

# Real-time PCR von virulenten *Vibrio parahaemolyticus* in Fisch- und Krebstierprodukten

A. Lehmacher und B. Hansen

Institut für Hygiene und Umwelt, Hamburg, Deutschland

Korrespondenz an: Dr. Anselm Lehmacher, Institut für Hygiene und Umwelt,  
Abteilung Mikrobiologischer Verbraucherschutz, Marckmannstrasse 129a, D-20539 Hamburg, Germany,  
Tel.: 0049 40 42845 7270, Fax: 0049 40 42845 7274, E-mail: anselm.lehmacher@hu.hamburg.de

Eingegangen: 18. Januar 2007

**Key words:** *Vibrio parahaemolyticus*, Real-time PCR

**Abkürzungen:** ASPW = Alkalisches Salinisches Peptonwasser; DNA = Deoxyribonucleic acid; dNTP = desoxy-Nukleosidtriphosphate; FAM = 6-Carboxyfluorescein; KBE = Kolonie bildende Einheiten; KP = Kanagawa-Phänomen; PCR = Polymerase Chain Reaction; TCBS = Thiosulphate–Citrate–Bile salts–Sucrose–Agar; TDH = Thermostable Direct Hemolysin; TRH = TDH-Related Hemolysin

**Zusammenfassung:** Pathogene *Vibrio parahaemolyticus* rufen Gastroenteritis hervor. Die Hauptinfektionsquellen stellen kontaminierte Fischprodukte und Meeresfrüchte dar. *V. parahaemolyticus*-Patientenisolate unterscheiden sich von Umweltisolaten durch die Anwesenheit der Hämolysine TDH und TRH als deren wichtigste Virulenzfaktoren.

Evaluierte PCR-/real-time PCR-Verfahren wurden zur Untersuchung von 710 Proben Fisch- und Krebstierprodukte eingesetzt. Nach der Selektivanreicherung von Vibrionen in alkalischem, salinischem Peptonwasser führen die real-time PCR-Verfahren der Gene von TDH und TRH zu einer Ersparnis von mindestens einem Arbeitstag beim Nachweis virulenter *V. parahaemolyticus*-Isolate.

**Abstract:** Pathogenic *V. parahaemolyticus* strains cause gastroenteritis. Contaminated fish products and seafood represent the most important sources of infection. *V. parahaemolyticus* strains from patients differ from environmental isolates by their production of the haemolysins TDH and TRH that represent their main virulence factors.

710 specimens of fish and crayfish products were examined by an evaluated PCR-/real-time PCR. This detection method of virulent *V. parahaemolyticus* isolates reduces the working time by one day after a selective enrichment of vibrios with alkaline saline peptone water.

## 1. Einleitung

Pathogene *V. parahaemolyticus* verursachen sporadisch und epidemisch Gastroenteritis mit wässrigem Durchfall und Darmkrämpfen. Daneben treten ggf. Fieber, Übelkeit, Erbrechen, Kopfschmerzen und allgemeine Mattigkeit auf. Nur wenige Patienten erleiden Komplikationen wie Austrocknung, Herzrhythmusstörungen, Kollaps und Zyanose (Iida et al., 2006). Die Inkubationszeit liegt zwischen 4 Stunden und 4 Tagen. Die Infektion ist selbstlimitierend und die Symptome halten 2 bis 10 Tage an (Iida et al., 2006). Die minimale Infektionsdosis beträgt rund  $10^5$  Zellen (Barker, 1974). Die Hauptquellen für Infektionen mit *V. parahaemolyticus* sind kontaminierte Fischprodukte und Meeresfrüchte. Gelegentlich treten Sepsis und Wundinfektionen besonders bei immungeschwächten Patienten und Leberzirrhotikern auf (Hlady und Klontz, 1996). In Deutschland erworbene Infektionen sind extrem selten.

