



Norges miljø- og  
biovitenskapelige  
universitet

**Masteroppgave 2022 30 stp**

Fakultet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap (KBM)

# **Kartlegging av *Vibrio parahaemolyticus* i norske farvann, og karakterisering av virulens og antimikrobiell resistens**

Detection of *Vibrio parahaemolyticus* in the Norwegian marine environment, and characterization of virulence and antimicrobial resistance determinants

**Panida Boonyasirichai**

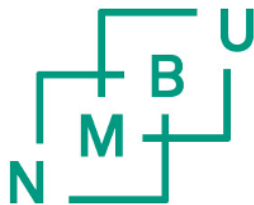
Mastergrad i matvitenskap



# Kartlegging av *Vibrio parahaemolyticus* i norske farvann, og karakterisering av virulens og antimikrobiell resistens

Panida Boonyasirichai

Mastergrad i matvitenskap  
Mai 2022



Norges miljø- og  
biovitenskapelige  
universitet



# Forord

Arbeidet med denne masteroppgaven kombinerer kunnskap og læring fra to års studier ved Norges miljø- og biovitenskapelige universitet (NMBU), fakultet for kjemi, biovitenskap og matvitenskap (KBM). Masterprogrammet i matvitenskap har gitt meg en bred forståelse av viktigheten av mattrygghet og forebygging av sykdommer forårsaket av matbårne bakterier.

Samarbeidet med Havforskningsinstituttet har gitt meg en unik mulighet til å fordype meg i problemstillingen om sjømattrygghet og forekomsten av *Vibrio*-bakterier i norske farvann. Det å få arbeide med dette temaet har vært en svært lærerik prosess, og ikke minst et tema som jeg virkelig har hatt et stort engasjement for. Det å arbeide med et så betydelig prosjekt har vært utrolig givende og stort.

Jeg ønsker å takke min hovedveileder professor Bjørn-Arne Lindstedt fra NMBU for stort engasjement og gode tilbakemeldinger. Videre vil takke min hovedveileder fra Havforskningsinstituttet Bjørn-Tore Lunestad for konkrete og konstruktive tilbakemeldinger, og for å ha gitt meg muligheten til å være en del av et så omfattende, spennende og læringsrikt forskningsprosjektet hos Havforskningsinstituttet (HI). Jeg vil takke Arne Duinker for all hjelp og engasjement under prøvetakning, kunnskapen om makroalger og toskallede bløtdyr og for å ha laget Norgeskart. Det å skrive en masteroppgave har vært en omfattende og krevende prosess. Jeg vil dermed rette en spesiell takk til mine to veiledere fra HI, Fredrik Håkonsholm og Didrik Hjertaker Grevskott for verdifull hjelp på laben, inkludert råd og god veiledning av faglig kunnskap. Til slutt vil jeg takke samboeren min for all hjelp og støttet jeg fikk.

Norges miljø- og biovitenskapelige Universitet, Oslo, mai 2022

Panida Boonyasirichai

# Abstract

**Background:** An increase in the incidence of pathogenic *Vibrio* bacteria is expected in Nordic waters as a result of global warming. *Vibrio*-bacteria can cause infections that in some cases require treatment with antibiotics. Knowledge of antimicrobial-resistance among these bacteria is therefore important. The spread of antimicrobial resistance (AMR) is relatively well understood in clinical contexts, but the role of the aquatic environment in the spread of AMR is still largely unknown. The aquatic environment can be a place for the development and spread of AMR. It is a comprehensive process to understand and thus requires scientific knowledge across disciplines for the fight against the development and spread of AMR in different environments. Determination of AMR among bacterial strains is necessary to monitor changes in bacterial susceptibility to antibiotics.

**Purpose:** This study aims to investigate the occurrences of *V. parahaemolyticus* and the characterization of virulence and the AMR in these bacteria extracted from mussels, seaweed, and seawater collected from Norway's eastern and western coasts.

**Materials and methods:** A total of 6 samples of 72 mussels (*Mytilus edulis*), and 6 samples of 600 grams of bladderwrack seaweed (*Fucus vesiculosus*) were examined by the Most probable number method (MPN) for enumeration of *E. coli*, and *Vibrio* bacteria according to NMKL method 156 1997. 6 samples of 3000 ml seawater were examined for the presence of thermotolerant coliform bacteria and *Vibrio* spp. The bacterial isolates were identified by Gram and oxidase testing, API 20E and MALDI-TOF MS. In addition, the bacterial isolates were tested for antibiotic sensitivity and determination of hemolysis activity.

**Results:** In the *Vibrio* method, 113 colonies were isolated from mussels, seaweed, and seawater. A total of 38 colonies were identified using MALDI-TOF. Ten strains were identified as *V. parahaemolyticus*. Bacterial isolates were Gram-negative and oxidase positive. Furthermore, no  $\beta$ -hemolysis was detected in all isolated *V. parahaemolyticus*. All bacterial isolates were sensitive to the 12 different antibiotics tested for in this study.

**Conclusion:** The main findings in this study show that *V. parahaemolyticus* isolated from mussels, seaweed, and seawater is generally sensitive to antibiotics. This study further shows that the incidence of *V. parahaemolyticus* in seafood is low and there is an absence of hemolysis. Given that climate change is likely to increase the incidence of the human pathogenic *Vibrio*, more frequent monitoring of the incidence, resistance, and virulence of *Vibrio* bacteria is necessary to prepare for future public health challenges.

# Sammendrag

**Bakgrunn:** En økning i forekomst av patogene *Vibrio*-bakterier forventes i nordisk farvann som følge av global oppvarming. *Vibrio*-bakterier kan gi infeksjoner som i noen tilfeller krever behandling med antibiotika. Kunnskapen om antimikrobiell resistens blant disse bakteriene er derfor viktig. Spredningene av antimikrobiell resistens er godt forstått i klinisk sammenheng, men vannmiljøets rolle i spredningen av AMR er fortsatt ukjent. Vannmiljøet kan være et sted for utvikling og spredning av AMR. Det er en omfattende prosess å forstå og krever dermed vitenskapelig kunnskap på tvers av fagfelt for kampen mot utvikling og spredning av AMR i ulike miljøer. Bestemmelse av AMR blant bakteriestammer er nødvendig for å overvåke endringer i bakterienes følsomhet for antibiotika.

**Hensikt:** Denne studien har som mål å undersøke forekomster av *V. parahaemolyticus* og karakterisering av virulens og AMR hos disse i prøver fra blåskjell, blæretang og sjøvann som er samlet fra øst- og vestkysten av Norge.

**Materialer og metoder:** Totalt 6 prøver av 72 blåskjell (*Mytilus edulis*), 6 prøver av 600 gram blæretang (*Fucus vesiculosus*) ble undersøkt i en fem ganger tre-rørs mest sannsynlige tall metode for telling av *E. coli*, samt *Vibrio* bakterier i henhold til NMKL metode 156 1997. 6 prøver av 3000 ml sjøvann ble undersøkt med tanke på forekomsten av termotolerante koliforme bakterier og *Vibrio spp.* Bakterieisolatene ble identifisert ved hjelp av Gram- og oksidase testing, samt API 20E og MALDI-TOF MS. I tillegg ble bakterieisolatene testet for antibiotika følsomhet og bestemmelse av hemolyseaktivitet.

**Resultater:** I *Vibrio*-metoden ble det isolert 113 kolonier isolert fra blåskjell, blæretang og sjøvann. Totalt 38 ble identifisert ved hjelp av MALDI-TOF. Ti stammer ble identifisert som *V. parahaemolyticus*. Bakterieisolatene var Gram-negative og oksidasepositive. Videre ble ingen  $\beta$ -hemolyse påvist hos noen av de isolerte *V. parahaemolyticus*. Alle bakterieisolater var følsomme for de 12 forskjellige antibiotika som det ble testet for i denne studien.

