

# ***Vibrio* spp. i norske skalldyr**

**Anette Bauer, Øyvin Østensvik og Liv Marit Rørvik**

**Norges veterinærhøgskole**

**Institutt for mattrygghet og infeksjonsbiologi**

**2006**

## INNHold

<b>Forord</b>	s 3
<b>Sammendrag</b>	s 4
<b>Summary</b>	s 5
<b>Bakgrunn</b>	s 6
Egenskaper hos bakteriene	s 7
<i>Vibrio</i> spp. i norsk sjømat	s 8
Påvisning og identifikasjon av <i>Vibrio</i> spp.	s 9
Mål for prosjektet	s 9
<b>Materiale og metoder</b>	s 10
Prøvemateriale	s 10
Bakteriologisk analyse	s 11
Virulensfaktorer	s 12
Genetisk identifikasjon	s 13
<b>Resultater</b>	s 14
Forekomst	s 14
Virulensfaktorer	s 15
Temperaturer	s 15
Genetisk identifikasjon	s 15
<b>Diskusjon</b>	s 16
Forekomst	s 16
Virulensfaktorer	s 18
Metodebegrensninger	s 19
Vurdering av funn	s 20
Genetisk identifikasjon	s 21
<b>Konklusjon</b>	s 22
<b>Anbefalinger</b>	s 22
<b>Etterord</b>	s 23
<b>Referanser</b>	s 23
<b>Vedlegg: Tabeller og figurer</b>	

## FORORD

Arbeidet som beskrives i denne rapporten er utført på prosjektet ”*Vibrio* i norsk sjømat”, som er en del av prosjektet ”*Vibrio* og virus i norsk sjømat”. Prosjektet ble startet på ettersommeren 2002, og er i slutfasen. Det er finansiert i hovedsak av tidligere Statens næringsmiddeltilsyn. Fiskeri- og havbruksnæringens forskningefond (FHF) har også bidratt med midler, og tidligere Fiskeridirektoratets kontrollverk, senere Mattilsynet, bidro med organisering og gjennomføring av prøvetakingen.

Prosjektet har vært utført ved Norges veterinærhøgskole. Liv Marit Rørvik har vært prosjektleder, Øyvin Østensvik har vært med i prosjektgruppen, og praktiske laboratoriearbeid har blitt utført av Anette Bauer og Marte Monshaugen. I tillegg ble en del av analysearbeidet utført ved de tidligere laboratoriene ved Næringsmiddelkontrollen i Asker og Bærum, og Miljøetaten i Oslo, begge senere LabNett Oslo.

Prosjektet har vært samkjørt med delprosjektet ”Virus i norsk sjømat”, som avgir egen rapport.

Oslo 31. august 2006

Anette Bauer

Øyvin Østensvik

Liv Marit Rørvik

## SAMMENDRAG

I perioden juli 2002 til september 2004 ble 798 prøver av norske analysert for *Vibrio* spp. Prøvene representerte 96 godkjente oppdrettsanlegg langs hele kysten fra Østfold til Finnmark, og ble tatt ut ved alle årstider. I tillegg ble det i sommerhalvåret undersøkt 88 prøver av blåskjell fra seks steder utenfor oppdrettsanlegg i Sør-Norge. Denne regionen har høyest vanntemperatur i Norge, og sjansen for å påvise *Vibrio* spp. ble derfor ansett å være størst der. I tillegg ble 72 prøver av andre skalldyr (krabbe, kamskjell og østers) analysert. Badevann fra indre Oslofjord (86 prøver) ble i august 2004 også undersøkt for *Vibrio* spp. Prøvene ble undersøkt i henhold til Nordisk Metodikkomité for Næringsmidlers metode. *V. parahaemolyticus* og *V. cholerae*-isolater ble undersøkt for forekomst av gener som koder for aktuelle virulensfaktorer (*tdh*, *trh* og *ctxA*) med PCR.

En PCR-metode for identifikasjon av *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae* og *V. vulnificus*, tidligere utviklet ved Norges veterinærhøgskole, ble prøvd ut på 429 isolater av *Vibrio* spp. Metoden er basert på regulatorgenet *ToxR* hos de tre artene.

*V. parahaemolyticus*, *V. cholerae* og *V. vulnificus* ble påvist i henholdsvis 10 %, 1 % og 0.2 % av prøvene fra godkjente oppdrettsanlegg. Tilsvarende tall for blåskjell utenom godkjente anlegg i Sør-Norge var 46 %, 1 % og 2 %. Konsentrasjonen av bakteriene var lav (<100 cfu/g) i alle unntatt fire prøver. En krabbep prøve inneholdt *V. parahaemolyticus*, og en østersprøve *V. cholerae*. I alt 88 % av badevannsprøvene inneholdt *V. parahaemolyticus*, 7 % *V. cholerae* og 2 % *V. vulnificus*.

Virulensgenet *trh* ble påvist i fire isolater av *V. parahaemolyticus* fra blåskjell (tre fra samme lokalitet), og tre fra badevann (fra ett prøvested). Ingen *V. cholerae* tilhørte serotype O:1 eller O:139, eller var bærere av *ctxA*.

Undersøkelsen viste at *trh*-positive *V. parahaemolyticus*, og *V. vulnificus* og *V. cholerae* non-O:1/non-O:139, finnes i norsk marint miljø. Resultatene indikerer at vibriobakterier representerer liten helserisiko ved konsum av norske skalldyr. Imidlertid representerer *trh*-bærende *V. parahaemolyticus* et visst potensiale for sykdom ved konsum av kontaminerte skjell. Dette gjelder også *V. vulnificus*, som kan gi sykdom ved lave doser. Risikoen vil øke ved lange perioder med høy vanntemperatur.

PCR-metoden, basert på *ToxR*, identifiserte korrekt alle isolater av *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* og *V. cholerae*.

## SUMMARY

From July 2002 to September 2004, 798 samples of Norwegian blue mussels were collected from 96 production sites along the coast from Østfold to Finnmark county through all seasons, and analyzed for *Vibrio* spp. The farms were all authorized by the Norwegian Food Safety Authority. In addition, 88 samples of wild growing blue mussels from the South-coast were examined. This region has the highest water temperature in Norway, and the possibility to isolate *Vibrio* spp. was assumed to be greater than in other regions. In addition 72 samples of other shellfish species (crabs, scallops and oysters) were analyzed for *Vibrio* spp. Seawater from the Oslo fiord (86) were also examined for *Vibrio* spp. All samples were examined according to a Nordic Committee on Food Analyses method. *V. parahaemolyticus* and *V. cholerae* isolates were examined for virulence genes (*tdh*, *trh* and *ctxA*) by PCR.

A PCR method for identification of *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae* and *V. vulnificus*, developed by Norwegian School of Veterinary Science, was tested on 429 *Vibrio* isolates. The method is based on the regulator gene *ToxR* of the three species.

*V. parahaemolyticus*, *V. cholerae* and *V. vulnificus* were detected in 10 %, 1 % and 0.2 % of the blue mussel farm samples. The corresponding numbers in wild growing blue mussels from the South-coast were 46 %, 1 % and 2 %. The bacterial concentrations were low (<100 cfu/g) in all the samples, except for four. One sample of crabs contained *V. parahaemolyticus*, and one oyster sample *V. cholerae*. Totally 88 % of the sea-water samples contained *V. parahaemolyticus*, 7 % *V. cholerae* and 2 % *V. vulnificus*.

*Trh* was detected in four blue mussel *V. parahaemolyticus* isolates (three from one site), and three sea-water isolates (one site). No *V. cholerae* were serotype O:1 or O:139, or carried *ctxA*.

The study showed that *trh*-positive *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* and *V. cholerae* non-O:1/non O:139, are present in the Norwegian environment. Even though *Vibrio* spp. in Norwegian shellfish represent limited hazard, presence of *V. parahaemolyticus* carrying *trh*, as well as *V. vulnificus*, show a potential for food poisoning for shellfish consumers. The risk for illness will increase by prolonged periods of high sea-water temperatures.

The PCR method based on *ToxR* identified all *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae* and *V. vulnificus* isolates correctly.

## BAKGRUNN

Vibriobakterier er årsak til human sykdom over hele verden, og de er i hovedsak knyttet til marint miljø og marine produkter i varme strøk (24). Unntaket er *Vibrio cholerae*, som hovedsakelig forårsaker epidemier via fekalt forurenset drikkevann. Tolv arter innen genus *Vibrio* er assosiert med sykdom hos mennesker, de fleste er årsak til øre/sårinfeksjoner\*. En oversikt over disse artene er gitt i Tabell 1. Åtte arter anses å være forbundet med matbåren sykdom, mens sammenhengen med slik sykdom er usikker for et par andre. De viktigste artene er *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* og *V. vulnificus*. Det er disse artene som blir omtalt i denne rapporten om ikke annet er spesifisert.

*V. parahaemolyticus* har forårsaket utbrudd av gastroenteritt i de fleste verdensdeler, og det siste tiåret har det skjedd en pandemisk (verdensomspennende) spredning av enkelte serotyper av bakterien. Det første utbruddet forårsaket av et europeisk produkt (spanske østers) opptrådte i 1999, men dette var ikke forårsaket av de pandemiske serotypene (20). Andre europeiske utbrudd har vært assosiert med importert sjømat. Nylig har det vært sykdomsutbrudd forårsaket av *V. parahaemolyticus* i Alaska (23), Chile (14) og Canada (1), i områder med klima som ligner mye på det norske.

*V. vulnificus*-infeksjon er kanskje den mest alvorlige vibrioinfeksjonen; i USA er den årsak til de fleste dødsfall som skyldes matforgiftning.

Forekomsten av sykdomstilfeller forårsaket av *V. parahaemolyticus* og *V. vulnificus* i Norge er ikke kjent. Innsendte isolater av bakteriene til Folkehelseinstituttet viser imidlertid at slike tilfeller forekommer, vanligvis som sår- og øreinfeksjoner. I Sverige og Danmark blir sårinfeksjoner forårsaket av *Vibrio* spp. stadig rapportert. Dødsfall forårsaket av *V. parahaemolyticus*, etter sårinfeksjon som utviklet seg til sepsis, har forekommet i Sverige.

