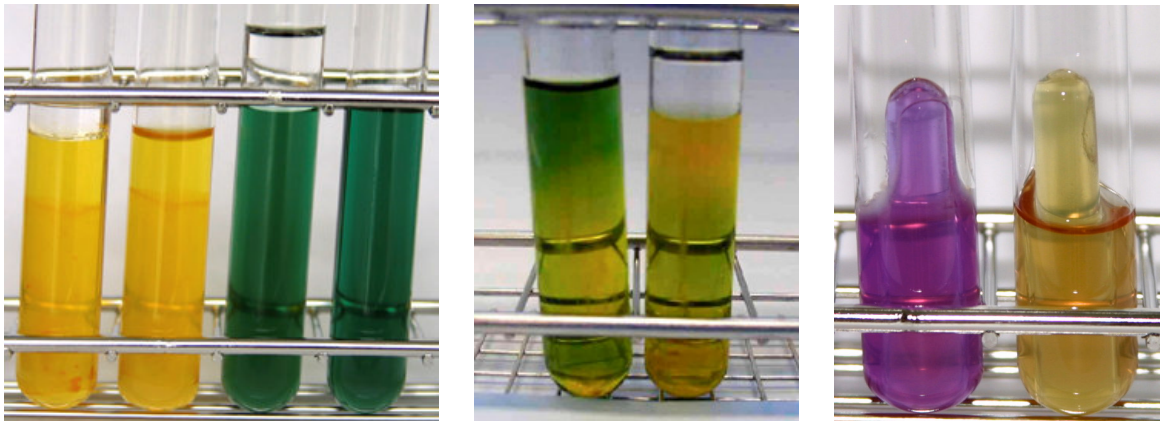
**Farbtafel 4** *Vibrio cholerae* non O1 auf TCBS-Agar



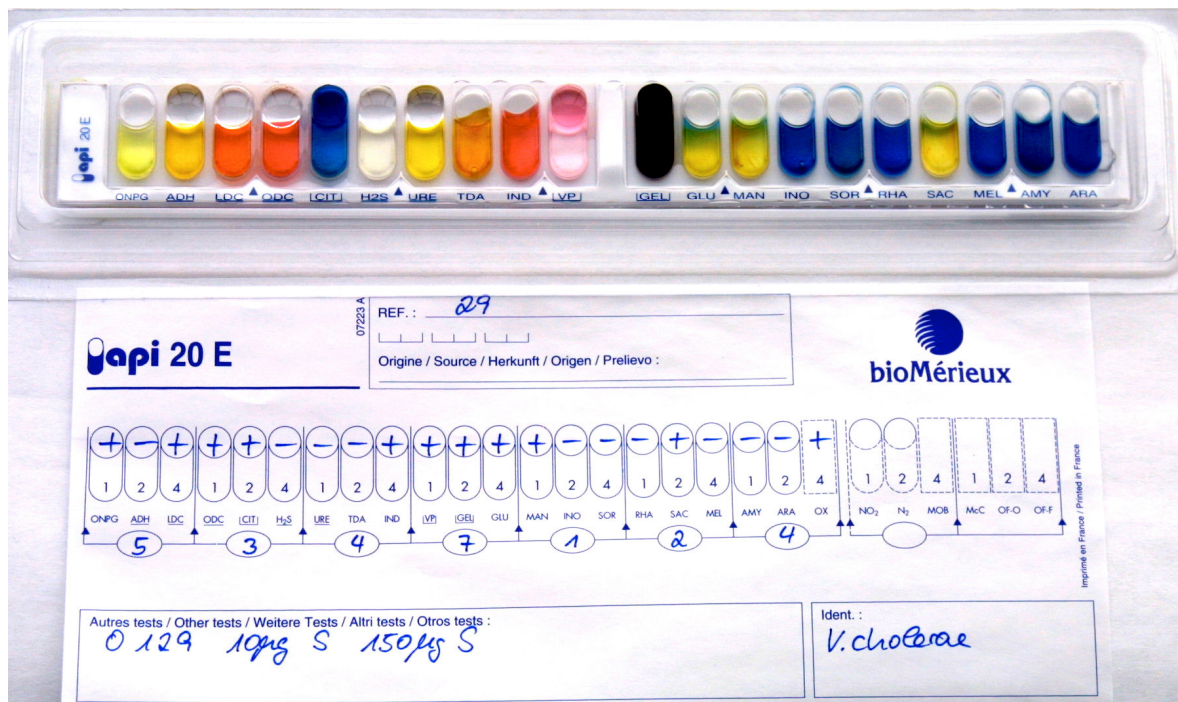
**Farbtafel 5** *Vibrio parahaemolyticus* auf TCBS-Agar