**Konklusjon:** Hovedfunnene i denne studien viser at *V. parahaemolyticus* isolert fra blåskjell, blæretang og sjøvann gjennomgående er følsomme for antibiotika. Denne studien viser videre at forekomsten av *V. parahaemolyticus* i sjømat er lav og det er fravær av hemolyse hos isolatene. Gitt at klimaendringer sannsynligvis vil gi økt forekomst av det humanpatogene *Vibrio*, er hyppigere overvåking av forekomst, resistens og virulens hos *Vibrio*-bakterier nødvendig for å forberede seg på fremtidige folkehelseutfordringer.

# FORKORTELSER

**AMR** = Antimikrobiell resistens

**API** = Analytical Profile Index

**APW** = Alkalisk pepton vann

**AR** = Antibiotikaresistens

**ARG** = Antibiotikaresistensgener

**CDC** = Centers for Disease Control and Prevention

**EUCAST** = European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

**MALDI-TOF** = Massespektrometer med matriseassistert laserdesorpsjonisering

**MIC** = Minimum Inhibitory Concentration

**NMKL** = Nordisk metodikomite for næringsmidler

**NORM-VET** = Norsk overvåkingsprogram for antibiotikaresistens i mikrober fra fôr, dyr og næringsmidler

**PCA** = Plate Count Agar

**TCBS** = Tiosulfat-sitrat-gallesalt-sukrose

**TDH** = Termostabilt Direkte Hemolysin

**TRH** = TDH-Relatert Hemolysin

**VBNC** = Viable but Not Culturable

**VCS** = *Vibrio* ChromoSelect Agar

# Innholdsfortegnelse

<b>FORORD</b> .....	<b>3</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>4</b>
<b>SAMMENDRAG</b> .....	<b>5</b>
<b>FORKORTELSER</b> .....	<b>6</b>
<b>1.0 INNLEDNING</b> .....	<b>9</b>
<b>2.0 BAKGRUNN</b> .....	<b>11</b>
2.1 <i>MYTILUS EDULIS</i> OG <i>FUCUS VESICULOSUS</i> .....	11
2.1.1 <i>Mytilus edulis</i> (Blåskjell).....	11
2.1.2 <i>Fucus vesiculosus</i> (blæretang).....	12
2.2 MATTRYGGHET.....	13
2.3 <i>VIBRIO</i> -BAKTERIER OG INFEKSJONER.....	14
2.3.1 Forekomst av <i>Vibrio parahaemolyticus</i> i verden.....	15
2.4 ANTIBIOTIKARESISTENS OG <i>VIBRIO</i> -BAKTERIER.....	17
2.5 METODISK TEORI.....	18
2.5.1 MPN-metode.....	18
2.5.2 <i>Vibrio</i> -metoden.....	19
2.5.3 Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry.....	19
2.5.4 MIC (The Minimum Inhibitory Concentration).....	20
2.5.5 Analytical Profile Index 20E (API 20E).....	21
<b>3.0 METODER OG MATERIALER</b> .....	<b>22</b>
3.1 METODISK OVERSIKT.....	23
3.2 PRØVETAKING I OSLOFJORDEN OG BERGEN.....	24
3.3 BEARBEIDING AV BLÅSKJELL, BLÆRETANG OG SJØVANN.....	24
3.3.1 Blåskjell.....	24
3.2.2 Tang.....	25
3.2.3 Sjøvann.....	25
3.3 ISOLERING OG LANGTIDSLAGRING AV BAKTERIEKULTUR.....	26
3.4 KARAKTERISERING AV ISOLATER.....	26
3.4.1 Oppdyrking av sjøvann i buljong.....	26
3.4.2 MALDI-TOF.....	27
3.4.4 API.....	28
3.4.5 Hemolyseaktivitet.....	28
3.5 SENSITIVITETSTESTING FOR ANTIBIOTIKA.....	28
<b>4.0 RESULTAT</b> .....	<b>30</b>
4.1 MALDI-TOF AS.....	30
4.2 FOREKOMST AV BAKTERIER I SJØVANN.....	31
4.3 KARAKTERISERING AV ISOLATER.....	32
4.3.1 Bakterieidentitet med score-verdier fra MALDI-TOF.....	33
4.4 ANTIMIKROBIELL SENSITIVITETSTESTING.....	34
4.4.1 EUCAST-tabell for klinisk brytningspunkt.....	35
<b>5.0 DISKUSJON</b> .....	<b>36</b>
5.1 IDENTIFISERING AV <i>VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS</i> .....	36
5.1.1 Artsidentifikasjon ved MALDI-TOF og API 20E.....	36
5.2 FOREKOMST AV <i>VIBRIO SPP.</i> OG <i>E. COLI</i> I SJØVANN SAMLET FRA OSLOFJORDEN OG NORDÅSVANNET.....	38
5.3 HEMOLYSEAKTIVITET.....	40
5.4 ANTIMIKROBIELL SENSITIVITETSTESTING.....	41
<b>6.0 KONKLUSJON</b> .....	<b>44</b>
<b>7.0 FORSLAG TIL VIDERE STUDIER</b> .....	<b>45</b>
<b>8.0 LITTERATURLISTE</b> .....	<b>46</b>



<b>VEDLEGG</b> .....	<b>53</b>
<b>VEDLEGG A.</b> MOST PROBABLE NUMBER FRA BLÅSKJELL OG TANG PRØVER SAMLET I OSLOFJORDEN.....	<b>53</b>
<b>VEDLEGG B.</b> MOST PROBABLE NUMBER FRA BLÅSKJELL OG TANG PRØVER SAMLET I BERGEN (NORDÅSVANNET).....	<b>53</b>
<b>VEDLEGG C.</b> IDENTIFISERING VED MALDI-TOF.....	<b>54</b>
<b>VEDLEGG D.</b> <i>VIBRIO</i> CHROMOSELECT SKÅLER.....	<b>55</b>

## 1.0 Innledning

Befolkningsvekst gjør at vi må se etter alternative matkilder (Norges sjømatråd, 2020; Costello, C., Cao, L., Gelcich, S. et al, 2020). Sjømat, inkludert tang, skalldyr og bløtdyr er matvarer som både kan bidra til en mer bærekraftig matproduksjon og samtidig øke matsikkerheten. Derfor fremstår sjømat som en sentral ressurs for å nå ett eller flere av FNs bærekraftsmål, særlig mål nr.2 (utrydde sult), mål nr.3 (god ernæring og helse), samt mål nr.12 (ansvarlig og forsvarlig matproduksjon for bærekraftig utvikling) (FNs, 2021). Havet er derfor en kilde til både bærekraftig og næringsrik mat. Ifølge rapporten, *Verdiskaping basert på produktive hav i 2050*, fra en arbeidsgruppe oppnevnt av Det Kongelige Norske Videnskabers Selskab (DKNVS) og Norges Tekniske Vitenskapsakademi (NTVA), vil den globale etterspørselen etter akvatiske matvarer dobles innen 2050, spesielt aktuelt er økningen i produksjonen av arter som tang og blåskjell (Olafsen, T., Winther, U. et al. 2012). Disse marine artene trenger ikke næringsstoffer i form av fôrforsyninger, og de har liten miljøbelastning fordi de befinner seg lenger ned i næringskjeden.