*V. cholerae* har vært årsak til mange pandemier gjennom tidene. Den er den eneste av vibriobakteriene som er meldepliktig til Meldesystem for infeksjonssykdommer (MSIS).

Forekomsten av tilfeller er lav, data fra det siste tiåret indikerer i gjennomsnitt to tilfeller i året. Smitten er trolig ervervet i utlandet, men det har forekommet tilfeller der norsk mat ble mistenkt, men ikke bekreftet som smittekilde.

---

\* [http://141.150.157.80/bergeysoutline/outline/bergeysoutline\\_5\\_2004.pdf](http://141.150.157.80/bergeysoutline/outline/bergeysoutline_5_2004.pdf)

## Egenskaper hos bakteriene

*V. parahaemolyticus* blir ansett som en relativt ny matbåren patogen (sykdomsframkallende) bakterie, og er den vibriobakterien som er sterkest knyttet til marine produkter. Den ble oppdaget i Japan i 1950-åra, og har lenge vært den viktigste matbårne patogene bakterien i dette landet på grunn av stort konsum av rå fisk (sushi). Etter 1996 har enkelte serotyper, særlig O3:K6, dominert ved sykdom (2,6,32,9,30,21,28). Disse serotypene har hatt en pandemisk spredning. Alle *V. parahaemolyticus*-stammer som har virulensfaktorene termostabilt direkte hemolysin (TDH) og/eller TDH-relatert hemolysin (TRH) kan skape gastrointestinal sykdom. Virulensmekanismene er ikke avklart (25). Symptomer på sykdom er først og fremst diaré og magekramper. Infektiv dose er høy,  $10^5$ - $10^7$  med TDH- eller TRH-positive isolater, mottakeligheten er avhengig av allmentilstanden hos individet.

*V. vulnificus* har en dødelighet fra 30-75 %, avhengig av infeksjonsmåte og pasientens allmentilstand (15). Denne bakterien kan forårsake primær sepsis, og kan også gi alvorlige sårinfeksjoner som ender i sepsis. Pasienter som utvikler sepsis har oftest en underliggende sykdom, nedsatt immunforsvar og/eller har en historie med alkoholmisbruk (15,24). Rene gastroenterittsymptomer er ikke så vanlig, og er sjelden alvorlige nok til at legebehandling er nødvendig. I Norden opptrer bakterien først og fremst som agens for sårinfeksjon. Det er ikke avklart hvilke virulensfaktorer som forårsaker sykdom (24,31), og alle *V. vulnificus*-stammer anses som like virulente. Infektiv dose er ukjent, men antas å være lav for risikogruppene.

*V. cholerae* kan deles i to grupper med tanke på sykdom: de pandemiske stammene av serotype O:1 og O:139 som forårsaker kolera, og gruppen med de resterende ca. 200 serotypene som kalles non-O:1/non-O:139 (11). Kolera er en velkjent og fryktet diaré ("risvannsdiaaré") som kan være dødelig som følge av dehydrering og sjokk. Det er koleratoksinet, som genene *ctxA* og *ctxB* koder for, som hovedsakelig forårsaker kolera. Disse genene forekommer nesten aldri i andre serotyper enn O:1 og O:139 (16). Det har i lengre tid vært kjent at koleratoksingenene overføres med bakteriofagen CTXΦ. (19,29). Infektiv dose er  $10^4$ - $10^8$  bakterier, avhengig av almenntilstanden til individet. Reservoaret for serotypene O:1 og O:139 av *V. cholerae* er først og fremst steder preget av dårlige sanitære forhold; da særlig i det sørlige Asia, Sør-Amerika og Afrika. Dette er den eneste vibriobakterien som er direkte forbundet med fekal forurensning, og i motsetning til de andre vibrioartene er den i hovedsak et problem i kontaminert vann.

Non-O:1/non-O:139 *V. cholerae* kan gi selvavgrensede diaré av mildere karakter, og er i våre områder ofte implisert i sårinfeksjoner. Virulensfaktorene forbundet med disse serotypene er uavklart.

Vibriobakteriene er, med unntak av *V. cholerae*, helt avhengige av salt, og finnes i brakkvanns- og saltvannsmiljøer. De humanpatogene vibriobakteriene formerer seg raskt ved temperaturer over 18 °C, og er derfor først og fremst forbundet med strøk med varmere klima enn Norge. Matbåren sykdom forårsaket av vibrioarter er knyttet til rå eller for dårlig varmebehandlet sjømat, eller krysskontaminering pga dårlige hygienerutiner. *Vibrio* spp. er sensitive for varmebehandling, 60 °C inne i skjellet i noen minutter skal være nok til å eliminere patogene vibriobakterier. U.S. Food and Drug Administration (FDA) anbefaler at skjell dampes i 4-9 minutter før konsum (26).

Bakteriene er generelt lite tolerante for kulde, men de vil til en viss grad være beskyttet i sjømat. Ved kjølelagring ser det ut til at bakteriene kan gå over i en hvilefase (levende, men ikke dyrkbare celler) slik at de ikke lar seg påvise ved vanlige dyrkningsmetodikk. For *V. vulnificus* er det vist at denne tilstanden kan reverseres (26). Stress på grunn av lav temperatur, og eventuell overgang til ikke dyrkbar tilstand under kjølelagring av sjømat, kan føre til underestimering ved undersøkelse av forekomsten av bakteriene. Det er påvist enkelte psykotrofe stammer av *V. parahaemolyticus* fra sjømat.

### ***Vibrio* spp. i norsk sjømat**

Forekomsten av *Vibrio* spp. i det norske marine miljøet, og i norsk sjømat, er lite kjent. To mindre studier ble gjennomført i 1980 og 1981 der *V. parahaemolyticus* ble påvist i flere blåskjellprøver (13,5). På det tidspunktet var det imidlertid ikke metoder tilgjengelige for å undersøke for virulensegenskaper hos bakteriene.

Norges skjellnæring er voksende, noe som gjør det viktig å ha kunnskap om forekomsten av potensielt sykdomsframkallende vibriobakterier. Norges veterinærhøgskole (NVH) gjennomført i 2001 en pilotundersøkelse for Statens næringsmiddeltilsyn (SNT), der det ble påvist både *V. cholerae* og *V. parahaemolyticus* i blåskjell, mens undersøkte fiskeprøver var negative for de tre *Vibrio* spp.\*. Med bakgrunn i dette var det ønskelig med en utvidet undersøkelse, for å få mer kunnskap om forekomsten av potensielt patogene *Vibrio* spp. i norske skalldyr.

---

\* Ørmen og medarb., 2002. Rapport til Statens næringsmiddeltilsyn.



Blåskjell (*Mytilus edulis*) var det mest aktuelle produktet å undersøke siden det er størst produksjon av dette skalldyret, og det blir drevet oppdrett langs hele kysten. Blåskjell kan representere en mulig helserisiko for konsumenter mhp *Vibrio* spp. siden varmebehandlingen ofte er svak.

Ifølge Mattilsynets Mikrobiologiske retningslinjer (2004)\* skal *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae* og *V. vulnificus* ikke påvises i rå skalldyr og bløtdyr som skal varmebehandles eller spises uten varmebehandling. På grunnlag av disse retningslinjene er mange partier av skalldyr blitt avvist i importkontrollen etter påvisning av *Vibrio* spp.

### **Påvisning og identifikasjon av *Vibrio* spp.**

Påvisning av *Vibrio* spp. i næringsmidler er en omstendelig prosess. I tillegg til at standardmetodikkene omfatter både oppformerings- og isolasjonstrinn, må en rekke biokjemiske parametere undersøkes før man kan stille en artsdiagnose. Viktige egenskaper hos bakteriene er vist i Tabell 2. Fra en prøve kommer inn på laboratoriet til svaret foreligger, kan det ta mer enn en uke. En raskere og mindre arbeidskrevende identifisering av mistenkelige isolater er derfor ønskelig. I det tidligere omtalte pilotforsøket ble det utviklet en polymerase chain reaction (PCR) – metode for identifikasjon av *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae* og *V. vulnificus*, basert på regulatorgenet *ToxR* hos de tre artene. *ToxR* er et ideelt mål for primere fordi genene ser ut til å være velkonserverte innenfor genuset *Vibrio* (27), men allikevel forskjellige nok til å kunne differensiere mellom artene (18). Videreutvikling av metoden som en multiplex PCR- metode for alle tre artene vil ytterligere spare tid ved identifisering.

### **Mål for prosjektet**

- å få en oversikt over forekomsten av *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* og *V. vulnificus* i norske skalldyr
- å få kunnskap om potensialet for sykdom forårsaket av slike bakterier ved å kartlegge forekomsten av gener for de viktigste virulensfaktorene (*ctxA* i *V. cholerae*, og *tdh* og *trh* i *V. parahaemolyticus*).
- å lette arbeidet med rutineidentifikasjon av bakteriene ved å etablere PCR-metodikk basert på *ToxR*-genet for rask identifikasjon av *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* og *V. vulnificus*

---

\* [http://www.mattilsynet.no/regelverk/veiledere/mat/mikrobiologiske\\_retningslinjer\\_11633](http://www.mattilsynet.no/regelverk/veiledere/mat/mikrobiologiske_retningslinjer_11633)

## MATERIALE OG METODER

### Prøvemateriale

#### *Blåskjell fra oppdrett*

Det ble i perioden juli 2002 til september 2004 tatt ut i alt 798 prøver av blåskjell fra 96 lokaliteter langs kysten fra Østfold til Finnmark. Uttaksstedene ble valgt ut av daværende Fiskeridirektoratets kontrollverk (FK) for best mulig å dekke oppdrettsaktiviteten for blåskjell i Norge. Alle lokalitetene var godkjent for produksjon av FK. Antall uttakssteder varierte fra år til år, med 45 i 2002, 70 i 2003 og 48 i 2004. De to siste årene ble det bare tatt prøver fra lokaliteter som var kommersielt aktive. Fra 13 lokaliteter ble det tatt ut prøver alle tre årene, fra 42 lokaliteter to av årene, og fra 38 lokaliteter bare et år.

**Tabell 3.** Inndeling i regioner, og antall prøvesteder pr region for blåskjellprøver fra godkjente lokaliteter, i perioden 2002-2004.