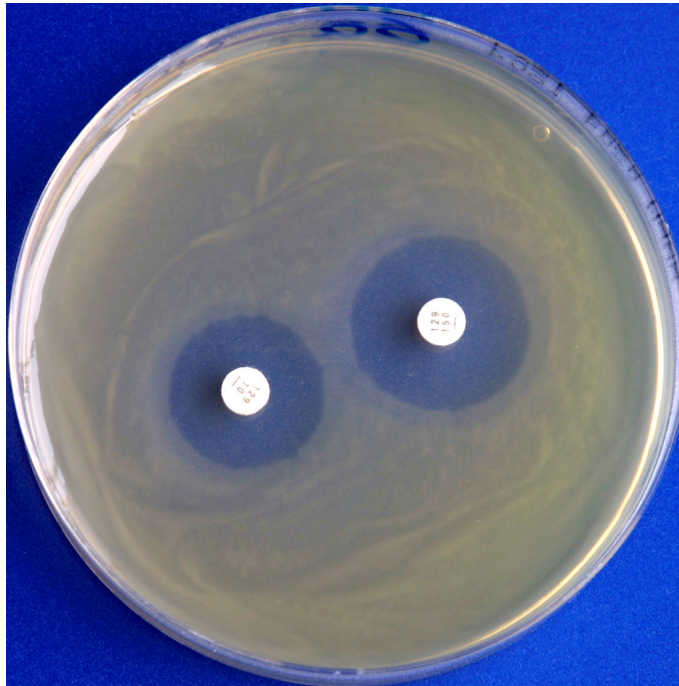
**Farbtafel 6** Glukoseabbau, von links nach rechts: OF-Testnährboden beimpft mit *Vibrio cholerae* non O1, unbeimpft (Negativkontrolle) und *Vibrio parahaemolyticus* und Glukose-Pepton-Bouillon mit Durhamröhrchen unbeimpft (Negativkontrolle) und beimpft mit *Vibrio* sp.



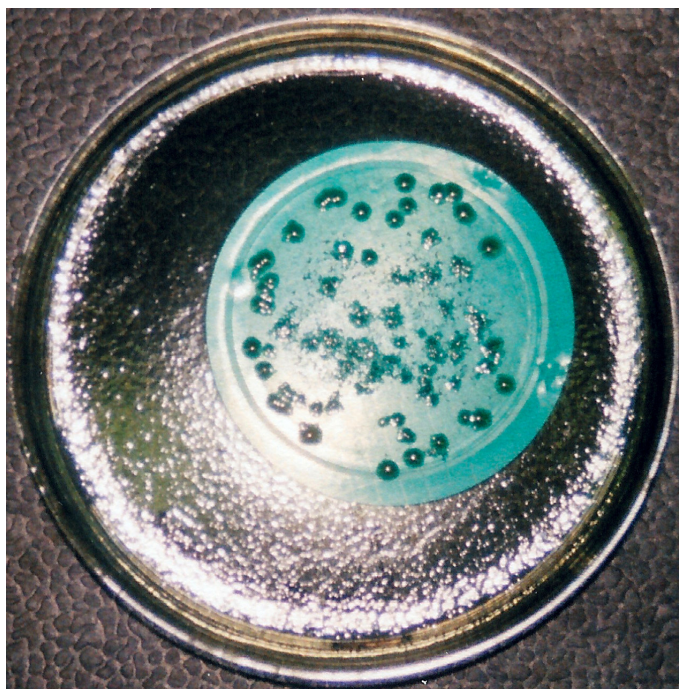
**Farbtafel 7** api 20 E-System beimpft mit *Vibrio cholerae* non O1 nach Zugabe der Reagenzien