Det er imidlertid noen utfordringer i akvatiske matproduksjon. De siste årene har temperaturen steget betydelig på grunn av global oppvarming (Semenza, J. C., et al. 2017). Økningen i vanntemperaturer har ført til en økning i forekomst av sykdomsfremkallende bakterier i sjøvann i områder som før hadde lite eller ingen forekomst (King, N. et al. 2018). Dette påvirker sjømattryggheten da disse bakteriene kan forårsake alvorlige infeksjoner. Spesiell oppmerksomhet rettes mot naturlig forekommende og- eller fekale forurensingsbakterier. Disse bakteriene forurenses sjømat gjennom å infisere overflate- og/eller tarmen til marine organismer. Det finnes en rekke bakterier som er sykdomsfremkallende for mennesker fra sjømat. Eksempler på dette er: *Bacillus*, *Campylobacter*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* samt *Vibrio vulnificus*. Kunnskapen rundt den mulige risikoen ved å konsumere sjømat er derfor viktig (Iwamoto, M., et al. 2010; Letchumanan, V. et al. 2014).

Innenfor slekten *Vibrio* er rundt 12 arter som er rapportert å kunne gi sykdom hos mennesker (Baker-Austin, C. et al., 2018). Disse inkluderer *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae*, *V. vulnificus* samt *V. alginolyticus* som er de viktigste humanpatogenene. De siste årene har den betydelige økningen i *V. parahaemolyticus* blitt anerkjent som den ledende årsaken til matbårne sykdommer knyttet til sjømat over hele verden (Mahmud, H. Z., Neogi, B. S., et al.,

2007; King, N. MacCoubrey, J. D. & Cressey, P., 2018; FAO&WHO, 2021; Løvdal, T. et al. 2021). Disse bakteriene finnes naturlig i sjøvann, brakkvann- og/eller hos marin fisk, tang og skalldyr (Joseph, S. W. 1982; Daniels, N. A., et al. 2000). Tidligere ble bakterien hovedsakelig funnet i tempererte områder som Asia og USA, men de seneste årene har *V. parahaemolyticus* populasjonene også økt betydelig på kaldere steder som Alaska, Chile og New Zealand. Dette vekker bekymring internasjonalt da dette tyder at økende vanntemperaturer vil føre til hyppigere tilfeller av *V. parahaemolyticus* (FHI, 2019). I Norge har vi allerede fått erfare resultatet av høyere vanntemperaturer da det sommeren 2018 ble det rapport om flere *Vibrio*-infeksjoner etter bading i Oslofjorden, Telemark, og på Sørlandet. Totalt 8 personer hadde alvorlige infeksjoner, og 50 personer hadde milde tilfeller av sår- og øreinfeksjoner.

Et annet bekymringsmoment som kan utgjøre en utfordring innen medisin og i næringsmiddelindustrien, er den økende forekomsten av antimikrobiell resistens (AMR) hos *V. parahaemolyticus* (Lopatek, M. et al 2018; Martinez J. L. 2009). Den økende forekomsten av resistente bakterier er et alvorlig globalt helseproblem. Antibiotikaresistente bakterier blant humanpatogener utgjør en stor trussel mot mattrygghet og folkehelsen. Utviklingen av antibiotikaresistens er et problem i land der antibiotika er mye brukt til mennesker, landbruk og akvakultur. I Norge er ikke dette et problem, da bruken av antibiotika er mer spesifikk for behandling av infeksjoner og sykdommer (NORM/NORM-VET, 2020). I tillegg har Norge som mål å redusere bruken av antibiotika både i klinisk- og veterinærmedisin. I 2020 er bruken av antibiotika til husdyr på 5 tonn, hvorav 0,2 tonn brukes til fiskeoppdrett, noe som er svært lavt sammenlignet med land som USA (Tronsmo, A. 2016). I USA er bruken av antibiotika betydelig høyere enn Europa, fordi antibiotika brukes både på syke og friske dyr. Det siste skyldes blant annet at stoffene også benyttes som vekstfremmere hos husdyr, noe som er forbudt i Europa.

På grunn av overforbruk av antibiotika til mennesker- og husdyr, har noen antibiotika mistet sin effektivitet i behandling av infeksjoner (Cassini, A., et al., 2019). Ifølge European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net) som undersøkte dødsfall i Europa fra 2015, ble det funnet at 33 000 dødsfall hos mennesker var forårsaket av antibiotikaresistente bakterier. Generelt er *Vibrio*-bakterier kjent for å være følsomme for de fleste antibiotika som brukes klinisk (Letchumanan et al. 2015). Derimot vil stadig mer eksponering av antimikrobielle midler (AM) og antibiotikaresistente bakterier i det marine

miljøet føre til mindre effektivitet av antibiotikabehandling. Selv om antibiotikabruken i Norge er svært lavt, kan det fortsatt føre til et problem da *Vibrio*-bakterier stadig blir eksponert for AM gjennom utslipp fra avløpsvann til det marine miljøet (NORM/NORM-VET, 2020; Tronsmo, A. 2016). Over tid kan dette føre til at *Vibrio*-bakterier blir resistente mot antimikrobielle behandling. Kartleggingen av både *Vibrio*-bakterier og deres AMR i Norge blir derfor svært viktig om vi ønsker å utnytte ressursene langs norskekysten og sikre at fremtidige generasjoner har effektiv antibiotikabehandling mot infeksjoner.

Kartleggingen er spesielt aktuell for toskallede bløtdyr, da de befinner seg i områder der fekale forurensing og videre eksponering av AM i marine miljøer kan forekomme (Walker, D., et al. 2020). *Escherichia coli* (*E. coli*) brukes ofte for å bestemme forurensningsnivået i muslinger som vokser langs norskekysten. Til dags dato er det ikke funnet noen sammenheng mellom fekal forurensing og økning i *Vibrio*-populasjoner, ettersom *Vibrio spp.* forekommer naturlig i vannmiljøer (Løvdal, T., Lunestad, B. T. et al. 2021). Det betyr at påvisning av *Vibrio spp.* i skjell, tang og sjøvann ikke nødvendigvis betyr det er forårsaket av fekal forurensing. Arbeidet i denne oppgaven har ambisjon om å øke kunnskapen om fekale forurensningsbakterier kan føre til AMR i *Vibrio*-populasjoner i både blåskjell og blæretang.

## 2.0 Bakgrunn

### 2.1 *Mytilus edulis* og *Fucus vesiculosus*

#### 2.1.1 *Mytilus edulis* (Blåskjell)

Blåskjelloppdrett har lenge vært en næring i Norge (Fiskeridirektoratet. 2021). Av 2071 tonn med skalldyr som ble solgt i 2020, var 2033 tonn blåskjell. Blåskjell (*Mytilus edulis*) er en av de mest tallrike skalldyrartene i Norge. De er utbredt over store deler av norskekysten, dermed har blåskjell vært hyppig studert (Mok, J. S., Ryu, A. et al., 2019). Blåskjell er godt egnet for overvåking av kystmiljøer og er «filter-feeders». Dette er fordi blåskjell filtrerer vann og er i stand til å gjenspeile miljøpåvirkningen av vannmasser på bestemt steder i løpet av livssyklusen. Blåskjell har to skall holdt sammen av adduktormuskelen. Gjellene er nyttig for respirasjon og fôropptak. Denne mekanismen benyttes til å fange partiklene fra vannmassen og transportere disse til fordøyelseskanalen. Blåskjell forekommer ofte i stort antall i tidevannssonen, men forekommer også under tidevannssonen. De som lever i tidevannssonen, er svært tolerant for miljøendringer som temperaturer og saltholdighet. Et

voksant blåskjell kan filtrere fra 12-240 liter sjøvann per dag (Lunestad, B. T., Frantzen, S. et al., 2016). I tillegg er de lite kresne på ernæring, så de er tilbøyelige til å få i seg både sykdomsfremkallende- og resistente bakterier fra vannmassen (Grevskott, D. H. et al. 2017). I midlertider kan mikrobielle samfunnene i kystmiljøer påvirkes av kloakkutslipp fra land som inneholder både fekale bakterier og rester av antimikrobiell midler. Disse faktorene kan dermed bidra til utvikling og spredning av antibiotikaresistente bakterier (AB) via kloakk til marinemiljøer. Blåskjell kan muligens fungere som et hotspot for resistente bakterier ved at de kan filtrere ut resistente bakterier i det marine miljøet. Spesielle bekymringer er knyttet til områder som brukes til matproduksjon og badeaktiviteter. Både hyppigheten og filtreringskapasitet til blåskjell, gjør blåskjell til en god indikator på forurensning med patogene bakterier og utvikling av resistente bakterier i marine miljøer (Burge, A. C., Closek, J. C. et al., 2016).