Region	Fylker	Antall lokaliteter
Sør-Norge	Østfold, Agder	7
Vest-Norge	Rogaland, Hordaland, Sogn og fjordane	45
Midt-Norge	Møre og Romsdal, Trøndelag	25
Nord-Norge	Nordland, Troms, Finnmark	19
Totalt		96

Antall blåskjellprøver pr. år var 177, 411 og 210 for henholdsvis 2002, 2003 og 2004. Totalt antall prøver pr lokalitet varierte fra en til 25. Prøvene ble tatt ut av inspektører i FK, senere Mattilsynet. Skjellene ble pakket i plastposer, lagt i isoporbokser med fryseelement, og sendt som bedriftspakke over natt til NVH. Analyse for påvisning av *Vibrio* spp. ble utført ved NVH eller ved laboratoriene for næringsmiddeltilsynene i Asker og Bærum og Oslo, senere LabNett Oslo.

#### *Blåskjell utenom godkjent oppdrett ("verstinger")*

For å få mer informasjon om forekomsten av *Vibrio* spp. i blåskjell, og potensielt smittepress i norske farvann, ble det gjort en supplerende undersøkelse av skjell fra Sør-Norge i 2003 og 2004. I alt 88 prøver ble tatt utenom godkjente anlegg fra seks steder i Sør-Norge, på steder der man forventet høy vanntemperatur i lengre perioder. Man anså sannsynligheten for å finne

de tre vibrioartene for å være større der enn ved det landsdekkende prøvetakingsprogrammet. Prøver ble samlet inn fra Oslo (1 prøvested), Akershus (2), Vestfold (1) og Agder (2) i sommerhalvåret (juni-september). Det ble totalt tatt fra en til 33 prøver fra hvert prøvested. Prøvene ble tatt ut av Mattilsynet og Havforskningsinstituttet, og ble pakket og sendt inn som beskrevet ovenfor.

#### *Andre skalldyr*

Førtito prøver av kamskjell og 16 prøver av østers ble samlet inn fra Trøndelag (storparten), Møre og Romsdal, Sogn og fjordane, Hordaland, Rogaland, Aust-Agder og Nordland, over hele året. Fjorten prøver av krabbe ble tatt om sommeren (juni, juli og august) på Sørlandet. Prøvene ble sendt som beskrevet ovenfor.

#### *Badevann*

I forbindelse med rutinemessig bakteriologisk undersøkelse av badevann i Oslo, Asker og Bærum sommeren 2004, ble det i hele august også undersøkt for *Vibrio* spp. i vannet. Det ble tatt ut totalt 86 prøver, fra i alt 40 prøvesteder, på ni tidspunkter. Vannprøvene ble tatt av inspektører i Mattilsynet, og brakt til LabNett Oslo, hvor påvisning av *Vibrio* spp. ble utført. Kulturene ble identifisert ved NVH.

#### *Temperaturer*

For blåskjell og badevann ble vanntemperaturen tatt på prøvestedet samtidig med at prøve ble uttatt. Dessverre ble ikke alltid dette gjort pga mangel på utstyr, ødelagt utstyr, forglemmelse eller lignende.

For å sammenligne temperaturer mellom regioner og ved forskjellige tidspunkter (måned/år), ble lineær regresjonsanalyse gjennomført ved hjelp av GLM i Stata (Stata Corp, College Station, Tx).

### **Bakteriologisk analyse**

#### *Kvalitativ undersøkelse*

Prøvene av skalldyr ble undersøkt for *Vibrio* spp. i henhold til Nordisk Metodikkomité for næringsmidler, metode nr. 156\*. Metoden innebærer oppformering av 20 g prøve både i alkalisk peptonvann (APW) og salt-polymyxin-buljong ved  $41.5 \pm 1$  °C i  $18 \pm 2$ t, med

---

\* Nordisk metodikkomité (NMKL). 2(156):1-8, 1997. Pathogene *Vibrio* species. Påvisning og kvantifisering.

påfølgende utsæd på thiosulfat-citrat-galle-sukrose-agar (TCBS), og inkubering ved  $37 \pm 1$  °C i  $24 \pm 2$  t. Femti av prøvene ble bare oppformert i APW, men ved to temperaturer, 41.5° C og 37° C. Vann ble filtrert i mengder på fra 1 ml til 200 ml, deretter ble vannfiltrene plassert direkte på TCBS, eller lagt i oppformeringsbuljong (100 ml APW). Videre prosedyre var som beskrevet ovenfor.

Gule eller grønne kolonier med diameter 2-5 mm på TCBS ble identifisert ved gramfarging, forgjæring av glukose, bevegelighet, oksydase-reaksjon, følsomhet for vibriostatin O/129, vekst ved forskjellige saltkonsentrasjoner (0, 3, 6, 8 og 10 %), og ved API 20E.

Mistenkelige kolonier fra vannprøvene ble identifisert ved PCR (se nedenfor), vekst ved forskjellige saltkonsentrasjoner, bevegelighet, oksydase-reaksjon og Voges-Proskauer test. Deteksjonsgrensen for metoden er  $\geq 1$  cfu/20 g prøve. Isolatene ble lagret ved -70 °C i Microbank<sup>tm</sup> (Pro-Lab diagnostics, Canada).

Alle *V. cholerae*-isolater ble serotypet ved Folkehelseinstituttet.

#### *Kvantitativ undersøkelse*

Kvantitativ undersøkelse ble gjort for 472 prøver av skjell fra 2003 og 2004. TCBS-skåler ble inokulert med 0.1 ml fra APW/prøve-blandingen før oppformering, og inkubert ved  $37 \pm 1$  °C i  $48 \pm 4$  t. Presumptive vibriokolonier ble telt og identifisert som beskrevet ovenfor.

Deteksjonsgrensen for metoden er 100 cfu/g prøve.

#### **Virulensfaktorer**

Isolater identifisert som *V. parahaemolyticus* eller *V. cholerae* ble undersøkt for virulensgener med PCR (primere er vist i Tabell 4).

Minst et isolat av *V. parahaemolyticus* fra hver prøve (138 isolater) ble undersøkt for TDH-genet (*tdh*) med primere fra GeneBanks sekvens S76724. PCR-betingelsene var som for toxR-PCR. Totalt 135 av disse isolatene ble også testet for *tdh* med en spesifikk probe med en tidligere beskrevet metode (10). Videre ble *V. parahaemolyticus*-isolatene (138) undersøkt for TRH-genet (*trh*) med primere beskrevet tidligere (4) og betingelser som for toxR-PCR (se genetisk identifikasjon).

Minst ett isolat av *V. cholerae* fra hver positive prøve (12 isolater) ble undersøkt for forekomst av koleratoksingenet (*ctxA*) med tidligere publiserte primere (12) og samme betingelser som for toxR-PCR (se genetisk identifikasjon).

## Genetisk identifikasjon

### *Preparering av DNA*

Hvert isolat ble dyrket på blodagar ved  $37 \pm 1$  °C over natt, en koloni ble deretter slemmet opp i 200 µl sterilt destillert vann i et Eppendorf-rør. Røret ble satt i mikrobølgeovn ved 900 W i 2-3 min og sentrifugert ved  $12,000 \times g$  i 5 min. Supernatanten ble pipettert av og lagret ved -20 °C.

### *Primere*

Primere for toxR-genene hos *V. cholerae* (Vc), *V. parahaemolyticus* (Vp) og *V. vulnificus* (Vv) ble valgt ut fra GeneBank-sekvensene AB029913 (Vp), M21249 (Vc) og AF170883 (Vv). Den ene primeren i hvert par var felles, mens den andre var spesifikk for hver bakterie. En oversikt over benyttede primere er vist i Tabell 4.

VptoxR-positive isolater ble også undersøkt med tidligere publiserte primere for termolabil direkte hemolysin (*tl*) (4,22). Dette hemolysinet er spesifikt for *V. parahaemolyticus*, men er ikke knyttet til virulens.

### *PCR-betingelser*

Multiplex PCR ble gjort i 50 µl mix som besto av 1xbuffer (10mM Tris-Cl pH 8.8, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCL, 0.1 % Triton<sup>®</sup> X-100), 0.24 mM av hvert nukleotid (dNTP mix), 1.5 Uµl<sup>-1</sup> Dynazyme II (alt fra Finnzymes, Finland), 30 pmol av UtoxF primeren, 20 pmol av hver av de tre spesifikke primerne, og 2 µl DNA. PCR-betingelsene var: 95 °C i 4 min; 25 sykluser med 95 °C i 30 sek, 55 °C i 30 sek og 72 °C i 30 sek; og tilslutt 72 °C i 7 min (BioRad Ismart cyclers, CA). Betingelsene ved PCR for *tl* var som tidligere beskrevet (4), men ved en annealing-temperatur på 53 °C. Amplifisert DNA (10 µl) ble separert i 1.2 % agarose med etidiumbromid, i 1xTAE, med 75 V i 40-90 min. DNA ble visualisert med UV-stråling.

## RESULTATER

### Forekomst

#### Skalldyr

Forekomsten av *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* og *V. vulnificus* i norske skalldyr i perioden 2002-2004, er vist i Tabell 5 og Figur 1. *V. parahaemolyticus* ble påvist i 90 av i alt 886 blåskjellprøver (10 %). *V. cholerae* og *V. vulnificus* ble påvist i henholdsvis 9 (1 %) og 2 (0.2 %) av prøvene. To prøver inneholdt både *V. parahaemolyticus* og *V. cholerae*, og en inneholdt *V. parahaemolyticus* og *V. vulnificus*. Blant de 50 prøvene hvor det ble anvendt både 41.5° og 37° C, var det ingen forskjell i antall prøver positive for *V. parahaemolyticus*, og ingen *V. cholerae* eller *V. vulnificus* ble påvist. *Vibrio* spp. ble påvist i to (3 %) andre skalldyrprøver, henholdsvis en krabbeprove for *V. parahaemolyticus*, og en østersprøve for *V. cholerae*.

*V. parahaemolyticus* ble funnet hvert år fra alle prøvestedene for blåskjell utenom godkjente oppdrettsanlegg, mens bare tre av de godkjente blåskjell-lokalitetene hadde positive prøver hvert år når det var tatt prøver to eller tre år. Sammenheng mellom forekomst av *V. parahaemolyticus* i blåskjell og prøvetakingstidspunkt, er vist i Figur 2. De aller fleste *V. parahaemolyticus* positive prøvene ble tatt ut i løpet av sommermånedene da vanntemperaturen var høyest.