**Farbtafel 8** O/129-Test mit *Vibrio fluvialis*



**Farbtafel 9** Koloniewachstum auf Membranfilter, gestört durch Reste von Probenmaterial



# LITERATURVERZEICHNIS

AMMON, A., SCHMIDT, K., BRÄUNING, J. (2000)

*Lebensmittelinfektionen in Deutschland*

Bundesgesundheitsblatt 43:751-757

ANDERSON, I. (1993)

*The Veterinary Approach to Marine Prawns.*

In: Aquaculture for veterinarians: fish husbandary and medicine/edited by Lydia Brown, Pergamon Press, S 271-296

ARNOLD, T. (2001)

*Toxicity, Shellfish*

eMedicine Journal 2 (9) (Internetveröffentlichung)

BARBIERI, E., FALZANO, L. (1999)

*Occurrence, Diversity, and Pathogenicity of Halophilic Vibrio sp. and Non-O1 Vibrio cholerae from Estuarine Waters along the Italian Coast*

Appl Environ Microbiol 65(6): 2748-2753

BAUMANN, P. et al. (1984)

*Family II. Vibrionaceae.*

In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol.1., Williams & Wilkins, S 516ff

BAUMGART, J. (1998)

*II.5.6 Membranfiltration.*

In: Mikrobiologische Untersuchung von Lebensmitteln, Behr's...Verlag, II.5, S 12-14

BAUMGART, J. (1998)

*III.3.1.6 Vibrionen. In: Mikrobiologische Untersuchung von Lebensmitteln*

Behr's...Verlag, III.3, S 34

BLISS, D. (1990)

*Recognition*

In: Shrimps, lobsters and crabs, Columbia University Press Morningside Edition,  
S 1-25

BRANSON, E. (1993)

*Basic Anatomy and Physiology.*

In: Aquaculture for veterinarians: fish husbandary and medicine/edited by Lydia  
Brown, Pergamon Press, S 27-30

DANIELS, N.A., SHAFAYE, A. (2000)

*A Review of Pathogenic Vibrio Infections for Clinicians*

Infect Med 17 (19): 665-685

DAVIS, B.R., FANNING, G.R., MADDEN, J.M., STEIGERWALD, A.G., BRADFORD,  
H.B. Jr., SMITH, H.L. Jr., BRENNER, D.J. (1981)

*Characterization of biochemically atypical Vibrio cholerae strains and designation of  
a new pathogenic species, Vibrio mimicus.*

J. Clin. Microbiol. 14:631-639

DESMARCHELIER, P.M. (1999)

*Vibrio, Introduction, including Vibrio vulnificus and Vibrio parahaemolyticus.*

In: Encyclopaedia of Food Microbiology Vol.3., Academic Press, S 2237-2241

EIGENER, W. (1978)

*Molluska-Weichtiere.*

In: Das Große Lexikon der Tiere, Georg Westermann, Braunschweig

ELISA, L. et. al. (2001)

*Vibrio cholerae, V. parahaemolyticus, V. vulnificus, and Other Vibrio sp.*

In: Bacteriological Analytical Manual Online, U.S. Food & Drug Administration,  
Center for Food Safety & Applied Nutrition (Internetveröffentlichung)

ENTIS, P. (1999)

*Hydrophobic Grid Membrane Filter Techniques (HGMF).*

In: Encyclopaedia of Food Microbiology Vol.3., Academic Press, S 1076-1082



ENTIS, P., BOLESZCZUK (1983)

*Overnight Enumeration of Vibrio parahaemolyticus in Seafood by Hydrophobic Grid Membrane Filtration*