### 2.1.2 *Fucus vesiculosus* (blæretang)

Makroalger er en mangfoldig gruppe av alger som vokser i salt- og ferskvannsmiljøer. Makroalger er definert som flercellede planter, og disse deles inn i tre forskjellige arter. Disse inkluderer rødalger (Rhodophyta), brunalger (Phaeophyta) og grønnalger (Chlorophyta). Norge har gode forutsetninger for produksjon av tang, på grunn av de naturgitte forhold (Olafsen, T., Winther, U. et al. 2012). Globalt dyrkes rundt 15,8 millioner tonn tang, hvorav 1,1 millioner tonn ble høstet i 2011 til blant annet mat, fôr, kjemikalier og gjødsel. 90 prosent av tangproduksjonen foregår i Asia, i land som Kina, Filippinene, Korea og Japan. Tang er en utbredt matressurs, særlig i Sørøst-Asia. I de siste årene har derimot bruken av tang som mat også vært økende i den vestlige verden (Løvdal, T., Lunestad, B. T. et al. 2021).

Blæretang, også kjent som *Fucus vesiculosus*, er mye utbredt i Nord-Europa, også i Norge (Duinker, A. Roiha, S. I., Amlund, H. et al., 2016). Den mikrobielle sammensetningen relatert til tang vil variere fra ulike arter, sjøvannsområder samt årstid (Løvdal, T., Lunestad, B. T. et al. 2021). Per i dag finnes begrenset informasjon om forekomsten av humanpatogene relatert til tang. Kunnskapen om humanpatogener assosiert med tang er viktig med tanke på at tangindustrien forventes å øke i skala frem mot 2050 (Olafsen, T., Winther, U. et al. 2012). Denne økningen skyldes hovedsakelig den raskt økende verdensbefolkningen, og av denne grunn et økt behov for næringsrike kilder til mat. Derfor vil det være svært nyttig for

sjømatikkerhet og folkehelse å forstå de potensielle risikoene ved å konsumere tang fra forurensede områder. Per nå er matforgiftning fra *Vibrio*-bakterier relatert til tang sjelden, mens matforgiftning fra skjell og fisk er mer vanlig (Løvdal, T., Lunestad, B. T. et al. 2021).

I likhet med toskallede bløtdyr er tang utbredt langs kystene (Mahmud, H. Z., Neogi, B. S., et al., 2007). Kystmiljøer kan bli påvirket av utslipp av avløpsvann fra land som kan inneholde fekale bakterier og rester av antimikrobielle stoffer (Martinez J. L. 2009). Dette kan påvirke den mikrobielle sammensetningen, særlig på overflater. Bakteriene som koloniserer overflaten av tang er hovedsakelig arter som hører naturlig hjemme i økosystemene der tangen vokser, som for eksempel *Vibrio*-bakterier. Det er derfor ingen overraskelse at *Vibrio*-bakterier finnes i tang. I tillegg kan overflater inneholde store mengder mikroorganismer fra fekale forurensing. Videre danner disse bakteriene en såkalt biofilm (Egan, S. et al. 2013; Sharma, D. Misba, L. et al. 2019).

Biofilmer kan være komplekse miljøer for mange forskjellige mikrober. Disse bakteriene lever gjerne i ekstracellulære polymere stoffer, som vanligvis består av proteiner og polysakkarider. Overflaten er derfor et viktig mikrobielt habitat, der mikroorganismer kan lett kan feste seg på. Polysakkarider er komponenter i algecellevegger, og er viktige for bakteriell kolonisering. Celleveggen kan dermed utgjøre næringsrikt miljø for bakterier, som er i stand til å utnytte denne næringskilden (Egan, S. et al. 2013; Mahmud, H. Z., Neogi, B. S., et al., 2007). Andre faktorer som kan bidra til økt bakteriell kolonisering av algeoverflater er sjøvannstemperatur. Høyere sjøtemperaturer kan påvirke mattrygghet og risikoen forbundet med inntak av tang på visse tider av året. I tillegg kan komponenter i tangens cellevegger fungere som reservoar for *Vibrio spp.* gjennom hele året. På den annen side har makroalger unike biologiske egenskaper sammenlignet med muslinger. Dette gjør det interessant å sammenligne forekomsten av *V. parahaemolyticus* isolert fra *Mytilus edulis* (blåskjell) og *Fucus vesiculosus* (blæretang).

## 2.2 Mattrygghet

Sjømat er en viktig del av et sunt kosthold, men inntak av sjømat er ikke uten risiko, gitt at bakterier allerede kan trives under høstingsprosessen (Adams, M. R., et al. 2008; Iwamoto, M., et al. 2010; King, N. et al. 2018; Lopatek, M. et al. 2018). Dette har vist seg som et problem, ettersom høyere havtemperaturer kan være årsaken til at matbårne infeksjoner forekommer hyppigere og øker år for år rundt om i verden.

I de fleste tilfeller har ikke mikrober en merkbar effekt når maten ble spist (Adams, M. R., et al. 2008; Løvdal, T. et al. 2021). Noen mikrober kan imidlertid forårsake skade ved forringelse av matvarer eller forårsake infeksjoner hos mennesker. Matforgiftning er en samlebetegnelse for overførbare næringsmiddelbårne sykdommer, og deles vanligvis inn i infeksjoner og intoksikasjoner forårsaket av bakterier, giftstoffer, parasitter og virus (Granum, P. E., 2015). Bakterier deles inn i gruppe 1-5 etter læreboken til Per Einar Granum (Matforgiftning - Smitte gjennom mat og vann). Bakterielle infeksjoner er sykdommer som oppstår når mat inneholder levende patogene bakterier (Gruppe 2-5). Bakterielle intoksikasjoner er sykdommer som oppstår ved inntak av matvarer som inneholder giftstoffer produsert av visse bakteriearter når de vokser såkalt preformerte toksiner (gruppe 1). *V. parahaemolyticus* er definert i gruppe 4 som hovedsakelig forårsaker lokale infeksjoner i tarmen. Bakterier i denne gruppen produserer også ett eller flere enterotoksiner, som for eksempel cytotoksiner.

Skalldyr er en velkjent matvare som er spesielt utsatt for bakterier og giftstoffer, i varmere farvann kan forurenset vann inneholde *V. parahaemolyticus* i tarmen hos skalldyr (Adams, M. R. et al. 2008; Granum, P. E. 2015). Enterotoksin er protein-toksiner som visse bakterier har evnen til å utskille i tarmen. Dette giftstoffet forårsaker betennelse i slimhinnen i tarmen og kroppens immunsystem, og gir symptomer som oppkast og diarè. Eksempler på bakterier som kan produsere enterotoksiner, er *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae*, *E. coli (ETEC)* og *Clostridium perfringens*.