Konsentrasjonen av *Vibrio* spp. var <100 cfu/g i alle unntatt fire prøver. I to prøver fra henholdsvis Vest-Norge og Sør-Norge ble det påvist henholdsvis 1800 cfu/g og 200 cfu/g *V. parahaemolyticus*. To prøver fra Sør-Norge inneholdt 100 cfu/g og 200 cfu/g av *V. vulnificus*. Den hyppigst påviste vibriobakterien i blåskjell var *V. alginolyticus*. Denne arten ble også påvist i alle krabbeprovne, og i to av østersprovne. Andre presumptive *Vibrio* spp. ble observert i 17 av prøvene, men disse ble ikke artsbestemt.

#### Badevann

*V. parahaemolyticus*, *V. cholerae* og *V. vulnificus* ble påvist i henholdsvis 88 %, 7 % og 2% av 86 prøver av badevann (Tabell 5). Prøvene som inneholdt *V. cholerae* og *V. vulnificus*, inneholdt også *V. parahaemolyticus*.

Temperaturen ble målt ved 45 av prøveuttakene, temperaturene var fra 18 -24 °C, median 20 °C. *V. parahaemolyticus* ble funnet i hele temperaturintervallet, mens målte temperaturer ved

funn av *V. cholerae* var 21 °C og høyere. Temperaturen ble ikke målt for prøvene hvor *V. vulnificus* ble funnet.

Maksimum påvist antall vibriobakterier var 4 *V. parahaemolyticus*/ ml og 1 *V. vulnificus*/ml. *V. cholerae* ble påvist bare ved kvalitativ metode basert på oppformering.

### **Virulensfaktorer**

Det ble påvist *trh* i *V. parahaemolyticus* fra fire prøver av blåskjell, alle var isolert i Sør-Norge. Tre var fra samme godkjente lokalitet men fordelt på tre tidspunkter (23.06 og 20.07.03, 24.08.04), den fjerde var en prøve tatt utenom godkjent lokalitet. *V. parahaemolyticus* fra tre av vannprøvene var bærere av *trh*. Prøvene var fra samme sted men var tatt ut på forskjellige tidspunkt (11., 18. og 25.08.04). Et *V. alginolyticus*-isolat var positiv for *trh* (24.08), sekvensen for dette genet vil bli nærmere undersøkt for sammenligning med *trh* hos *V. parahaemolyticus*. Figur 1B viser hvor de *trh*-positive isolatene ble funnet. Ingen av *V. parahaemolyticus*-isolatene var bærere av *tdh*.

Alle *V. cholerae* var non O:1/O:139, og ingen var bærere av *ctxA*.

### **Temperaturer**

Vanntemperaturene i Sør-Norge var signifikant høyere ( $p < 0,001$ ) enn i Vest-Norge, i Midt-Norge og Nord-Norge (Tabell 7A). Vanntemperaturene i Vest-Norge var høyere enn i Nord-Norge ( $p < 0,001$ ), men ingen statistisk forskjell ble funnet mellom Vest-Norge og Midt-Norge. Nord-Norge hadde signifikant lavere temperaturer enn alle de andre regionene ( $p < 0,001$ ).

### **Genetisk identifikasjon**

I alt 429 isolater av *Vibrio* spp. ble testet med enkel eller multiplex ToxR-PCR. Resultatene er vist i Tabell 6. Alle isolater av *V. cholerae* (55), *V. parahaemolyticus* (228) og *V. vulnificus* (22) ble korrekt identifisert. Bruk av *vptoxR*-PCR på *V. alginolyticus*-isolater (114) ga 18 falske positive resultater (16%), disse ga samme PCR-produkt som *V. parahaemolyticus*. Isolatene hadde imidlertid kolonimorfologi som var typisk for *V. alginolyticus* på TCBS, og var i utgangspunktet ikke mistenkt for å være *V. parahaemolyticus*.

Ved bruk av *tl*-primerne for identifikasjon av *V. parahaemolyticus*, viste ialt 31 av 185 (17 %) undersøkte isolater negativt resultat. Ingen *V. alginolyticus*-isolater (54) forholdt seg som *V. parahaemolyticus* ved denne testen.

## DISKUSJON

Undersøkelse av 1044 prøver av norske blåskjell, andre skalldyr og sjøvann i perioden 2002-2004, viste at *V. parahaemolyticus* som inneholder *trh*, *V. vulnificus* og *V. cholerae* non-O:1/non-O:139, finnes i det norske miljøet. Alle artene ble isolert både fra blåskjell og vannprøver. *V. parahaemolyticus* og *V. cholerae* non-O:1/non-O:139 ble i tillegg isolert fra henholdsvis østers og krabbe. Det er første gang *V. vulnificus* blir påvist fra norske blåskjell og sjøvann.

### Forekomst

#### *Blåskjell fra oppdrett*

Funn av *V. parahaemolyticus* var forventet siden denne arten er blitt isolert tidligere fra norske blåskjell. Flest *V. parahaemolyticus*-positive prøver var fra Sør-Norge, noe som også var forventet siden denne landsdelen har høyest vanntemperatur. Ingen prøver fra Nord-Norge var positive for *V. parahaemolyticus*. Vanntemperaturen i Nord-Norge var signifikant lavere sammenlignet med de andre landsdelene. I Vest-Norge var det flere positive prøver i 2002 enn påfølgende år, sannsynligvis fordi temperaturen holdt seg overraskende høyt utover sensommeren dette året.

De kvantitative analysene viste at antallet *V. parahaemolyticus* pr gram blåskjell var lavt, mindre enn 100 pr gram i alle unntatt to prøver. Infeksjonsdosen for *V. parahaemolyticus* er i størrelsesorden 100 000 bakterier, og bakterien må kunne produsere toksinene TRH eller TDH for å gi alvorlige gastrointestinale symptomer. Antallet *V. parahaemolyticus* i skjellene i den foreliggende undersøkelsen var lavt. Vekst av bakterien i produktet er derfor nødvendig for at antallet skal bli høyt nok til å føre til sykdom. Kjøling av produktene vil hindre slik vekst, mens varmebehandling vil eliminere eller redusere antallet bakterier.

Utbrudd forårsaket av *V. parahaemolyticus*-kontaminerte østers i land med lignende klima som Norge, viser at man også i slike områder må være oppmerksom på at bakterien kan opptre i tilstrekkelige mengder til å føre til sykdom. Utbruddet i et av de viktigste områdene for skalldyrproduksjon i det sørlige Chile i 2004, ble forklart med høyere vanntemperatur enn normalt (>16 °C). I utbruddet i Alaska hadde man på østersfarmen hvor de kontaminerte



østersene var høstet, fra 1997 til 2004 sett en årlig økning av den gjennomsnittlige vanntemperaturen på 0.21 °C, og i juli-august 2004 var ikke temperaturen lavere enn 15 °C. Dette viser at ved vanntemperatur høyere enn 15-16 °C er det økt risiko for sykdom forårsaket av *V. parahaemolyticus*. Statistisk undersøkelse som ble utført på det foreliggende materialet indikerte at når temperaturen stiger til mer enn 16 °C, kan det forventes at mer enn 50 % av prøvene fra Sør-Norge inneholder *V. parahaemolyticus* (3).

*V. cholerae* ble funnet i kun få prøver, men dette viser at bakterien finnes i vårt marine miljø. Overraskende nok var flere av de positive prøvene tatt om vinteren, og en blåskjellsprøve var fra en lokalitet nord for 64. breddegrad. Dette var ikke forventet pga lav vanntemperatur. Bakterien ble i alle tilfellene påvist kun etter oppformering, noe som indikerer at den er til stede i lavt antall. Ingen av isolatene var av den pandemiske typen (serotypene O:1 eller O:139). De fleste isolatene som har forårsaket diaré i Norge har imidlertid vært non-O:1/non-O:139. Disse serotypene er vanligvis ikke bærere av koleratoksingenet (*ctx*). *V. cholerae*-isolatene fra den foreliggende undersøkelsen inneholdt heller ikke virulensgenet, men har sannsynligvis likevel potensiale til å føre til sykdom av mildere karakter enn den klassiske koleraen ("risvannsdiaaréen").

#### *Blåskjell utenom godkjent oppdrett ("verstinger")*

"Verstingene" ble inkludert i studiet for å gi et inntrykk av forekomst av *Vibrio* spp. utenom oppdrett, og på områder der det var størst sannsynlighet for å finne bakteriene. Som forventet var de fleste prøvene positive for *Vibrio* spp., i hovedsak *V. parahaemolyticus*. Både *V. cholerae* og *V. vulnificus* ble påvist, men bare sporadisk og i lave antall.

#### *Andre skalldyr*

Kamskjell, krabbe og østers ble inkludert i undersøkelsen for å gi en indikasjon på forekomst av *Vibrio* spp. i annen sjømat enn blåskjell. Bare to prøver var positive for *Vibrio* spp., henholdsvis en østersprøve for *V. cholerae*, og en krabbep prøve for *V. parahaemolyticus*. Østers spises stort sett rå og konsum av rå sjømat innebærer alltid en viss risiko for matbårne infeksjoner. Funn av *V. cholerae* non-O:1/non-O:139 i en av bare 16 undersøkte prøver, indikerer at det kan være fare for sykdom ved konsum av norske østers. Små mengder av bakterien, og det at de pandemiske stammene ikke er påvist, tyder imidlertid på at risikoen ikke er stor. Det må understrekes at østers i andre land er et høyrisikoprodukt med hensyn på matforgiftning med *V. parahaemolyticus* og *V. vulnificus* (24,7,20). Østersproduksjonen i

Norge er foreløpig liten. Det anbefales imidlertid å følge opp med videre undersøkelser av østers dersom vanntemperaturen og/eller østersproduksjonen øker.

*V. parahaemolyticus* i rå krabbe vil vanligvis ikke medføre risiko, siden krabben kokes før konsum. I Spania var imidlertid kokt krabbe som var avkjølt i vann kontaminert med *V. parahaemolyticus* årsak til et utbrudd av gastroenteritt (21).