Zurzeit sind 76 OK-Serotypen, abgeleitet von dem somatischen Lipopolysaccharid und dem Kapselpolysaccharid, von *V. parahaemolyticus* bekannt. Darunter werden einige pandemische Klone von großer Bedeutung beobachtet, insbesondere TDH (Thermostable Direct Hemolysin)-bildende *V. parahaemolyticus* O3:K6 (Chowdhury et al., 2000).

*Vibrio parahaemolyticus* ist weit verbreitet im salzhaltigen Wasser der Meeres- und Küstenregionen sowie Flussmündungen. Wassertemperatur, Salinität, Sauerstoffgehalt, Zooplanktonblüte und die Gezeiten beeinflussen die Verbreitung. Vibrionen leben oft in Gemeinschaft mit Zooplankton, kleinen Krebstieren, deren Darm und Oberfläche sie besiedeln. Bei sinkenden Wassertemperaturen gehen die Vibrionen in einen nicht mehr kultivierbaren Ruhezustand über und überdauern im Sediment oder auf Zooplankton. Wärmere Wassertemperaturen ab ca. 20 °C lassen die Vermehrung der Vibrionen wieder zu. *V. parahaemolyticus* gehört zu den halophilen Vibrionen und benötigt 1–3% NaCl zum Wachstum und längeren Überleben. Seinem natürlichen Vorkommen in salzhaltigem Wasser vor allem der Küstenregionen entsprechend erfolgt die Übertragung überwiegend durch un-

zureichend erhitzte oder rekontaminierte Krustaceen, Muscheln und Fische. Entsprechend dem Wärmebedürfnis der Vibrionen treten Infektionen in den wärmeren Klimazonen häufiger auf als in den gemäßigten Zonen, in denen sie meist eine ausgesprochene Saisonalität zeigen. So werden die Keime im Sommer auch an der deutschen Nord- und Ostseeküste sowie im den Gezeiten unterworfenen Elbmündungstrichter nachgewiesen. In Japan und Korea ist *V. parahaemolyticus* in vielen Jahren der häufigste bakterielle Enteritiserreger.

Patientenisolate von *V. parahaemolyticus* sind auf Wagatsuma-Agar zu über 90% hämolysierend, was als Kanagawa-Phänomen (KP) bezeichnet wird. Im Gegensatz dazu zeigen weniger als 1% der Umweltisolate aus aller Welt dieses Phänomen. Von den hämolysierenden Komponenten aus *V. parahaemolyticus* verursacht nur TDH (Thermostable Direct Hemolysin) das Kanagawa-Phänomen. TDH und das verwandte Hämolysin TRH (TDH-Related Hemolysin) gelten als die wichtigsten Virulenzfaktoren von *V. parahaemolyticus*. TRH kommt in den beiden Varianten TRH1 und TRH2 vor. TDH und TRH stimulieren die Sekretion von Chloridionen in das Darmlumen mit gleichzeitigem Flüssigkeitsverlust und wirken nicht nur auf Erythrozyten zytotoxisch. Zwei Kopien des TDH-Gens liegen in einer Pathogenitätsinsel auf dem kleineren der beiden Chromosome eines vollständig sequenzierten Kanagawa-positiven Patientenisolates (Makino et al., 2003). Diese Pathogenitätsinsel kodiert auch Gene eines Typ-III-Sekretionssystems Gram-negativer Bakterien. Diese Pathogenitätsinsel ist nur in Kanagawa-positiven Stämmen nachweisbar (Makino et al., 2003) und ist an deren enterotoxischen Aktivität beteiligt (Park et al., 2004). Die Ureaseproduktion, ein ungewöhnlicher Phänotyp von *V. parahaemolyticus*, ist mit dem Vorkommen des *trh*-Gens assoziiert (Okuda et al., 1997), da dieses Gen vom Urease-Operon flankiert wird. Der Nachweis der beiden Hämolysine erfolgt mittels PCR der entsprechenden Gene *tdh* und *trh*. TDH kann auch durch reverse passive Latexagglutination (Denka Seiken, Japan) nachgewiesen werden. *V. parahaemolyticus* vermehrt sich aber auch enteroinvasiv im Kaninchen und kolonisiert den Dünndarm, wo die Keime auch Entzündungen hervorrufen können (Chatterjee et al., 1984).