### 2.3 *Vibrio*-bakterier og infeksjoner

*Vibrio*-artene hører hjemme i familien *Vibrionaceae*, og disse artene forekommer i marine og/eller brakkvannsområder (Huss, H. H., et al., 2003; Løvdal, T., Lunestad, B. T. et al. 2021). Siden deres naturlige habitat er det marine miljøet, kan de isoleres fra alger og skalldyr (Baker-Austin, C. et al. 2018). Tilstedeværelsen av disse bakteriene påvirkes av mange faktorer, som temperatur, saltholdighet og algetetthet. Det kan være genetiske forskjeller mellom humanpatogene arter, men felles for disse er at de foretrekker NaCl for vekst og er et obligatorisk krav for mange artene. De foretrekker varmere sjøvann, og de fleste *Vibrio*-arter er oksidasepositive og fakultative anaerobe (Håkonsholm, F., et al. 2021). Menneskelig patogener har sterkt sesongvariasjon, og øker i antall når temperaturen stiger over 18 °C og saltinnholdet (saliniteten) er under 25%.

Humanpatogene bakterier i slekten *Vibrio*, som *V. cholerae* og *V. parahaemolyticus* har tidligere vært årsaken til pandemier (Granum, P. E. 2015; Chowdhury, N. R., et al. 2000). Disse artene har spesielle gener kalt virulensgener, som begge forårsaker alvorlig gastroenteritt og har vært knyttet til vann- og matbårne sykdommer. Historisk har *V. cholerae* forårsaket flere epidemier assosiert med virulensgener som koder for koleratoksinet (CTX). Det er mer enn 200 serogrupper av *V. cholerae*, hvorav serotypene O1 og O139 har forårsaket koleratilfeller over hele verden. Serogruppe O1 består av to biotyper kalt klassisk og El Tor, basert på fenotypiske egenskaper. Vanligvis er sykdomsforløpet forårsaker av *Vibrio*-bakterier selvbegrensende og antibiotikabehandling er i de fleste tilfeller ikke nødvendig. *Vibrio* kan imidlertid forårsake sepsis som kan være livstruende selv uten underliggende medisinske tilstander. *V. cholerae* kan forårsake kolera, en alvorlig diaré sykdom og kan være dødelig hvis den ikke behandles. *V. cholerae* spres vanligvis gjennom forurenset vann (Granum, P. E. 2015). Dette var tilfellet da Haiti ble rammet av et stort jordskjelv i 2010. Jordskjelvet forårsaket store skader på infrastruktur, som inkluderte skader på kloakk- og avløpssystemene og gav mangelen på rent drikkevann. Etter jordskjelvet i 2010 brøt det ut et massivt kolerautbrudd i Haiti på grunn av at en stor del av befolkningen ikke hadde tilgang til rent vann og gode sanitærforhold. Som et resultat kom mer enn halvparten av verdens rapporterte koleratilfellene i 2010 og 2011 fra Haiti.

Et viktig aspekt ved *V. cholerae* og *V. parahaemolyticus* som skiller dem ut fra andre *Vibrio* spp. er deres evne til å spre seg under pandemier. Det er ikke klart hvorfor bestemte stammer kan få fotfeste i bestemte områder og forårsake utbrudd. Spesifikke stammer som *V. cholerae* El Tor og *V. parahaemolyticus* O3:K6 har skapt et konkurransefortrinn som kan initiere og opprettholde store utbrudd som kan føre til pandemisk utvidelse.

### 2.3.1 Forekomst av *Vibrio parahaemolyticus* i verden

*V. parahaemolyticus* forekommer i kyst- og brakkvann (Granum, P. E., 2015; Alipour, M., et al. 2014). Bakteriene finnes i bunnsedimentet og tarmene hos marine organismer. *V. parahaemolyticus* krever tilstedeværelse av en saltholdighet på 1-3% for best mulig overlevelse. Reproduksjonsnivå er nivåer på 0,8-3%, som vanligvis finnes i marine miljøer. Som andre *Vibrio*-bakterier skyldes sykdom forårsaket av *V. parahaemolyticus* vanligvis inntak av marine matvarer som fisk og skjell. Derfor er infeksjon med denne bakterien hovedsakelig relatert til rekontaminering, eller feil håndtering av sjømat.



En rekke virulensfaktorer antas å spille en rolle i patogensiteten til *V. parahaemolyticus*, inkludert de som er relatert til  $\beta$ -hemolyse, adhesjonsfaktorer, ulike enzymer og produksjon av *tdh*-, *trh*- og urease genene (Drake, S. L., et al. 2007). *V. parahaemolyticus* fermenterer glukose uten gassproduksjon og er oksidase positiv. Urease produksjon er avhengig av stamme og serotype.

*V. parahaemolyticus* ble for første beskrevet som årsak til matforgiftning fra Japan i 1951 (Letchumanan, V. et al. 2014; Granum, P. E., 2015). Dette førte til 20 dødsfall, og ytterligere 272 personer ble syke. Data fra CDC (Centers for Disease Control and Prevention) indikerte at *V. parahaemolyticus* var den vanligste patogene bakterien i sjømat i løpet av 1996-2010 (Newton, A., Kendall, M., et al. 2012). På begynnelsen av 2000-tallet, var *V. parahaemolyticus* den bakterien med størst økning i forekomsten av alle matbårne infeksjoner knyttet til sjømat.

Før 1970 tallet var rapporter om *V. parahaemolyticus*-infeksjoner hovedsakelig fra Øst-Asia, særlig Japan (Su, Y. C., & Liu, C. 2007; Letchumanan, V. et al. 2014). Av alle rapporterte tilfeller i Japan så var 20-30% matforgiftningstilfeller med *V. parahaemolyticus*. Årsaken til det høye antallet smittede kan ha en sammenheng med det tradisjonelle inntaket av rå fisk i Japan. (Baker-Austin et al., 2018; Joseph et al., 1982; Martinez-Urtaza, J. et al. 2004; King, N. et al. 2018). Den geografiske utbredelsen av *V. parahaemolyticus* har økt betydelig siden 1970-tallet, med flere tilfeller rapportert i Europa, Afrika, New Zealand og en rekke asiatiske land. Derfor er den globale økningen av *V. parahaemolyticus* i ferd med å bli en alvorlig sjømatbåren sykdom og et globalt folkehelseproblem. Enkeltilfeller med infeksjoner forårsaket av denne bakterien skjer som oftest om sommeren (Martinez-Urtaza, J. et al. 2018; Nair, G. B., et al. 2007). *V. parahaemolyticus* har så langt vært sjelden, med kun sporadiske tilfeller i Europa, med unntak av Spania. I land som Kina, India og Japan samt andre asiatiske land er det derimot stadig mer vanlig med utbrudd av *V. parahaemolyticus*.