Kamskjellmaterialet var lite, men resultatene indikerer at det er lav risiko for matforgiftning forårsaket av *Vibrio* i kamskjell. Dette også fordi bare muskelen konsumeres, og varmebehandling av overflaten vil være tilstrekkelig for å fjerne eventuelle *Vibrio* spp.

### *Vann*

Alle tre vibrioarter ble påvist i vann, noe som ikke var overraskende i og med at bakteriene også ble påvist i blåskjell. Undersøkelser foretatt i USA påviste en forekomst mellom 0.4 og 6.8 cfu/ml *V. parahaemolyticus*, avhengig av årstid og sted (8), mens maksimumskonsentrasjonen i vårt materiale var 4 cfu/ml. *V. vulnificus* er rapportert funnet i størrelsesorden opptil 24 cfu/ml (overflatevann) i de varme sommermånedene (33), altså vesentlig høyere enn i vår studie.

Vibriobakterier kan representere en potensiell risiko for badende i form av sårinfeksjoner, særlig ved temperaturer over 18 °C i lengre perioder. Spesielt interessante er funnene av *V. vulnificus*, som kan gi svært alvorlig sårinfeksjon. Bakterien er blitt påvist i sårinfeksjoner og sepsis gjentatte ganger i våre naboland Danmark og Sverige. En uformell rundspørring blant forskjellige norske sykehus tyder på at sårinfeksjoner forårsaket av *Vibrio* spp. skjer årlig.

### *V. alginolyticus*

Den hyppigst isolerte vibrioarten uansett kilde var *V. alginolyticus*. Denne bakterien er også rapportert som den vanligste vibrioarten i andre europeiske land. Bakteriens rolle som agens for diaré er omdiskutert, men den har vært assosiert med sykdomsutbrudd. *V. alginolyticus* rolle ved sår/øreinfeksjoner er velkjent.

### **Virulensfaktorer**

Det vanligst forekommende virulensgenet hos sykdomsframkallende *V. parahaemolyticus*, *tdh*, ble ikke påvist i isolatene. Imidlertid ble det påvist *trh* i isolater fra Sør-Norge (blåskjell og vann). *Tdh* er nesten alltid til stede i kliniske stammer isolert fra pasienter med diaré, noen ganger sammen med *trh*, mens sistnevnte opptrer relativt sjelden.

Det er første gang *trh* er rapportert påvist i *V. parahaemolyticus* i Nord-Europa. Virulensgenet er tidligere påvist i franske isolater av bakterien. Undersøkelser fra andre land har vist at frekvensen av *trh*-positive *V. parahaemolyticus* i miljøet kan variere fra sted til sted, men den er jevnt over lav (0.4 til 15 %). Påvisning av virulensfaktoren *trh* i *V. parahaemolyticus* fra Sør-Norge, indikerer at fare for alvorlig matbåren sykdom er tilstede. Dessuten antas sentrale virulensgener å være plassert på mobile genelementer som kan overføres mellom stammer av bakterien. Slik kan en videre spredning av slike gener skje.

Det var svært interessant at *trh*-bærende isolater ble funnet på samme sted over tid, med fra dager opptil et års mellomrom. Dette indikerer at det på disse stedene finnes en stabil populasjon av *trh*-positive *V. parahaemolyticus*-stammer. Preliminære resultater fra typing av isolatene med puls-felt gel-elektroforese (PFGE), tyder på at de *trh*-positive isolatene av *V. parahaemolyticus* er svært like, uavhengig av prøvetakingsdato og stedet de ble isolert fra.

Man kan ikke utelukke at *V. parahaemolyticus* som er bærere av *tdh* forekommer i norske farvann, men for sjelden til å bli påvist i de 138 isolatene som er undersøkt. Ut fra undersøkelser andre steder, forventes den samme lave frekvensen for *trh* og *tdh* i miljøstammer av *V. parahaemolyticus*.

### **Metodebegrensninger**

Lav forekomst av *Vibrio* spp. i norske skalldyr kan sannsynligvis i stor grad forklares med den lave vanntemperaturen langs størstedelen av kysten, og at mange prøver i tillegg var tatt i vinterhalvåret. Imidlertid kan transport og analysemetodikk også ha bidratt til at vibriobakterier relativt sjelden ble påvist. Prøvene ble transportert med isposer eller kjøleelementer, siden de måtte fraktes over lengre strekninger. Spesielt for *V. vulnificus* er det rapportert at antallet bakterier reduseres vesentlig i prøver lagret på is over tid.

Dyrkingemetoden som ble brukt (NMKL nr. 156), med høy dyrkingstemperatur i oppformeringstrinnet (41.5 °C), er antatt å kunne hindre oppvekst av svekkede vibriobakterier. I denne undersøkelsen ble det for et utvalg av prøvene (n=50) brukt både 37° C og 41.5° C ved oppformering, men resultatene viste ingen forskjell i antall prøver positive for *V. parahaemolyticus*. Disse resultatene tyder på at den høye temperaturen ikke har negativ betydning for påvisning av denne bakterien. Siden verken *V. cholerae* eller *V. vulnificus* ble påvist i disse prøvene, sier ikke denne tilleggsundersøkelsen noe om betydningen av oppformeringstemperatur for disse artene.

Det er ressurskrevende å identifisere flere vibrioisolater fra samme prøve med den konvensjonelle metoden. Den sjeldne forekomsten av *tdh*- eller *trh*- positive isolater av *V. parahaemolyticus*, og *ctx*-positive isolater av *V. cholerae*, gjør at det hadde det vært ønskelig å undersøke mange isolater fra hver prøve for innhold av virulensgener. Arbeidsmengden vil imidlertid nødvendigvis begrense antallet.

### **Vurdering av funn**

Mikrobiologiske retningslinjer angir at *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae* og *V. vulnificus* ikke skal påvises i rå skalldyr og bløtdyr som skal varmebehandles eller spises uten varmebehandling. Det tas ikke forbehold om mengde av bakteriene, at isolatene skal inneholde aktuelle virulensfaktorer, eller at *V. cholerae* skal være serotype O:1/O:129. Ut fra gjeldende retningslinjer ville en del av skalldyrprøvene i denne studien ikke vært akseptable dersom de var høstet for konsum.

Kunnskap om infeksjonsdoser og virulensfaktorer tilsier at det ikke er grunn til å mene at *V. parahaemolyticus* og *V. cholerae* som er påvist i norske skalldyr, i det lave antallet de foreligger, skulle utgjøre noen vesentlig helsefare. Det bør derfor diskuteres om tilstedeværelsen av disse bakteriene i skalldyr burde vurderes ut fra grenseverdier og innhold av virulensgener, og ikke bare ut fra påvisning av art. Risikoen for sykdom vil også være forskjellig ut fra om næringsmidlet skal varmebehandles før konsum eller ikke.

Et argument mot dette vil selvsagt være at med gjeldende metodikk vil man bare identifisere en eller få mistenkelige isolater fra hver prøve, og at virulensbærende isolater kan finnes i prøven uten å bli fanget opp. Det kan da anses å være tryggere å vurdere prøven som potensielt helsefarlig. Når det gjelder *V. vulnificus*, vil funn av bakteriearten i seg selv angi en risiko. Infeksjonsdosen antas å kunne være svært lav hos personer i risikogruppen, og bakterien har ikke spesielle, kjente virulensgener som kan brukes i vurderingen.

Vurderingen av innhold av *Vibrio* spp. varierer fra land til land. FDA vurderer funn av *V. cholerae* O:1/O:139 og *V. vulnificus* som uakseptabelt uansett mengde. Grenseverdien for *V. parahaemolyticus* er  $10^4$  cfu/g, uavhengig av tilstedeværelse av virulensfaktorer. EU har ikke felles retningslinjer for *Vibrio* spp. i sjømat. Storbritannia har nulltoleranse for *V. cholerae*,

mens *V. parahaemolyticus* aksepteres i konsentrasjoner på <1000/g. I Nederland sier retningslinjene at bare < 100/g av *V. parahaemolyticus* er akseptabelt i salgsøyeblikket. \*

### **Genetisk identifikasjon**

ToxR-PCR metoden som ble brukt for identifikasjon av de tre vibrioartene identifiserte alle isolatene av *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae* og *V. vulnificus* korrekt. Både den enkle metoden og multiplex PCR-metoden ga samme resultat. En del isolater av *V. alginolyticus* ga falske positive resultater når primeren ment for *V. parahaemolyticus* ble brukt, men morfologisk var disse koloniene ulik *V. parahaemolyticus*-kolonier på TCBS. Antallet isolater som er brukt for å sammenligne identifikasjonen opp mot biokjemisk eller PCR-basert identifikasjon med andre primere, er svært omfattende sammenlignet med andre liknende studier (4,17), særlig med tanke på antall undersøkte *V. alginolyticus*-isolater.

Identifikasjon av *V. parahaemolyticus* med en publisert, mye brukt, PCR-metode basert på *tl*, ga flere falske negative resultater. Disse primerne ga imidlertid ikke feilaktig positive resultater når de ble brukt på *V. alginolyticus*.

Resultatene viser at man alltid må være oppmerksom på at falske positive og negative resultater kan forekomme ved bruk av PCR, hvor bare en liten del av et gen er mål for primerne. Den foreliggende ToxR-PCR- metoden kan imidlertid brukes med stor sikkerhet dersom kolonimorfologi på TCBS tyder på at en av de tre vibrioartene er tilstede. Bruk av ToxR-PCR ved identifisering av *Vibrio* spp., evt med tillegg av nøkkelanalyser som undersøkelse for salttoleranse, vil redusere tids- og ressursbruk ved vibriundersøkelser vesentlig.

---

\* [http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scv/out45\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scv/out45_en.pdf)

## KONKLUSJON

Resultatene fra dette prosjektet viser at *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae* og *V. vulnificus* representerer minimal risiko for konsumenter av norske blåskjell. Funn av *trh* i *V. parahaemolyticus*-isolater fra både badevann og blåskjell viser imidlertid at det er et visst potensiale for sykdom ved konsum av kontaminerte skjell. Vibriobakterier i vannet vil også kunne gi forårsake sårinfeksjoner ved bading. Risikoen vil øke om vi får lange perioder med høye vanntemperaturer, med påfølgende økning av antallet vibriobakterier. En ny PCR metode basert på *ToxR*-genene vil, der kolonimorfologien på TCBS viser presumptive *V. parahaemolyticus*, gi en sikker, rask og arbeidsbesparende identifikasjon av denne vibrioarten.