J Food Protection 46(9): 783-786

FARMER III, J.J., HICKMAN-BRENNER, F.W., KELLY M.T. (1985)

*Vibrio.*

In: Manual of Clinical Microbiology Fourth Edition, American Society for Microbiology, Washington DC

FARUQUE, ALBERT, MEKALANOS (1998)

*Epidemiology, Genetics, and Ecology of Toxigenic Vibrio cholerae*

Microbiology and Molecular Biology Reviews 62(4): 1301-1314

FEHLHABER, K., JANETSCHKE, P. (1992)

*Fische, Krebstiere und Muscheln.*

In: Veterinärmedizinische Lebensmittelhygiene, Gustav Fischer Verlag, S 449-512

HICKMAN, F.W., FARMER III, J.J., HOLLIS, D.G., FANNING, G.R., STEIGERWALD, A.G., WEAVER, R.E., BRENNER, D.J. (1982)

*Identification of Vibrio hollisae sp. Nov. from patients with diarrhea.*

J. Clin. Microbiol. 15:395-401

HOI HO, M.D. (2001)

*Vibrio Infections*

eMedicine Journal 2 (7) (Internetveröffentlichung)

KARUNASAGAR, I. et al. (1986)

*Evaluation of Methods for Enumeration of Vibrio parahaemolyticus from Seafood*

Applied and Environmental Microbiology 52(3): 583-585

KINNE, O. (1983)

*Diseases of Mollusca: Bivalvia*

In: Diseases of Marine Animals Vol.2, Biologische Anstalt Helgoland, S 489-503

KINNE, O. (1990)

*Diseases of Crustacea*

In: Diseases of Marine Animals Vol.3, Biologische Anstalt Helgoland, S 296-326

KLEER, J., BARTHOLOMÄ, A., LEVETZOW, R., REICHE, T., SINELL, H.J.,  
TEUFEL, P. (2001)

*Bakterielle Lebensmittel-Infektionen und –Intoxikationen in Einrichtungen zur  
Gemeinschaftsverpflegung 1985 bis 2000*

Archiv für Lebensmittelhygiene 52(4/5):76-79, ISSN 0003-925X

KRAUSE, W., WINDRATH, H. (1919)

*Über eine durch einen Vibrio veranlaßte Seuche der Sonnenvögel (Leiothrix luteus L,  
chinesische Nachtigall).*

Berl Tierärztl Wschr (35): 468-469

LE VAY, L., EGAN, B. (1999)

*Shellfish (Molluscs and Crustacea).*

In: Encyclopaedia of Food Microbiology Vol.3, Academic Press, S 1993-2008

LEE, J.V., SHREAD, P., FURNISS, A.L., Bryant, T.N. (1981)

*Taxonomie and description of Vibrio fluvialis sp. nov. (synonym group F vibrios,  
group EF6).*

J. Appl. Bacteriol. 50:73-94

LERCHE, HEMMERT-HALSWICK, GOERTTLER (1942)

*Krustentiere.* In: Lehrbuch der tierärztlichen Lebensmitteüberwachung

Verlag M.&H. Schaper, Hannover; S 689-699

LERCHE, HEMMERT-HALSWICK, GOERTTLER (1942)

*Weichtiere, Mollusken.* In: Lehrbuch der tierärztlichen Lebensmitteüberwachung

Verlag M.&H. Schaper, Hannover; S 700-708

MC CARTER, L. (1999)

*The multiple Identities of Vibrio parahaemolyticus*

J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 1 (1): 51-57

MORRIS, J.G. Jr. (1993)

*Vibrio cholerae.*

In: Encyclopaedia of Food Science, Food Technology and Nutrition Vol.7., Academic Press, S 4763-4766

MORRIS, J.G. Jr. (1999)

*Vibrions on the half-shell*

OXOID Culture 20 (103): 5-8

MORRIS, J.G., MILLER, H.G., WILSON, R., TACKET, C.O., HOLLIS, D.G.,

HICKMAN, F.W., WEAVER, R.E, BLAKE, P.A. (1982)