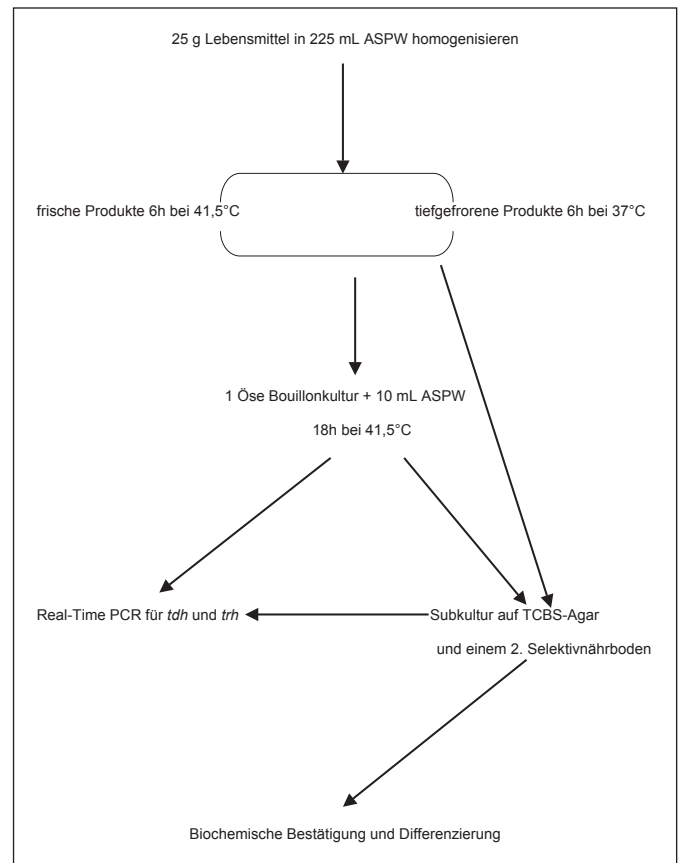
Aufgrund der nicht restlos geklärten Pathogenität von *V. parahaemolyticus* besteht Unsicherheit bezüglich der Bewertung des Nachweises in Lebensmitteln (Europäische Kommission, 2005). In den USA wurde für Fischerei-Fertigprodukte im Anhang 5 der FDA und EPA Guidance Levels (Fish and Fishery Products Hazards and Control Guide, Stand Januar 1998) ein Toleranzwert von  $10^4$  *V. parahaemolyticus*/g festgelegt. Die von der ICMSF (1996), Großbritannien und den Niederlanden angegebenen Richtwerte für verschiedene Fischereiprodukte liegen bei  $\leq 10^2$  *V. parahaemolyticus*/g mit Grenzwerten von  $10^3$  *V. parahaemolyticus*/g (European Commission, 2001). Die nachgewiesenen *V. parahaemolyticus* werden dabei nicht auf das Kanagawa-Phänomen untersucht. Solange für Europa kein verbindlicher Standard bezüglich *V. parahaemolyticus* festgelegt ist, sollte in Übereinstimmung mit den Empfehlungen der Europäischen Kommission (2001) und dem Beschluss der 51. Arbeitstagung des Arbeitskreises Lebensmittelhygienischer Tierärztlicher Sachverständiger beim Nachweis von *V. parahaemolyticus* auf die bisher bekannten Virulenzfaktoren TDH und TRH untersucht werden und sollten keine Stämme mit TDH und/oder TRH nachweisbar sein dürfen.