## ANBEFALINGER

- Vibrioforekomsten i skjell bør til en viss grad overvåkes. Østers, som spises rå, kan medføre risiko for matbåren sykdom. Spesielt gjelder dette i sommerhalvåret, og dersom man observerer en generell økning i sjøtemperaturen. Lokalteter hvor *trh*-positive *V. parahaemolyticus* er påvist bør vises spesiell oppmerksomhet.
- Mikrobiologiske retningslinjer mhp innhold av *Vibrio* spp. i sjømat bør vurderes med tanke på om konsentrasjoner av bakteriene, eventuell forekomst av virulensgener, samt om produktet skal varmebehandles, bør tas med i vurderingen av funn.
- Det foreligger liten oversikt over vibriorelaterte sykdomstilfeller Norge. Mer oppmerksomhet ved mikrobiologisk undersøkelse i forbindelse med gastroenteritter vil kunne gi svar på om det er betydelige mørketall.

## ETTERORD

Takk til alle inspektører i Mattilsynet/Fiskeridirektoratets kontrollverk for et stort arbeid med uttak og innsending av prøver, til LabNett Oslo for godt samarbeid om analysene, og til avd. ing. Marte Monshaugen for god innsats på laboratoriet.

## REFERANSER

1. **anonymous.** 1998. Outbreak of *Vibrio parahaemolyticus* Infections Associated With Eating Raw Oysters-  
-Pacific Northwest, 1997. *JAMA: The Journal of the American Medical Association* **280**:126-127.
2. **Ansaruzzaman, M., M. Lucas, J. L. Deen, N. A. Bhuiyan, X. Y. Wang, A. Safa, M. Sultana, A. Chowdhury, G. B. Nair, D. A. Sack, L. Von Seidlein, M. K. Puri, M. Ali, C. L. Chaignat, J. D. Clemens, and A. Barreto.** 2005. Pandemic serovars (O3:K6 and O4:K68) of *Vibrio parahaemolyticus* associated with diarrhea in Mozambique: spread of the pandemic into the African continent. *J Clin. Microbiol.* 2005. Jun. ;43. (6):2559. -62. **43**:2559-2562.
3. **Bauer, A., O. Ostensvik, M. Florvag, O. Ormen, and L. M. Rorvik.** 2006. Occurrence of *Vibrio parahaemolyticus*, *V. cholerae*, and *V. vulnificus* in Norwegian Blue Mussels (*Mytilus edulis*). *Applied and Environmental Microbiology* **72**:3058-3061.
4. **Bej, A. K., D. P. Patterson, C. W. Brasher, M. C. Vickery, D. D. Jones, and C. A. Kaysner.** 1999. Detection of total and hemolysin-producing *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish using multiplex PCR amplification of *tl*, *tdh* and *trh*. *J Microbiol Methods* **36**:215-225.
5. **Bø, G.** 1980. *Vibrio parahaemolyticus*. *Norsk Veterinærskrift* **92**:303-308.
6. **Chiou, C. S., S. Y. Hsu, S. I. Chiu, T. K. Wang, and C. S. Chao.** 2000. *Vibrio parahaemolyticus* serovar O3:K6 as cause of unusually high incidence of food-borne disease outbreaks in Taiwan from 1996 to 1999. *J Clin Microbiol.* **38**:4621-4625.
7. **Daniels, N. A., L. MacKinnon, R. Bishop, S. Altekruise, B. Ray, R. M. Hammond, S. Thompson, S. Wilson, N. H. Bean, P. M. Griffin, and L. Slutsker.** 2000. *Vibrio parahaemolyticus* infections in the United States, 1973-1998. *J Infect. Dis* **181**:1661-1666.
8. **DePaola, A., L. H. Hopkins, J. T. Peeler, B. Wentz, and R. M. McPhearson.** 1990. Incidence of *Vibrio parahaemolyticus* in U.S. coastal waters and oysters. *Appl Environ. Microbiol.* **56**:2299-2302.

9. **DePaola, A., C. A. Kaysner, J. Bowers, and D. W. Cook.** 2000. Environmental Investigations of *Vibrio parahaemolyticus* in Oysters after Outbreaks in Washington, Texas, and New York (1997 and 1998). *Applied and Environmental Microbiology* **66**:4649-4654.
10. **DePaola, A., J. L. Nordstrom, J. C. Bowers, J. G. Wells, and D. W. Cook.** 2003. Seasonal Abundance of Total and Pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in Alabama Oysters. *Applied and Environmental Microbiology* **69**:1521-1526.
11. **Faruque, S. M., M. J. Albert, and J. J. Mekalanos.** 1998. Epidemiology, genetics, and ecology of toxigenic *Vibrio cholerae*. *Microbiol. Mol. Biol Rev* **62**:1301-1314.
12. **Fields, P. I., T. Popovic, K. Wachsmuth, and O. Olsvik.** 1992. Use of polymerase chain reaction for detection of toxigenic *Vibrio cholerae* O1 strains from the Latin American cholera epidemic. *J Clin. Microbiol* **30**:2118-2121.
13. **Gjerde, J. and B. Boe.** 1981. Isolation and characterization of *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio parahaemolyticus* from the Norwegian coastal environment. *Acta Vet. Scand.* **22**:331-343.
14. **González-Excalona, N., V. Cachicas, C. Acevedo, M. L. Rioseco, J. A. Vergaro, F. Cabello, J. Romero, and R. T. Espejo.** 2005. *Vibrio parahaemolyticus* diarrhea, Chile, 1998 and 2004. *Emerg Infect Dis* **11**:129-131.
15. **Gulig, P. A., K. L. Bourdage, and A. M. Starks.** 2005. Molecular Pathogenesis of *Vibrio vulnificus*. *J Microbiol.* 2005. Feb. ;43. Spec. No:118. -31. **43 Spec No**:118-131.
16. **Kaper, J. B., J. G. Morris, Jr., and M. M. Levine.** 1995. Cholera. *Clin Microbiol. Rev* **8**:48-86.
17. **Kim, Y. B., J. Okuda, C. Matsumoto, N. Takahashi, S. Hashimoto, and M. Nishibuchi.** 1999. Identification of *Vibrio parahaemolyticus* strains at the species level by PCR targeted to the *toxR* gene. *J Clin Microbiol.* **37**:1173-1177.
18. **Lin, Z., K. Kumagai, K. Baba, J. J. Mekalanos, and M. Nishibuchi.** 1993. *Vibrio parahaemolyticus* has a homolog of the *Vibrio cholerae* *toxRS* operon that mediates environmentally induced regulation of the thermostable direct hemolysin gene. *J. Bacteriol.* **175**:3844-3855.
19. **Lipp, E. K., A. Huq, and R. R. Colwell.** 2002. Effects of global climate on infectious disease: the cholera model. *Clin Microbiol. Rev* **15**:757-770.
20. **Lozano-Leon, A., J. Torres, C. R. Osorio, and J. Martinez-Urtaza.** 2003. Identification of *tdh*-positive *Vibrio parahaemolyticus* from an outbreak associated with raw oyster consumption in Spain. *FEMS Microbiology Letters* **226**:281-284.
21. **Martinez-Urtaza, J., L. imital, D. Velasco, A. DePaola, M. Ishibashi, Y. Nakaguchi, and et al.** 2005. Pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6, Europe. *Emerg Infect Dis* **11**:1319-1320.



22. **McCarthy, S. A., A. DePaola, D. W. Cook, C. A. Kaysner, and W. E. Hill.** 1999. Evaluation of alkaline phosphatase- and digoxigenin-labelled probes for detection of the thermolabile hemolysin (tlh) gene of *Vibrio parahaemolyticus*. *Lett. Appl. Microbiol.* **28**:66-70.
23. **McLaughlin, J. B., A. DePaola, C. A. Bopp, K. A. Martinek, N. P. Napolilli, C. G. Allison, S. L. Murray, E. C. Thompson, M. M. Bird, and J. P. Middaugh.** 2005. Outbreak of *Vibrio parahaemolyticus* gastroenteritis associated with Alaskan oysters. *N. Engl. J Med.* 2005. Oct. 6. ;353. (14):1463. -70. **353**:1463-1470.
24. **Morris, J. G., Jr.** 2003. Cholera and other types of vibriosis: a story of human pandemics and oysters on the half shell. *Clin. Infect. Dis* **37**:272-280.
25. **Nishibuchi, M. and J. B. Kaper .** 1995. Thermostable direct hemolysin gene of *Vibrio parahaemolyticus*: a virulence gene acquired by a marine bacterium. *Infection and Immunity* **63**:2093.
26. **Oliver, J. D. and J. B. Kaper.** 2001. *Vibrio* Species, p. 263-300. *In* M. P. Doyle, L. R. Beuchat, and T. J. Montville (eds.), *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*. ASM Press, Washington D,C.
27. **Osorio, C. R. and K. E. Klose.** 2000. A region of the transmembrane regulatory protein ToxR that tethers the transcriptional activation domain to the cytoplasmic membrane displays wide divergence among *Vibrio* species. *J Bacteriol.* **182**:526-528.
28. **Quilici, M. L., A. Robert-Pillot, J. Picart, and J. M. Fournier.** 2005. Pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 spread, France. *Emerg Infect Dis* **11**:1148-1149.
29. **Reidl, J. and K. E. Klose.** 2002. *Vibrio cholerae* and cholera: out of the water and into the host. *FEMS Microbiology Reviews* **26**:125-139.
30. **Smolikova, L. M., I. Lomov, T. V. Khomenko, G. P. Murnachev, T. A. Kudriakova, O. P. Fetsailova, E. M. Sanamiants, L. D. Makedonova, G. V. Kachkina, and E. N. Golenishcheva.** 2001. [Studies on halophilic vibrios causing a food poisoning outbreak in the city of Vladivostok] Galofil'nye vibriony, obuslovivshie vspyshku pishchevoi toksikoinfektsii vo Vladivostoke. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 2001 Nov. -Dec. ;(6. ):3-7.3-7.
31. **Strom, M. S. and R. N. Paranjpye.** 2000. Epidemiology and pathogenesis of *Vibrio vulnificus*. *Microbes. Infect.* **2**:177-188.
32. **Wong, H. C., S. H. Liu, T. K. Wang, C. L. Lee, C. S. Chiou, D. P. Liu, M. Nishibuchi, and B. K. Lee.** 2000. Characteristics of *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 from Asia. *Applied and Environmental Microbiology* **66**:3981-3986.
33. **Wright, A. C., R. T. Hill, J. A. Johnson, M. C. Roghman, R. R. Colwell, and J. G. Morris, Jr.** 1996. Distribution of *Vibrio vulnificus* in the Chesapeake Bay. *Applied and Environmental Microbiology* **62**:717-724.