Selv om *Vibrio*-bakteriene er en av de vanligste sjømatbakteriene i verden, meldte ikke Norge om innenlandssmitte med *Vibrio*-bakterier før i 2019. Det europeiske smittevernensenterets (ECDC) overvåker kun tilstedeværelse av *Vibrio* i Nord-Europa, men ikke antall infeksjonstilfeller (Semenza, J. C., et al. 2017). Det lave antallet tilfeller av *Vibrio*-infeksjoner i Europa sammenlignet med Asia og USA kan forklare mangelen på datainnsamling om den historiske utviklingen av *V. parahaemolyticus*. Til i dag er kliniske tilfeller forårsaket av *V.*

*parahaemolyticus* fortsatt sjeldne i Norge. I noen tilfeller har imidlertid lokal sjømat vært mistenkt som smittekilde (Bauer, A. et al. 2006). I 2006 ble *trh*<sup>+</sup> *V. parahaemolyticus* første gang påvist i norske farvann. Siden den gang er det ikke påvist sykdomsfremkallende stammer i *Vibrio*-arter i norske farvann. Dette kan imidlertid endre seg ettersom klimaforandringer kan skape gunstigere forhold for *Vibrio*-arter i nordiske farvann.

Havoverflatetemperaturen i lukkede vannmasser og elver stiger raskere på grunn av klimaendringer (Semenza, J. C., et al. 2017). Høye nivået av havoverflatetemperaturen i brakkvann gir ideelle miljømessige vekstforhold for *Vibrio*-arter. I sommermånedene kan *Vibrio* forekomme i visse regioner, spesielt der vann- og saltnivåene er moderate, som for eksempel Østersjøen. *Vibrio*-tilfeller rundt Østersjøen har vist seg å øke med havoverflatetemperaturen (Baker-Austin et al. 2012). Somrene 1994, 2003, 2006, 2010 og 2014 økte havoverflatetemperaturen i de fleste deler av Østersjøen og var assosiert med *Vibrio*-relaterte sykdom.

#### 2.4 Antibiotikaresistens og *Vibrio*-bakterier

Antimikrobielle midler (AM), som inkluderer antibiotika, er stoffer som dreper eller hemmer bakterievekst (Tronsmo, A., 2016). Antimikrobiell resistens (AMR) refererer til bakteriers evne til å utvikle motstandsdyktighet mot AM. Dette er en bekymring, spesielt hos bakterier som ofte er antibiotikafølsomme og deretter blir resistente gjennom genetisk endring. En slik resistens klassifiseres enten som naturlig eller ervervet resistens. Bakterier som er naturlig resistente mot legemidler har såkalt iboende gener. Dersom disse bakteriene utsettes for antibiotika, vil resistens økes gjennom seleksjon (Munita, J. M., & Arias, C. A. 2016). Ervervet resistens er et resultat av mutasjoner i bakteriens genetiske materiale som gjør dem resistente mot medikamenter. Sistnevnte påvirkes av antibiotikaforbruk, da bakterier vil i nærvær av antibiotikumet måtte tilpasse seg for å overleve. Som nevnt tidligere forekommer *Vibrio*-arter naturlig i vannmiljøer, så disse bakteriene er ideelle for å overvåke antimikrobiell resistens i havet (Håkonsholm, F. et al. 2021). I det naturlige miljøet kan bakteriepopulasjoner bli utsatt for ytre faktorer som kan påvirke de ville bakteriestammenes resistens til AM (Baquero, F., Martínez, J. L., & Cantón, R. 2008). For eksempel kan bakterier over tid bli eksponert for antibiotika gjennom kloakk som slippes ut i havet, noe som kan lede til bakterier kan oppnå AMR gjennom for eksempelvis horisontal genoverføring. Det marine miljøet er derfor et viktig sted for utvikling og overføring av virulens- og resistensgener fra fekalebakterier som kommer fra forurensing til marine organismer (Bennani, H., Mateus, A.

et al., 2020; Banerjee, S. K. & Farber, J. M., 2018). I naturen er det bakterier som er i stand til å produsere antibiotika i miljøet, noe som betyr at iboende resistensgener finnes i *Vibrio* (Baquero, F., Martínez, J. L., & Cantón, R. 2008). Å ha denne egenskapen kan brukes til signal- og reguleringsformål i mikrobielle samfunn, og kan fungere som en faktor som promoterer anskaffelsen av antibiotikaresistensgener. Andre bakterier i miljøet, for eksempel *Vibrio*-bakterier, kan tilegne seg fremmed DNA-materiale gjennom horisontal genoverføring. Dette er en av de viktigste drivkraft for bakteriell evolusjon, og er ofte årsaken til antimikrobiell resistens.

## 2.5 Metodisk teori

### 2.5.1 MPN-metode

Antall *E. coli* bestemmes ved en mikrobiologisk analyse basert på en flerrørs fortynningsmetode som gir det mest sannsynlig antall bakterier (MPN, Most Probable Number) i henhold til EUs referansemetode (Donovans metode, ISO 16649-3). MPN-metoden er basert på fem rør hver i tre fortynninger. Bakterieveksten vil gi gul farge i rør med vekst. Dette indikerer at bakteriene produserer gass- og syre. Fra positive rør dyrkes det videre på Tryptone Bile med X-glukuronid (TBX) agarskåler, for å bekrefte tilstedeværelse av  $\beta$ -glucuronidase produksjon.

Prinsippet for MPN-metoden er å fortynne prøven med vekstmedium Modified Glutamate Broth (MMGB) (Walker, D., et al. 2020). Denne metoden er basert på konsentrasjoner av levedyktige mikroorganismer i en gitt prøve, med flere 10 gangers fortynninger som avlesning av tilstedeværelse/fravær for hver fortykning med volumet 1 gram, 0,1 gram og 0,01 gram. Rør med positiv vekst fra MMGB-mediet tolkes enten som *E. coli*, andre koliforme organismer, eller som falsk positiv. Dette kan man sjekkes opp ved å dyrke på TBX-skåler.

Antall rør med vekst ved hver fortykning benyttes til å estimere den ufortynnede konsentrasjonen av bakterier som finnes i den opprinnelige prøven. Fortykningsrør inkuberes ved  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  i  $24 \pm 2$  timer. For å bekrefte tilstedeværelse av *E. coli* vil antall positive rør ved endringer i fargen på MMGB-mediet strykes over på TBX-agarskåler (Adams, M. R., et al. 2008). Biokjemisk fellestrekk ved *E. coli* er med tanke på  $\beta$ -glucuronidase aktivitet som produseres fra cirka 95% av *E. coli* stammer. Etter inkubasjon vil produksjon av  $\beta$ -

glucuronidase oppdages ved blå/grønn farge på kolonier. Ut fra dette kan antallet *E. coli* beregnes i henhold til MPN-tabellen.

### 2.5.2 *Vibrio*-metoden

For påvisning av *Vibrio*-arter analyseres prøver i henhold til NMKL metode nr.156 (NMKL, 1997). Denne metoden brukes i denne oppgaven til å bestemme bakterier i slekten, inkludert *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio vulnificus* samt *Vibrio alginolyticus* i blåskjell, blæretang samt sjøvannsprøver (Adams, M.R. et al. 2008). Prinsippet for metoden er basert på anrikning og oppformering i flytende selektive medier. Tiosulfat-sitrat-gallesalt-sukrose agar (TCBS) er en selektiv agar for *Vibrio*. Mediet er egnet for å isolere arter som *V. parahaemolyticus* og andre enteropatoogene *Vibrio*. *V. cholerae* kan differensieres fra *V. parahaemolyticus* og *V. vulnificus* på TCBS-skåler ved at de kan fermentere sukrose og produserer gule kolonier (Granum, P. E., 2015). *V. parahaemolyticus* og *V. vulnificus* mangler denne egenskapen, og vil dermed gi grønne kolonier. Natriumklorid stimulerer veksten til de fleste *Vibrio*-arter, og for noen arter er dette et obligatorisk krav. Flertall av *Vibrio* vokser best i alkaliske miljøer og høyt saltinnhold, denne evnen gjør dermed enklere å skille *Vibrio*-bakterier fra andre bakterier. De fleste *Vibrio*-arter vokser best i et alkalisk miljø mellom 7,5-8,5 og opptil 11 og noen kan vokse helt ned til en pH på 4,5-5,0.