Das einzige internationale genormte Nachweisverfahren von *V. parahaemolyticus* in Lebensmitteln stellt die ISO 8914 (1990) dar, die der Überarbeitung bedarf. Die ISO-Arbeitsgruppe ISO/TC34/SC9 befasst sich zurzeit damit. Standardarbeitsanweisungen wurden von der FDA (Kaysner und DePaola, 2004) und vom Nordic Committee of Food Analysis (1997) publiziert. In der EU-Verordnung 2073/2005 wurde der Bedarf eines standardisierten Nachweisverfahrens für die EU formuliert.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Bakterienstämme und kulturelle Untersuchungen auf *V. parahaemolyticus*

32 Isolate von 6 *Vibrio*-Arten, davon 22 der Spezies *V. parahaemolyticus*, 4 *V. cholerae*, 2 *V. alginolyticus*, 2 *V. metschnikovii*, 1 *V. vulnificus* und 1 *V. furnissii* wurden der Stammsammlung des Instituts für Hygiene und Umwelt (Hamburg) entnommen. 8 der 22 *V. parahaemolyticus*-Stämme waren Kanagawa-positiv. 15 wurden von Fisch- und Krebstierprodukten isoliert sowie 7 Kanagawa-positiv von Patienten. Aus der Institutsammlung stammten auch je ein Isolat der Aeromonaden *A. hydrophila*, *A. caviae*, *A. sobria* und *A. veronii* sowie je 4 Salmonellen und *E. coli*.



**Abb. 1** Qualitative Untersuchung von Lebensmitteln auf virulente *Vibrio parahaemolyticus*.

Tab. 1 Real-Time PCR zum Nachweis von *Vibrio parahaemolyticus* aus der Literatur.

Zielgen	PCR-Primer (5' - 3')	Sonde (5' - 3')	Sensitivität (KBE/g)	Literatur
<i>tdh</i>	GGTAAATGGCTGACATC	SYBR Green (251bp; T <sub>m</sub> : 80,4 °C)	10 <sup>4,7</sup> (100 nach Anreicherung) 5340	Fukushima et al. (2003)
	CCACTACACTCTCATATGC			
	CATCTCGTAGCGTTTCTTTTACA			
	TCTGTCCCTTTTCCGTGCC			
	CATCTGCTTTTGAGCTCCATCT	FAM-TCTCCAAACAACAACAATATCTCATCAGAACCG-BHQ1	nb	Iijima et al. (2004)
	CTCGAACAAACAACAATATCTCATCA	FAM-TCCCTTTCTCTGCCCGGTT-TAMRA	10 <sup>3</sup>	Ward et al. (2006)
	GTARAGTCTCTGACTTTTGGAC	CY5-ATTTTACGAACACAGCACAATCA-Iowa Black-RQ		
	CTACAGAATYATAGGAATGTTGAAG			
<i>trh</i>	GGCTCAAAATGGTTAAGCG	SYBR Green (250 bp; T <sub>m</sub> : 79,6 °C)	10 <sup>4,7</sup> (100 nach Anreicherung) 5340	Fukushima et al. (2003)
	CATTTCCGCTCATATGC	FAM-ACGCCAGAAATATTTCTGTAATGTCGAAGC-BHQ1	10 <sup>3</sup>	Davis et al. (2004)
	GCCAAGTGAACGATTTGGATGA	TEF-TATTTGTGTGTAGAAATACAAAT-BHQ1		Ward et al. (2006)
	TGCCATTTCGGCTCTCA			
<i>tli</i>	CCATCMATACCTTTTCCCTCTCC	FAM-TCGCCGCTGACAATCGCTTCTCAT-BHQ1	5340	Davis et al. (2004)
	ACYGTCATATAGGCGCTTAAC	FAM-CGCTCGCGTTCACGAAACCG-QSY7	10 <sup>2,11</sup> -10 <sup>4,77</sup>	Kaufman et al. (2004)
	CGAAGCGAGACATTACGTTT	TexR-AAGAACTTCATGTTGATGACACT-BHQ2	10 <sup>4</sup>	Ward et al. (2006)
	TGCTCCAGATCGTGGTTG	ROX-TTGCTGTTGTTGGATGCGTGACATT-BHQ2	10 <sup>3</sup>	Rizvi et al. (2006)
<i>toxR</i>	AACTTCTGCGCCCGAAGAG	FAM-CCCTAGCTTAAGCACCATGCGAAGACTC-TAMRA	nb	Iijima et al. (2004)
	CGGTGATGTCCAAACAAGGA	VIC-AAAGCACCTGTGGCTTCTGCTG-TAMRA	36, >100 (Muscheln)	Takahashi et al. (2005)
	AAAGCGGATATGCAAGGACTG	FAM-AAGCCATTAAACAGTTGAAGGCTTGACT-BHQ1	10 <sup>4</sup>	Ward et al. (2006)
	AAAGCGGATATGCAAGGACTG	FAM-AAGCCATTAAACAGTTGAAGGCTTGACT-BHQ1	10 <sup>3</sup>	Rizvi et al. (2006)
ORF8	GCTACTTTCTAGCATTTCCTC			
	GCTACTTTCTAGCATTTCCTC			
	GCTACTTTCTAGCATTTCCTC			
	GCTACTTTCTAGCATTTCCTC			
ORF8	AGGACCCAGTTACGCTTGATG			
	CTAACGCCATTGCCCTTTGTAG			
	AGGACCCAGTTACGCTTGATG			
	CTAACGCCATTGCCCTTTGTAG			