**Tabell 1.**

Vibrioarter som er assosiert med humane infeksjoner [11, 26, 28]. Antallet '+' refererer til den relative hyppigheten bakteriene blir isolert med fra pasientprøver, '-' betyr at bakterien ikke er påvist, '-/+' betyr usikker forbindelse mellom sykdom og bakterien. Antall tilfeller (antall døde) er hentet fra Centers for Disease Control and Prevention (CDC) i USA i 1999 [26]

	Gastroenteritt	Sår eller øre infeksjoner	Sepsis	Ant. tilfeller (ant. døde)
<i>V. cholerae</i> O:1/O:139	++++	-/+	-	5 (0)
<i>V. cholerae</i> non-O:1/non-O:139	++	+	+	45 (0)
<i>V. parahaemolyticus</i>	++++	+	-/+	116 (1)
<i>V. fluvialis</i>	++	+	+	19 (0)
<i>V. furnissii</i>	++	-	-	1 (0)
<i>V. hollisae</i>	++	+	-/+	13 (0)
<i>V. mimicus</i>	++	+	-	10 (0)
<i>V. metschnikovii</i>	-/+	-	-/+	1 (0)
<i>V. vulnificus</i>	+	+++	+++	83 (31)
<i>V. alginolyticus</i>	-/+	++	-	28 (0)
<i>V. charchariae</i>	-	-/+	-	0 (0)
<i>V. cincinnatiensis</i>	-	-	-/+	0 (0)
<i>V. damsela</i>	-	++	-	2 (0)

**Tabell 2.**

Biokjemiske egenskaper hos de viktigste *Vibrio* spp. med hensyn på mattrygghet. *V. alginolyticus* er inkludert i tabellen fordi den er den hyppigst isolerte vibriobakterien fra mat og miljøprøver. Den er av liten relevans i matforgiftningstilfeller.

	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>V. cholerae</i>	<i>V. vulnificus</i>	<i>V. alginolyticus</i>
Sukrose	-	+	-	+
Glukose, oksydativt	+	+	+	+
Glukose, fermentativt	+	+	+	+
Glukose, gass	-	-	-	-
Cellobiose	-	-	+	-
Vekst i trypton tilsatt:				
NaCl 0%	-	+	-	-
NaCl 3%	+	+	+	+
NaCl 6%	+	+/-	+/-	+
NaCl 8%	+	-	-	+
NaCl 10%	-	-	-	+
Nitrat → Nitritt	+	+	+	+
Arginin dihydrolase	-	-	-	-
Ornithin dekarboxylase	+	+	+/-	+/-
Lysin dekarboxylase	+	+	+	+
ONPG	-	+	+	-
Indol	+	+	+	+
Voges-Proskauer	-	+	-	+
Vibriostatin O/129 (100µg)	S	S	S	S

**Tabell 4.**

PCR-primere brukt for å identifisere (*Id.*) *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* og *V. vulnificus* (*toxR* og *tl*), og identifikasjon av virulensgener (*trh*, *tdh* og *ctxA*) (*Virulens*)

Primer	Bakterie	Sekvens	Produkt (bp*)
<i>Id.</i>			
UtoxF	universal	-GASTTTGTTTGGCGYGARCAAGGTT	-
vcToxR	<i>V. cholerae</i>	GGTTAGCAACGATGCGTAAG	640
vpToxR	<i>V. parahaemolyticus</i>	GGTTCAACGATTGCGTCAGAAG	297
vvToxR	<i>V. vulnificus</i>	AACGGAACTTAGACTCCGAC	435
Tl-L	<i>V. parahaemolyticus</i>	AAAGCGGATTATGCAGAAGCACTG	-
Tl-R	<i>V. parahaemolyticus</i>	GCTACTTTCTAGCATTTTCTCTGC	450
<i>Virulens</i>			
Trh-L	<i>V. parahaemolyticus</i>	TTGGCTTCGATATTTTCAGTATCT	-
Trh-R	<i>V. parahaemolyticus</i>	CATAACAAACATATGCCCATTTCCG	500
Tdh-R	<i>V. parahaemolyticus</i>	GTTGGATATACACATTACCAAT	-
Tdh-F	<i>V. parahaemolyticus</i>	GTTCTGATGAGATATTGTTTGTG	406
ctxA-F	<i>V. cholerae</i>	CGGGCAGATTCTAGACCTCCT	-
ctxA-R	<i>V. cholerae</i>	CGATGATCTTGGAGCATTCCCAC	565 bp

\* bp – antall basepar

**Tabell 5.**

Forekomst av *Vibrio parahaemolyticus* (V.p.), *V. cholerae* (V.c.) og *V. vulnificus* (V.v.) i prøver av norske skalldyr, og badevann i Oslofjorden.

	Ant prøver	Ant lok	Ant V.p.+ (%)	Ant lok	Ant V.c.+ (%)	Ant lok	Ant V.v.+	Ant lok
<i>Blåskjell, oppdrett</i>								
Sørlandet	70	7	28 (40 %)	5	3 (4 %)	2	0	
Vestlandet	377	45	21 (7 %)	13	4 (1 %)	3	0	
Midt-Norge	205	25	1 (<1 %)	1	1 (<1 %)	1	0	
Nord-Norge	146	19	0	0	0	0	0	
<i>Sum blåskjell, oppdrett</i>	798	96	50 (6 %)	19	8 (1 %)	6		
<i>Blåskjell, "verstinger"</i>	88	6	40 (46 %)	6	1 (1 %)	1	2 (2 %)	2
<i>Andre skalldyr</i>								
Kamskjell	42		0		0		0	
Østers	16		0		1 (6 %)		0	
Krabbe	14		1 (7 %)		0		0	
<i>Badevann</i>	86	40	76 (88 %)	38	6 (7 %)	6	2 (2 %)	2

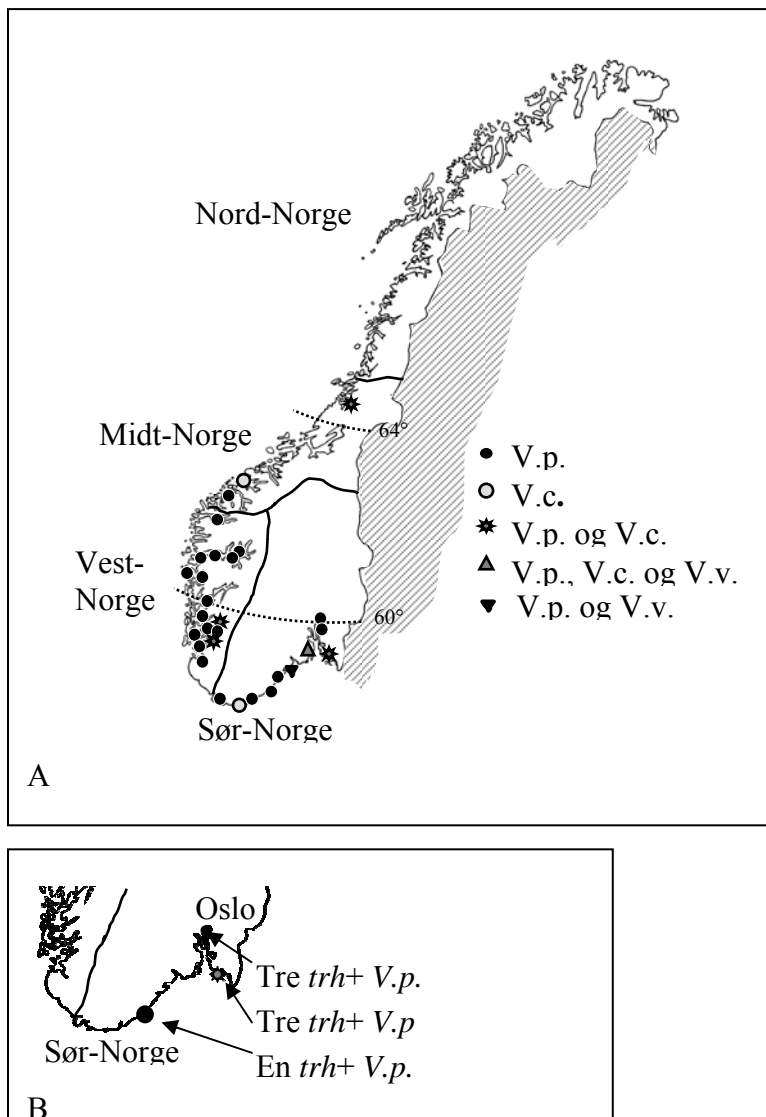
**Tabell 6.**

Resultater fra undersøkelse av isolater av *Vibrio* spp. med enkel og multiplex PCR basert på *toxR* og *tl*. Ved enkel PCR ble bare ett primer-par (*xtoxR*+*UtoxF*) brukt, mens ved multiplex ble *ToxR*-primere for alle tre arter brukt.