### 2.5.3 Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry

Massespektrometer med matriseassistert laserdesorpsjonisering (MALDI). MALDI-TOF brukes for å identifisere bakterier og differensiere disse på artsnivå (Dieckmann, R., Strauch, E., & Alter, T. 2010). Denne metoden er mindre tidkrevende fremfor tradisjonelle metoder, som inkluderer flere biokjemiske tester. Patogene *Vibrio* kan forekomme i alle typer sjømat. Dette inkluderer blåskjell, østers, reker og ulike fiskeprodukter. Derfor er det behov for en slik rask metode for å kunne oppdage *Vibrio spp.* i sjømat, da sjømat ofte er å regne som en ferskvare. MALDI er den foretrukne metoden for å studere komplekse og store antall molekyler ved hjelp av massespektroskopi (Tronsmo, A. et al. 2016).

MALDI-TOF består av en tre-trinns prosess. Før laseren frigjør de små biomolekylene (ionene) fra bakteriene, avsettes bakteriemassen på en MALDI-TOF platen. Antallet, størrelsen og ladningen til de frigjorte ionene danner et spesifikt spektrum, det såkalte peptide

mass fingerprint (PMF). PMF er unikt for de fleste bakteriearter. Dette spekteret sammenlignes med en database med kjente bakteriespektre for å finne ut bakterienes identitet.

Bakterien blir først ionisert ved hjelp av laser og går over i gassfase (Singhal, N., Kumar, M. et al. 2015). MALDI-TOF MS “Soft ionization method” gjør at de komplette molekylære ionene forblir intakte når de ioniseres. Denne metoden benytter massespektrometri for å detektere molekylvekten til proteinfragmenter i bakterier. Bakterier identifiseres ved å sammenligne en ukjent proteinprofil med en referanseproteinprofiler lagret i databaser. Når laserstrålen vandrer gjennom vakuumkammeret, absorberer laserstrålen matrix som danne molekylmassen, samt frie ioner i vakuumet til ladede molekyler. The time of flight” (TOF) akselerer ioner i et elektrisk høyspenningsfelt og separerer ioner i forhold til deres “Masse-ladnings-forholdet” ved en bestemt tid. TOF-detektorer registrerer tiden det tar for alle ioner å nå detektoren, minste ioner vil være raskest. Bakteriefragmenter fra en prøve danner såkalte “fingeravtrykk”, som er en unik protein-profil til hver enkelt organisme/bakterie.

#### 2.5.4 MIC (*The Minimum Inhibitory Concentration*)

Antimikrobiell følsomhet kan måles med en metode som bestemmer sensitiviteten og resistensprofilen til bakterier mot ulike antibiotika. De mest kjente metodene er utarbeidet av Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), og European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Hos EUCAST oppgis en liste over kliniske MIC-brytningspunkt som kategorisere mikroorganismer enten som mottakelig eller resistente mot spesifikk antibiotika.

MIC metoden inkluderer en saltløsning med 0,85% og Mueller-Hinton buljong (MH). MH er et kommersielt medium, og er egnet til sensitivitetstesting av antibiotika. MIC er definert som den laveste konsentrasjonen av et antibiotikum som kan inhibere veksten av en bakterie, ved å observere vekst eller ikke vekst på MIC-plate. For å beregne MIC-verdien til den aktuelle bakterien, beregnes dette ut fra vekst, eller ikke vekst i de ulike brønnene, når testen utføres i buljong. Man kan da videre bestemme resistensnivå, som oppgis i mg/mL eller µl/mL. Ved resistensbestemmelse på MIC-plater, kategorisere stammene som S (Sensitiv), og R (Resistent) i henhold til EUCAST MIC-brytningspunkt tabellen (EUCAST, 2022).

### 2.5.5 Analytical Profile Index 20E (API 20E)

API 20E databasen inneholder seks arter av *Vibrio*, inkluderer *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio mimicus*, *Vibrio parahaemolyticus* og *Vibrio vulnificus*. API 20E systemet brukes til å identifisere Enterobacteriaceae og andre ikke-kresne Gramnegative bakterier (BioMérieux, 2002). Systemet består av et sett med 20 brønner av dehydrering kjemikalier. Bakteriesuspensjon inokulert i forskjellige reaksjonsbrønner. Under inkubasjon kan bakteriell metabolisme viser ved fargeendringer. Disse fargeendringene kan tolkes som spontane eller tilsetning av reagenser til brønnene (BioMérieux, 2015). Biokjemiske analyseresultater kan identifisere ved hjelp av api-web databasen som er tildelt et syvsifret nummer som brukes til å identifisere isolater.

### 3.0 Metoder og materialer

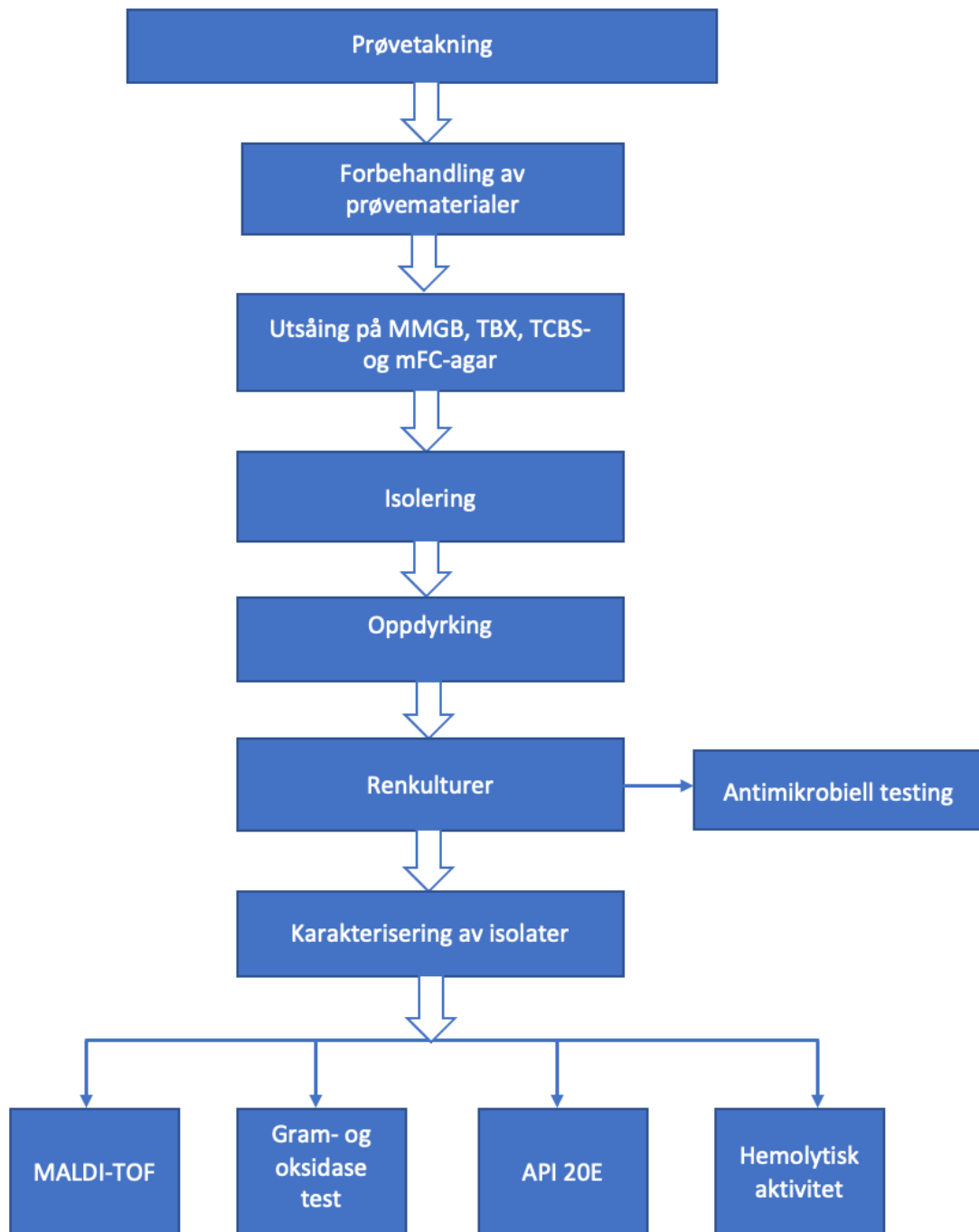
I begynnelsen av august 2021 startet prøvetaking for undersøkelsen av forekomst av *Escherichia coli* og *Vibrio*-bakterier fra blåskjell, blæretang, samt sjøvannsprøver. Innhenting av prøver ble gjennomført fra tre ulike posisjoner, men med samme lokalitet og til samme tid. For hver lokalitet, bestod de innhentede prøvene av 3 prøver à 12 blåskjell, 3 prøver à 100 gram tang, og 3 prøver à 500 ml sjøvann. Prøvematerialer ble samlet inn i to omganger fra Oslofjorden og Bergen. Totalt utgjorde innsamling av prøvematerialer fra Oslofjorden og Bergen 6 prøver av 72 blåskjell, 6 prøver av tang rundt 600 gram, samt 6 prøver av sjøvann som tilsvarer cirka 3000 ml. Første prøvetaking ble gjennomført i Oslofjorden ved Vollen i Asker, deretter ble andre prøvetaking gjennomført ved Nordåsvannet som er i Bergen. Totalt 38 bakterieisolater fra sjøvannsprøver med tanke på termotolerante koliforme og 60 isolater fra *Vibrio*-metoden. 70 isolater fra blåskjell og blæretang ble isolert med tanke på forekomst av *Vibrio*-arter og 83 isolater for *E coli*. Disse isolatene ble fryst ned for langtidslagring frem til januar 2022 for videre arbeid.