nb: nicht bestimmt

710 verschiedene Sendungen von tiefgekühlten Fischen, Krebstieren und Muscheln wurden auf Vibrionen untersucht. Die bakteriologische Untersuchung erfolgte nach den Empfehlungen der ISO/TC34/SC9 (Abb. 1) aus je 25 g Probe, die in 225 mL alkalischem salinischem Peptonwasser (ASPW; Kaysner und DePaola, 2004) 2 min gewalkt und anschließend 6 h bei 37 °C inkubiert wurden. Frische Produkte wurden 6 h bei 41,5 °C bebrütet. Zum Nachweis von *V. parahaemolyticus* wurde eine Öse von der Oberfläche der Anreicherungskultur auf Thiosulphate – Citrate – Bile salts – Sucrose-Agar (TCBS-Agar) (Oxoid, Wesel) und einem 2. Selektivmedium fraktioniert ausgestrichen. Eine weitere Öse von der Oberfläche der 1. Anreicherungskultur wurde in eine 2. ASPW-Anreicherungskultur von 10 mL überimpft und 18 h bei 41,5 °C bebrütet. Nach dieser Inkubation erfolgte eine Subkultur von der Oberfläche der 2. Anreicherungskultur auf TCBS-Agar und einem 2. Selektivmedium. Die phänotypische Bestätigung präsumtiver *V. parahaemolyticus* erfolgte nach Elliot et al. (1995) und Farmer et al. (2003). Für Hinweise auf die Virulenzfaktoren TDH und TRH wurden die bestätigten *Vibrio parahaemolyticus* auf Wagatsuma-Agar und Urease-Bouillon bebrütet (Elliot et al., 1995).