	Ant. isolater	Multiplex PCR	Enkel PCR	vptoxR	vctoxR	vttoxR	vptl
<b><i>V. parahaemolyticus</i> (n=228)</b>							
CCUG 14474 (ATCC 17802)	1	1		1/1*	0/1	0/1	1/1
CCUG 43363 ( <i>tdh+</i> ) WP1	1	1		1/1	0/1	0/1	1/1
CCUG 43364 ( <i>trh+</i> )AQ4037	1	1		1/1	0/1	0/1	1/1
CCUG 43365 ( <i>trh+</i> )AT-4	1	1		1/1	0/1	0/1	1/1
Kliniske isolater, faeces	9	9		9/9	0/9	0/9	8/9
Kliniske isolater, sår	1	1		1/1	0/1	0/1	1/1
NVHs stammesamling	73	21	52	73/73	0/21	0/21	38/41
Norske blåskjell	141	130	11	141/141	0/130	0/130	103/130
<b><i>V. cholerae</i> (n=55)</b>							
CCUG 33379, Non-O:1/non-O:139 ( <i>ctxA-</i> )	1	1		0/1	1/1	0/1	
CCUG 9118A (ATCC 14035), O:1 serotype ( <i>ctxA+</i> )	1	1		0/1	1/1	0/1	
CCUG 34707 (ATCC 51394), O:139 serotype ( <i>ctxA+</i> )	1	1		0/1	1/1	0/1	
Kliniske isolater, faeces	10		10		10/10		
Kliniske isolater, sår, puss eller øre	5		5		5/5		
NVHs stammesamling	25	7	18	0/18	25/25	0/12	
Norske blåskjell	12	12		0/12	12/12	0/12	
<b><i>V. vulnificus</i> (n=22)</b>							
CCUG 13448 (ATCC 27562)	1	1		0/1	0/1	1/1	
ATCC 33149	1	1		0/1	0/1	1/1	
Kliniske isolater, blod	2		2			2/2	
KVL**	9	9		0/9	0/9	9/9	
NVHs stammesamling	6	5	1	0/5	0/5	6/6	
Norske blåskjell	3	3		0/3	0/3	3/3	
<b><i>V. alginolyticus</i> (n=114)</b>							
CCUG 13445 (ATCC 17749)	1	1		0/1	0/1	0/1	
NVHs stammesamling	15	7	8	3/15	0/7	0/7	0/15
Norske blåskjell	98	27	71	15/98	0/27	0/27	0/39
<b><i>Vibrio</i> spp. (n=10)</b>							
<i>V. cincinnatiensis</i> (NNVI)	1	1		0/1	0/1	0/1	
<i>V. diazotrophicus</i> (NNVI)	1	1		0/1	0/1	0/1	
<i>V. fluvialis</i> (NNVI)	1	1		0/1	0/1	0/1	
<i>V. metschnikovii</i> (NNVI)	6	2	4	0/6	0/2	0/2	
<i>V. mimicus</i> (NNVI)	1		1		0/1	0/1	
<b>Totalt antall</b>	<b>429</b>	<b>246</b>	<b>183</b>	<b>403</b>	<b>281</b>	<b>255</b>	<b>239</b>

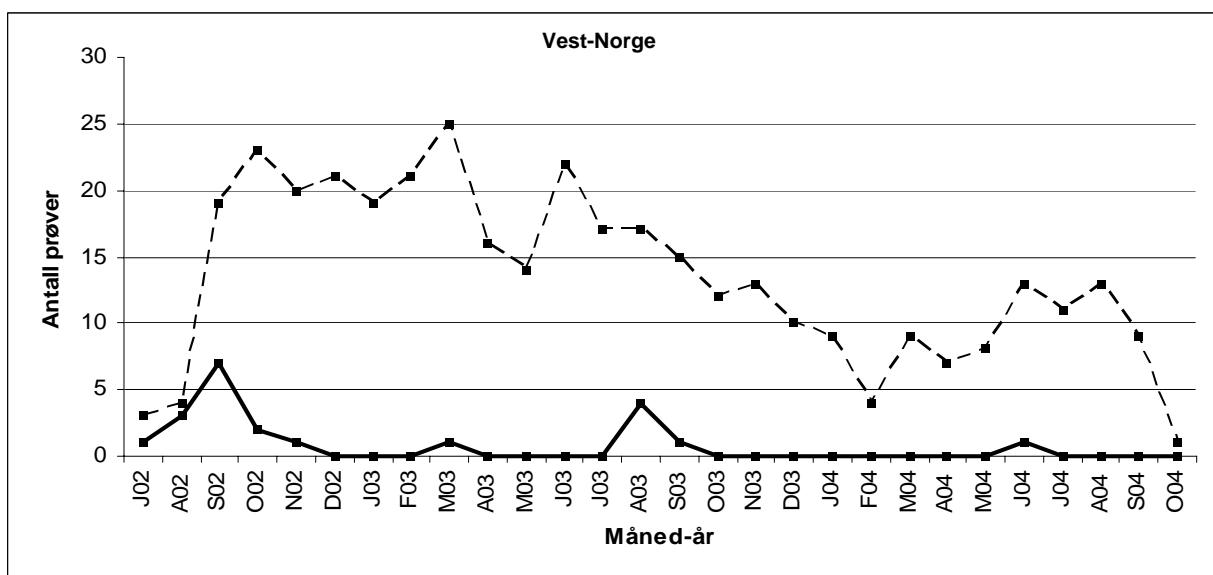
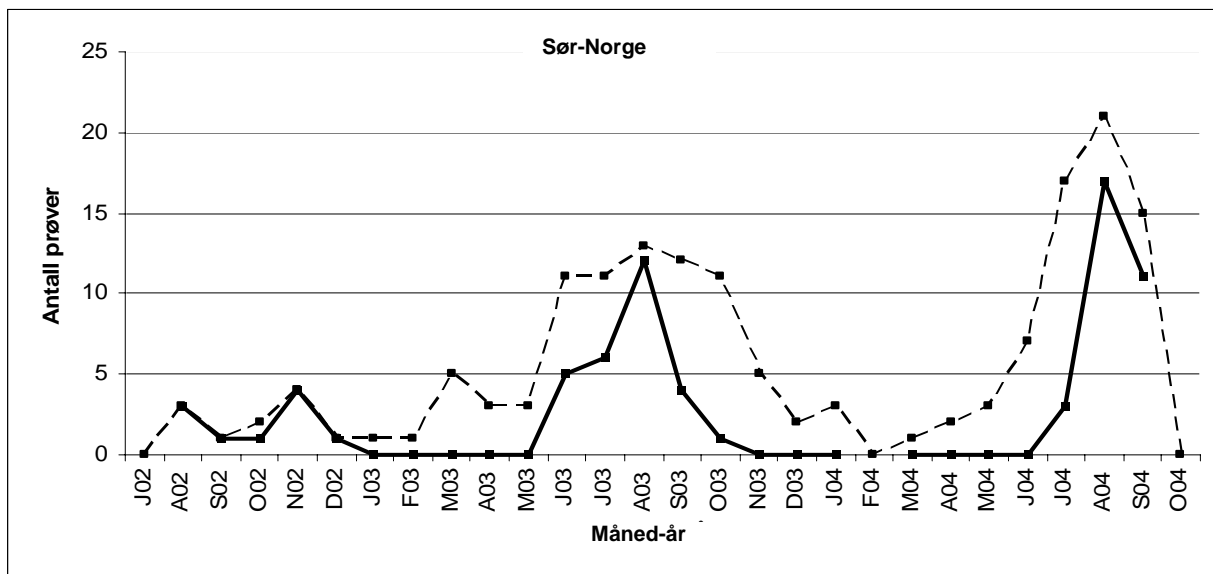
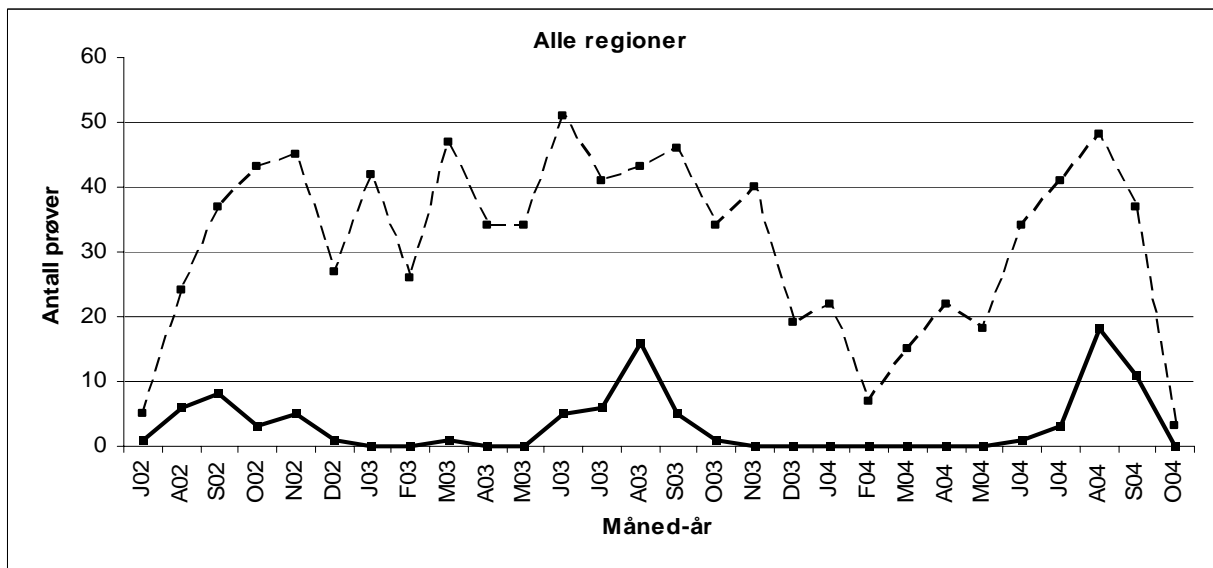
\* antall isolater med positiv reaksjon/antall undersøkte isolater

\*\* isolater fra den Kongelige veterinær- og landbohøyskole i København v/Anders Dalsgaard



**Figur 1.**

**A.** Oversikt over hvor *V. parahaemolyticus* (V.p.), *V. cholerae* (V.c.) og *V. vulnificus* (V.v.) ble påvist  
**B.** Oversikt over hvor de *trh*-positive (*trh*+) *V. parahaemolyticus* stammene ble isolert fra.



**Figur 2. A.** Oversikt over det totale antall prøver (stiplet linje) og antall prøver positive (hel linje) for *V. parahaemolyticus* på landsbasis i prosjektperioden. **B.** Oversikt over det totale antall prøver fra Sør-Norge (stiplet linje), og antall prøver positive (hel linje) for *V. parahaemolyticus* fra denne regionen i prosjektperioden. **C.** Oversikt over det totale antall prøver fra Vest-Norge (stiplet linje), og antall prøver positive (hel linje) for *V. parahaemolyticus* fra denne regionen i prosjektperioden. Både prøver fra godkjente lokaliteter og prøver tatt utenom godkjente lokaliteter er inkludert.