*Illnes caused by Vibrio damsela and Vibrio hollisae.*

Lancet i:1294-1297

MUIR, J., ROBERTS, R. (1982a)

*Fisheries and Aquaculture Significance of Mangrove Swamps*

In: Recent Advantages in Aquaculture, Westview Press, S 51-61

MUIR, J., ROBERTS, R. (1982b)

*Farming Crustaceans in Western Temperate Regions*

In: Recent Advantages in Aquaculture, Westview Press, S 89-138

N.N. (1994)

*Meeresfrüchte*

FischMagazin 08/1994: 68-77

N.N. (2000a)

*Arzneimittel*

EU.L.E.n-Spiegel 6. Jahrgang, Nr. 2: 3-5

N.N. (2001)

*Die Deutschen essen mehr Fisch*

FischMagazin 11/2001: 14-15

OLIVER, J.D., HITE, F., MCDUGALD, D., ANDON, N.L., SIMPSON, L.M. (1995)  
*Entry into, and Resuscitation from, the Viable but Nonculturable State Vibrio vulnificus in an Estuarine Environment*  
Appl Environ Microbiol 61(7): 2624-2630

PICHHARDT, K. (1998)  
*2.8 Membranfiltrierverfahren.*  
In: Lebensmittelmikrobiologie Grundlagen für die Praxis, Springer, S 58-63

POWELL, J.L. (1999)  
*Vibrio Species.*  
In: Clinics in Laboratory Medicine Vol. 19 (3), Philadelphia Pa., S 537-552

PROVENZANO, A.J. Jr. (1993)  
*Shellfish.*  
In: Encyclopaedia of Food Science, Food Technology and Nutrition Vol.6, Academic Press, S 4084-4118

ROLLE, M., MAYR, A. (1993)  
*1.4.8 Vibrio.*  
In: Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre für Tierärzte, Biologen, Agrarwissenschaftler und Interessierte aus benachbarten Fachgebieten 6. Auflage, Ferdinand Enke Verlag Stuttgart, S631-633

SAKAZAKI, R. et al. (1986)  
*ICMSF Methods Studies. XVI. Comparison of Salt Polymyxin Broth with Glucose Salt Teepol Broth for Enumerating Vibrio parahaemolyticus in Naturally Contaminated Samples*  
J Food Protection 49(10): 773-780

SHARPE, A., PETERKIN, P.I. (1987)  
*The Membrane Filter in Food Microbiology.*  
In: Membrane Filter Food Microbiology, Research Studies Press LTD., S 1-22

STENGEL (1997)

*Vorkommen von V. vulnificus in Muscheln*

50. Arbeitstagung des Arbeitskreises Lebensmittelhygienischer Tierärztlicher Sachverständiger (ALTS), Berlin

STEPHAN, R. et al. (2002)

*Zum Vorkommen von halophilen und humanpathogenen Vibrionen in deutschen Nutztierbeständen*

Tierärztl Prax (30): 69-74

STEPHAN, R., KNABNER, D. (1996)

*Vibrio vulnificus – Erste Nachweise in Deutschland.*

Bundesgesundheitsblatt 6:209-211

STEPHAN, R., LINDENA, U. (1998)

*Nachweis von Vibrionen in importierten und heimischen Fischereierzeugnissen*

51. Arbeitstagung des Arbeitskreises Lebensmittelhygienischer Tierärztlicher Sachverständiger (ALTS), Berlin

TEUFEL (1998)

*Bewertung des Vorkommens von Vibrionen und Salmonellen in bestimmten*

*Fischereierzeugnissen bei der Einfuhr dieser Erzeugnisse aus Drittländern, für die EU-Schutzklauselentscheidungen getroffen wurden*

51. Arbeitstagung des Arbeitskreises Lebensmittelhygienischer Tierärztlicher Sachverständiger (ALTS), Berlin

TÜLSNER, M. (1994)

*Risiken des Fischverzehrs.*

In: Fischverarbeitung Band 1 Rohstoffeigenschaften und Grundlagen der Verarbeitungsprozesse, Behr's Verlag, S 89-97