## 2.2 PCR-Nachweis von virulenten *V. parahaemolyticus*

Zum Nachweis von virulenten *V. parahaemolyticus* wurde ein 253 bp großes Fragment des *tdh*-Gen amplifiziert. Dazu wurde die Bakterien-DNA einer Einzelkolonie oder der Anreicherungskultur mittels des InstaGene-Reagenz nach den Angaben des Herstellers angereichert (Bio-Rad, München). Die PCR wurde in einem Volumen von 25 µL mit 0,5 µL Bakterienlysat, je 10 pmol Primer (synthetisiert durch MWG Biotech, Ebersberg), 200 µM dNTP, 1 U klonierter *Thermus aquaticus* DNA-Polymerase (Q-Biogene, Heidelberg), deren Reaktionspuffer und 2 mM MgCl<sub>2</sub> durchgeführt. Als Primer wurden *tdh*-Start (5'-GCT TCC ATC TGT CCC TTT TCC TGC-3') und *tdh*-Ende (5'-GCC AGA CAC CGC TGC CAT TG-3') eingesetzt. Die Amplifikation erfolgte nach einer initiellen Hitzedenaturierung der DNA für 20 s bei 94 °C. Anschließend wurde die Denaturierung bei 92 °C für 20 s durchgeführt. Die Anlagerung der Primer und die Vervielfältigung des Fragments erfolgte bei 68 °C für 25 s. Die Amplifikation umfasste 35 Zyklen. Der letzte Polymerisationschritt wurde um 2 min verlängert. Die Amplifikation eines 258 bp *trh*-Fragments mit je 50 pmol der Primer *trh*-Start (5'-GGY TCA AAR TGG TTA AGC GCC TAT AKR AG-3') und *trh*-Ende (5'-CAT ATG YCC ATT KCC GCT CTC ATA TGC-3') und 5 mM Magnesiumchlorid wurde in gleicher Weise wie beim *tdh*-Produkt durchgeführt. Abweichend davon erfolgte die Anlagerung der Primer bei 42 °C für 15 s und die Polymerisation bei 72 °C für 20 s. Die Differenzierung der *trh*-Varianten erfolgte mit 17,5 µL des PCR-Produkts, 2 µL 10 × Restriktionsenzym-puffer M und 0,5 µL (U) des Restriktionsenzym *Hae*III (Amersham, Freiburg). Nach zweistündiger Inkubation bei 37 °C ergab nur das Amplifikat von *trh1* Subfragmente von 172 und 86 bp.

Die real-time PCR des *tdh*-Fragments von *V. parahaemolyticus* erfolgte mit den oben beschriebenen Primern *tdh*-Start und -Ende sowie 5 mM Magnesiumchlorid nach der Hitzedenaturierung der DNA für 20 s bei 92 °C, der Anlagerung der Primer bei 58 °C für 10 s und der anschließenden Vervielfältigung des

Fragments bei 72 °C für 15 s. Die Amplifikation umfasste 40 Zyklen. Die real-time PCR-Produkte von *tdh* wurden mit 10 pmol der Probe 5'-FAM-AAC AAC AAA CAA TAT CTC ATC AGA ACC-BHQ1-3' (synthetisiert durch MWG-Biotech) detektiert. Die real-time PCRs mit SYBR Green I für *tdh* und *trh* wurden mittels des FailSafe real-time PCR Systems (Biozym, Hessisch-Oldendorf) durchgeführt nach den oben beschriebenen klassischen PCRs. Für die Amplifikation der Fragmente von *tdh* wurde Pre-Mix E des Kits und für *trh* Pre-Mix C verwendet. Nach der PCR mit SYBR Green I wurde eine Schmelzpunktsanalyse durchgeführt. In allen hier beschriebenen real-time PCRs wurden 2 U klonierte *Thermus aquaticus* DNA-Polymerase (Q-Biogene) im 25 µL Ansatz verwendet.

## 3. Ergebnisse und Diskussion

Unter den insgesamt 44 Teststämmen wurden 12 *V. parahaemolyticus*-Stämme mittels PCR identifiziert, die ein Amplifikat von *tdh* und/oder *trh* zeigten. Von den 8 Kanagawa-positiven Isolaten konnte mittels PCR *tdh* und *trh2* detektiert werden. Je 2 weitere *V. parahaemolyticus*-Isolate zeigten PCR-Produkte von *trh1* oder *trh2*. Die Schmelztemperatur mit SYBR Green I beträgt für das *tdh*-Amplifikat 82,5 ± 0,4 °C und für das *trh*-PCR-Produkt 83,4 ± 0,4 °C. Dabei ergaben sich C<sub>t</sub>-Werte als Nachweisschwellenwerte von ≤27 real-time PCR-Zyklen für das *tdh*-Amplifikat und ≤24 Zyklen für das *trh*-Produkt. Die Nachweisgrenze lag für *tdh* bei 8 ± 6 KBE und für *trh* bei 12 ± 8 KBE im PCR-/real-time PCR-Ansatz. Mit der *tdh*-FAM-BHQ1-Probe ergab sich ein C<sub>t</sub>-Wert von ≤37 Zyklen mit einer Nachweisgrenze von 9 ± 7 KBE. Nach Einsaat und anschließender Anreicherung in ASPW konnten selbst niedrigste Einsaaten von 8 ± 6 KBE virulente *V. parahaemolyticus* in 25 g Fisch- oder Krebstiererzeugnis mittels PCR/real-time PCR nachgewiesen werden.

In 126 der 710 untersuchten Fisch- und Krebstierprodukte sowie Muscheln wurden Vibrionen detektiert. *V. parahaemolyticus* stellt mit 37 positiven Proben die häufigste Vibrionenart in dieser Lebensmittelgruppe dar. Jedoch wies keiner dieser Isolate von den Selektivnährböden und den zugehörigen 2. ASPW-Anreicherungskulturen das *tdh*- oder *trh*-Gen auf.

Neben den Virulenzgenen *tdh* (Fukushima et al., 2003; Davis et al., 2004; Iijima et al., 2006; Ward et al., 2006) und *trh* (Fukushima et al., 2003; Davis et al., 2004; Ward et al., 2006) wurden auch Gene zur Entwicklung von real-time PCR-Verfahren genutzt, die bei nahezu allen Stämmen der Art *V. parahaemolyticus* zu finden sind wie *tlh* (Davis et al., 2004; Kaufman et al., 2004; Rizvi et al., 2006; Ward et al., 2006) und *toxR* (Iijima et al., 2004; Takahashi et al., 2005). Durch diese Verfahren werden auch die wesentlich häufiger in Fischen, Krebstieren und Muscheln nachzuweisenden avirulenten Umweltisolaten von *V. parahaemolyticus* detektiert. Zum spezifischen Nachweis des pandemischen Klons des Serotyps O3:K6 wurden real-time PCR-Verfahren für den ORF8 beschrieben (Rizvi et al., 2006; Ward et al., 2006).

Das vorgestellte Untersuchungsverfahren mit Anreicherung und anschließender real-time PCR verkürzt die Untersuchungszeit um mindestens einen Tag gegenüber dem kulturellen Verfahren mit anschließend noch notwendiger Bestätigung präsumtiver *V. parahaemolyticus* und deren Viru-

lenz. Das Verfahren ist ausreichend sensitiv um Keimgehalte nachzuweisen, die geringer als die minimale Infektionsdosis von rund 1 Millionen und der Grenzwerte aus den USA, Großbritannien und den Niederlanden sind.