UTHOFF, D. (1999)

*Seefischerei und marine Aquakultur – Wandel und Trends in der Nutzung des Nahrungspotentials der Meere*

Petermanns Geographische Mitteilungen, 143/Pilotheft 2000, Justus Perthes Verlag  
Gotha GmbH

VARNAM, A.H., EVANS, M.G. (1991)

*Vibrio.*

In: Foodborne Pathogens: An Illustrated Text, Wolfe Publishing Ltd, S 157-183

VENKATESWARAN, K. (1999)

*Vibrio, Standard Cultural Methods and Molecular Detection Techniques in Foods.*

In: Encyclopaedia of Food Microbiology Vol.3., Academic Press, S 2248-2257

VENKATESWARAN, K., NAKANO, H., HASHIMOTO, H. (1989)

*A pad pre-enrichment technique for the isolation of members of the Vibrionaceae*

Microbios Letters 42: 7-12

WECHSLER, E. (1999)

*Outbreak of Vibrio parahaemolyticus Infection Associated with Eating Raw Oysters and Clams Harvested from Long Island Sound—Conneticut, New Jersey, and New York, 1998*

MMWR Weekly 48 (03): 48-51 (Internetveröffentlichung)

WONG, F.Y.K., DESMARCHELIER, P.M. (1999)

*Vibrio, Vibrio cholerae.*

In: Encyclopaedia of Food Microbiology Vol.3., Academic Press, S 2242-2248

# SONSTIGE LITERATURQUELLEN

BUNDESANSTALT FÜR LANDWIRTSCHAFT UND ERNÄHRUNG, REFERAT 521-  
FISCHWIRTSCHAFT, HAMBURG (2000)

Der Markt für Fischereierzeugnisse in der Bundesrepublik Deutschland im Jahre  
2000

[www.ble.de/fisch/fiwirt\\_f.htm](http://www.ble.de/fisch/fiwirt_f.htm) (Internetveröffentlichung)

ICMSF (1996)

*Microorganisms in foods – microbiological specifications of food pathogens.*

Chapman and Hall, London, S 414-439

JOHNSON, J. (2002)

*Tetrodotoxin*

In: <http://www.chm.bris.ac.uk/motm/ttx.htm> (Internetveröffentlichung)

KLEIN, H., ARNOLD, D. (1997)

*Warencode für die amtliche Lebensmittelüberwachung, Verzehrserhebungen und  
Fremdstoffberechnungen*

*Katalog für Lebensmittel, ausgenommen Wein, Erzeugnisse aus Wein, weinähnliche  
Getränke, Erzeugnisse aus weinähnlichen Getränken*

BgVV-Hefte 02/1997

NORDSIECK, R. (2002)

*Die lebende Welt der Weichtiere*

In: <http://weichtiere.at/index.html> (Internetveröffentlichung)

N.N. (1998)

*57. Jahresversammlung der Schweizerischen Gesellschaft für Mikrobiologie*

Pressemeldung, Bundesamt für Veterinärwesen Schweiz (Internetveröffentlichung)

N.N. (2000b)

*Fischhygiene-Verordnung - FischHV*

Verordnung über die hygienischen Anforderungen an Fischereierzeugnisse und lebende Muscheln in der Bekanntmachung der Neufassung von 8.Juni 2000 (BGBl. I S.819)

N.N. (2002a)

*Miesmuschelkulturen in Europa*

In: <http://www.kbs-koeln.de/hauptschule-borsigstrasse/herkunftsland.htm>

(Internetveröffentlichung)

N.N. (2002b)

*Erweiterte Risikoabschätzung zu Rückständen von Chloramphenicol in Lebensmitteln*

Stellungnahme des Bundesinstituts für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin vom 25.März 2002 (Internetveröffentlichung)

N.N. (2002c)

*Chloramphenicol in Shrimps*

Jahresbericht 2001 Lebensmittelüberwachung BW, Ministerium für Ernährung und Ländlichen Raum Baden-Württemberg, Stuttgart, S 114