#### 4. Literatur

- Barker, W. H. Jr. (1974) *Vibrio parahaemolyticus* outbreaks in the United States. *Lancet* 1:551-554.
- Chatterjee, B. D., Mukherjee, A. und Sanyal, S.N. (1984) Enteroinvasive model of *Vibrio parahaemolyticus*. *Indian J Med Res* 79:151-158.
- Chowdhury, N. R., Chakraborty, S., Ramamurthy, T., Nishibuchi, M., Yamasaki, S., Takeda, Y. und Nair, G. B. (2000) Molecular evidence of clonal *Vibrio parahaemolyticus* pandemic strains. *Emerging Infectious Dis* 6:631-636.
- Davis, C. R., Heller, C. C., Peak, K. K., Wingfield, D. L., Goldstein-Hart, C. L., Bodager, D. W., Cannons, A. C., Amuso, P. T. und Cattani, J. (2004) Real-time PCR detection of the thermostable direct hemolysin and thermolabile hemolysin genes in a *Vibrio parahaemolyticus* cultured from mussels and mussel homogenate associated with a foodborne outbreak. *J Food Prot* 67:1005-1008.
- European Commission, Health and Consumer Protection Directorate-General, Directorate C (2001) Opinion of the Scientific Committee on veterinary measures relating to public health on *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus* (in raw and undercooked seafood), Brüssel.
- Fukushima, H., Tsunomori, Y. und Seki, R. (2003) Duplex real-time PCR SYBR Green PCR assay for detection of 17 species of food- or waterborne pathogens in stools. *J Clin Microbiol* 41:5134-5146.
- Farmer, J. J. (2003) *Vibrio*. In: Murray et al. (eds.) *Manual of Clinical Microbiology* (Washington D. C.: ASM Press, 8. Auflage, Vol. 1, pp. 706-718.
- ICMSF (1996) Characteristics of microbial pathogens. In: *Microorganisms in Food*. London: Blackie Academic and Professional, Vol. 5, pp. 414-439.
- Hlady, W. G. und Klontz, K. C. (1996) The epidemiology of *Vibrio* infections in Florida (1981-1993). *J Infectious Dis* 173:1176-1183.
- Iida, T. et al. (2006) *Vibrio parahaemolyticus*. In: Thompson et al. (eds.) *The Biology of Vibrios*. Washington D. C., ASM Press, pp. 340-348.
- Iijima, Y., Asako, N. T., Aihara, M. und Hayashi, K. (2004) Improvement in the detection rate of diarrhoeagenic bacteria in human stool specimens by a rapid real-time PCR assay. *J Med Microbiol* 53:617-622.
- Kaufman, G. E., Blackstone, G. M., Vickery, M. C., Bej, A. K., Bowers, M. D., Meyer, R. F. und de Paola, A. (2004) Real-time PCR quantification of *Vibrio parahaemolyticus* in oysters using an alternative matrix. *J Food Protect* 67:2424-2429.
- Kaysner, C.A. und DePaola, A.: *Vibrio*. in: *Bacteriological Analytical Manual Online*, U.S. Food and Drug Administration, Chapter 9, 1-40, 2004, <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-9.html>
- Makino, K., Oshima, K., Kurokawa, K., Yokoyama, K., Uda, T., Tagomori, K., Iijima, Y., Najima, M., Nakano, M., Yamashita, A., Kubota, Y., Kimura, S., Yasunaga, T., Honda, T., Shinagawa, H., Hattori, M. und Iida, T. (2003) Genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus*: a pathogenic mechanism distinct from that of *Vibrio cholerae*. *Lancet* 361:743-749.
- Nordic Committee on Food Analysis (1997) Pathogenic *Vibrio* species. Detection and enumeration in foods. no. 156, 2. Auflage (UDC 576.851), Annex Q.
- Okuda, J., Ishibashi, M., Abbott, S. L., Janda, J. M. und Nishibuchi, M. (1997) Analysis of the thermostable direct hemolysin (*tdh*) gene and the TDH-related hemolysin (*trh*) genes in urease-positive strains of *Vibrio parahaemolyticus* isolated on the West Coast of the United States. *J Clin Microbiol* 35:1965-1971.
- Park, K.-S., Ono, T., Rokuda, M., Jang, M. H., Okada, K., Iida, T. und Honda, T. (2004) Functional characterization of two type III secretion systems of *Vibrio parahaemolyticus*. *Infection and Immunity* 72:6659-6665.
- Rizvi, A. V. (2006) Detection of pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 serovar in Gulf of Mexico water and shellfish using real-time PCR with Taqman® fluorescent probes. *FEMS Microbiol Lett* 262:185-192.
- Takahashi, H., Iwade, Y., Konuma, H. und Hara-Kudo, Y. (2005) Development of a quantitative real-time PCR method for estimation of the total number of *Vibrio parahaemolyticus* in contaminated shellfish and seawater. *J Food Protect* 68:1083-1088.
- Ward, L. N. und Bej, A. K. (2006) Detection of *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish by use of multiplexed real-time PCR with TaqMan fluorescent probes. *Appl Environ Microbiol* 72:2031-2042.

---

To access this journal online:  
<http://www.birkhauser.ch/JVL>

---