ROBERT KOCH INSTITUT (1997)

*Vorkommen von *Vibrio vulnificus* an der deutschen Ostseeküste.*

Epidemiologisches Bulletin 33/97: 227-228

ROBERT KOCH INSTITUT (1998)

*Choleraimporte nach Deutschland.*

Epidemiologisches Bulletin 3/98: 13-14

ROBERT KOCH INSTITUT (1999a)

*Kurzbericht zu einer importierten Cholera-Erkrankung.*

Epidemiologisches Bulletin 30/99: 223



ROBERT KOCH INSTITUT (1999b)

*Bericht über eine eingeschleppte Cholera-Erkrankung.*

Epidemiologisches Bulletin 44/99: 329

ROBERT KOCH INSTITUT (2000a)

*11. Folge: Erkrankungen durch Norwalk-like-Viren.*

In: Ratgeber Infektionskrankheiten

[www.rki.de](http://www.rki.de) (Internetveröffentlichung)

ROBERT KOCH INSTITUT (2000b)

*Fallberichte: Aus Indienimportierte Cholera-Erkrankungen.*

Epidemiologisches Bulletin 31/2000: 250-251

ROBERT KOCH INSTITUT (2001a)

*5. Folge: Erkrankungen an Hepatitis A.*

In: Ratgeber Infektionskrankheiten

[www.rki.de](http://www.rki.de) (Internetveröffentlichung)

ROBERT KOCH INSTITUT (2001b)

*Fallbericht: Cholera nach Rückkehr aus Pakistan.*

Epidemiologisches Bulletin 20/2001: 138

ROBERT KOCH INSTITUT (2001c)

*Sporadische Cholera-Erkrankung nach Verzehr eines aus Nigeria importierten Fisches.*

Epidemiologisches Bulletin 34/2001: 261

STOLLE, A. (2002)

*Zur Risikobewertung von Lebensmitteln*

Vortrag, Pro Animalis Tagung, 7. – 9.Nov.2002, Wroclaw, Polen

TODAR K (2000)

*Cholera (Vibrio Cholerae).*

In: <http://www.bact.wisc.edu/MicrotextBook/disease/cholera.html>

(Internetveröffentlichung)

U.S. FOOD & DRUG ADMINISTRATION, CENTER FOR FOOD SAFETY &  
APPLIED NUTRITION (1992)

Various Shellfish-Associated Toxins. In: Bad Bug Book Chap37  
(Internetveröffentlichung)

U.S. FOOD & DRUG ADMINISTRATION, CENTER FOR FOOD SAFETY &  
APPLIED NUTRITION (1998)

Appendix 5, FDA and EPA Guidance Levels. In: Fish and Fishery Products Hazards  
and Controls Guide (Internetveröffentlichung)

# TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1:	Einteilung der für die menschliche Ernährung wichtigen Krustentiere (modifiziert nach N.N., 1994)	10
Tabelle 2:	Verschiedene Eigenschaften von Spezies und Biovaren des Genus <i>Vibrio</i> (nach BAUMANN et al., 1984)	31
Tabelle 3:	Verschiedene Eigenschaften von <i>Vibrio</i> sp. und verwandten Genera (nach BAUMANN et al., 1984)	32
Tabelle 4:	Eigenschaften pathogener Vibrionen nach Oliver und Kaper (1997) (VENKATESWARAN, 1999)	33
Tabelle 5:	Noncholera Vibrionen und durch ihre Toxine hervorgerufene Erkrankungen (HOI HO, 2001)	35
Tabelle 6:	Vibrionen und durch sie hervorgerufene Erkrankungen des Menschen (ELISA et. al., 2001)	36
Tabelle 7:	Differenzierung zwischen den Biovaren <i>V. cholerae</i> classical und <i>V. cholerae</i> eltor (VARNAM und EVANS, 1991)	42
Tabelle 8:	Serotypisierung von <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	48
Tabelle 9:	Ablesetabelle des api 20 E-Systems	73
Tabelle 10	Art und Herkunft der Proben und Ergebnisse der Untersuchungen	119



# ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1 Anstieg der „übrigen Formen“ der infektiösen Enteritiden (erstellt nach den Daten aus KLEER et al., 2001)	4
Abbildung 2 Aufbau einer Garnele (LE VAY und EGAN, 1999)	11
Abbildung 3 Unterscheidung zwischen <i>Penaeidea</i> und <i>Caridea</i> (modifiziert nach BLISS, 1982)	13
Abbildung 4 Aufbau einer Muschel-1 (LE VAY und EGAN, 1999)	17
Abbildung 5 Aufbau einer Muschel-2 (LE VAY und EGAN, 1999)	18
Abbildung 6 Lebenszyklus der Miesmuschel (NORDSIECK, 2002)	19
Abbildung 7: <i>Vibrio cholerae</i> (TODAR, 2000)	28
Abbildung 8: <i>V. parahaemolyticus</i> mit ausgebildeten Lateralgeißeln (MC CARTER, 1999)	29
Abbildung 9: Die weltweite Ausbreitung der Cholera während der siebten Pandemie 1961 bis 1971 (TODAR, 2000)	46
Abbildung 10 Darstellung der Nachweis- und Differenzierungsschritte	66



# DANKSAGUNG

Abschließend möchte ich mich bei Herrn Univ.-Prof. Dr. A. Stolle für die Überlassung des Themas und die stets gewährte freundliche Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit bedanken.

Frau Dr. U. Lindena und den Mitarbeitern des Landesuntersuchungsamtes für Chemie, Hygiene und Veterinärmedizin Bremerhaven danke ich für die Übersendung der Vibrionen - Stämme und die freundlichen hilfsbereiten Telefongespräche.

Besonders bedanken möchte ich mich bei den Mitarbeitern des Chemischen und Veterinäruntersuchungsamtes Karlsruhe für ihre tatkräftige Mitarbeit bei der Untersuchung der Proben im Labor und für ihr Entgegenkommen bei Problemen.

Jürgen Hörl danke ich herzlich für die Bereitstellung seiner Fotoausrüstung und für die Vervielfältigung der Farbtafeln.

Mein besonderer Dank gilt vor allem auch meinem Lebenspartner Andreas Lexe, der mich in dieser Zeit ertragen hat und mir bei der Erstellung stets eine große Hilfe war, und meinen Eltern, die mir immer zur Seite standen.

# LEBENS LAUF

## Persönliche Angaben

Name	Sieffert
Vorname	Monika
Geburtsdatum	25.11.1971
Geburtsort	München
Wohnhaft	Raiffeisenstr. 7, 76870 Kandel

## Schulbildung

1978 - 1980	Grundschule Barnstorf
1980 - 1981	Grundschule Hannover-Wettbergen
1981 - 1982	Grundschule Overath
1982 - 1983	Paul-Klee-Gymnasium Overath
1983 - 1984	Orientierungsstufe Diepholz
1984 - 1989	Graf-Friedrich-Schule Diepholz, Gymnasium
1989 - 1991	Staatliches Gymnasium Wörth am Rhein Abschluss: Abitur

## Berufsausbildung

09.1991 - 11.1991	Berufsausbildung zur Pferdewirtin Ausbildungswechsel
01.1992 - 08.1992	Praktikum in der Schwarzwald-Tierklinik
08.1992 - 06.1994	Berufsausbildung zur Tierarzhelferin in der Schwarzwald Tierklinik Abschluss: Tierarzhelferin

## Zwischentätigkeit

07.1994 – 09.1994	Aushilfe-Montagearbeiten bei David & Baader-DBK-GmbH, Kandel
-------------------	---

## Studium

10.1994 - 04.2000	Studium der Veterinärmedizin an der Freien Universität Berlin
Mai 2000	Approbation

## Berufstätigkeit

seit 15.01.2001	Angestellt als Laborleiterin am Chemischen und Veterinäruntersuchungsamt Karlsruhe Abteilung VI
-----------------	--