**Figur 3.0.** Prøvetakingssteder for blåskjell, blæretang og sjøvann i perioden august 2021.

### 3.1 Metodisk oversikt

Figuren 3.1 viser et flytskjema for metoder som er benyttet i denne studien.



**Figur 3.1.** Viser oversikt over skjematisk framstilling av metodene. Prøvetaking, analyse, isolering av *Vibrio* spp. renkultur, identifisering ved MALDI-TOF og karakterisering ved gram-testing, oksidase-testing, analytisk profil indeks (API) 20E, bestemmelse av hemolytisk aktivitet samt antimikrobiell sensitivitetstesting.



## 3.2 Prøvetaking i Oslofjorden og Bergen

Første prøvetakning ble utført i Oslofjorden på Vollen i Asker den 2. august 2021. Innsamling av totalt 36 blåskjell tilsvarende posisjon (A-C). Cirka 300 gram blæretang fra posisjon (AT-CT). Innsamling av sjøvannsprøver ble samlet fra tre forskjellige posisjoner (AS-CS) og tilsvarende 1500 ml. Derav AS og BS ble samlet på samme posisjon som blåskjell (A-B) og blæretang (AT-BT). Vannprøve CS ble samlet på samme posisjon som blæretang (CT), med unntak innsamling av blåskjell posisjon (C), som ble samlet alene. Under prøvetakning ble det målt sjøvannstemperatur som var 19°C for posisjon AS og BS, samt den tredje (CS) vannprøven hadde en vanntemperatur på 20°C. Etter innsamling av prøvematerialer ble disse transportert med kjøleelementer innen 24 timer til laboratorium hos Havforskningsinstituttet (HI).

Innsamling under andre prøvetaking ble utført i Bergen ved Nordåsvannet den 9. august 2021. Blåskjell, blæretang, samt sjøvannsprøver ble hentet nær Fana Kajakk-klubb. Ved innsamling av sjøvannsprøver ble det også målt en vanntemperatur på 18°C. Totalt 36 blåskjell (BA-BC), 300 gram blæretang (BAT-BCT) og 1500 ml sjøvannsprøver (BAS-BCS). Prøvematerialer ble samlet inn cirka 10-15 meter fra hver posisjon. Etter innsamling av prøvematerialer ble disse transportert direkte til kjølerom på laboratoriet hos HI.

## 3.3 Bearbeiding av blåskjell, blæretang og sjøvann

### 3.3.1 Blåskjell

Forbehandling av blåskjell inkluderte rensing i kaldt springvann, og overført til rene flater. Videre til utveiling av cirka 100 gram, som ble fordelt ut til Most Probable Number (MPN) metoden (50 gram) og *Vibrio*-metoden (20 gram x2).

Totalt 12 blåskjell ble rensert for hver prøve til minst 100 gram. Skallene ble rensert og åpnet med steril kniv, der kjøttet og væsken ble samlet i en steril pose som deretter ble homogenisert i cirka 2,5 minutter. 50 gram av den homogeniserte prøven ble tilsatt 100 ml peptone-vann (BioMèrieux, Frankrike), som videre ble homogenisert på nytt i 2,5 minutt. Deretter ble det tilsatt 350 ml peptonvann (BioMèrieux, Frankrike), til et totalt volum tilsvarende 450 ml. Videre ble prøven fortynnet til 1:10 fortynning.

10 og 1 ml fra 1:10 fortynningen ble fordelt ut til fem rør hver med 10 ml av Modified Glutamate Broth (MMGB) som vekstmedium. Videre ble 1 ml av 1:10 fortynning fordelt ut

til fem nye rør med 10 ml av MMGB. Alle rørene ble inkubert ved  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  i  $24 \pm 2$  timer. Vekst i MMGB-rørene gav fargeendring og gulfargen indikerer syreproduksjon. Fra MMGB-rørene med fargeforandring ble det strøket ut på fem sektorer per Tryptone Bile med X-glukuronid TBX-agar skåler (Oxoid, Storbritannia) for videre konfirmering. Deretter ble skålene inkubert i  $44 \pm 1^\circ\text{C}$  i  $22 \pm 2$  timer for videre bekreftelse av tilstedeværelse av  $\beta$ -glucuronidase-produksjon. Nivået av *E. coli* MPN/100 gram ble videre bestemt ved bruk av MPN-tabellen ved å telle antall blågrønne kolonier ved hver fortynning.

På nytt ble prøvene veid inn totalt 40 gram til *Vibrio*-analyse, som ble fordelt ut til to analyser, en til alkalisk peptonvann (APW) med 2% NaCl og den andre prøven til påvisning av *Vibrio parahaemolyticus* som ble beriket i APW med 2% NaCl med polymyxin B. Prøven ble homogenisert i cirka 30 minutter og tilsatt 200 ml alkalisk peptonvann med 2% NaCl og inkubert  $42 \pm 1,0^\circ\text{C}$  i  $18 \pm 2$  timer. 200mL alkalisk peptonvann med 2% salt og polymyxin B ved  $42 \pm 1,0^\circ\text{C}$  i  $18 \pm 2$  timer. Etter inkubasjon ble prøven fra alkalisk peptonvann 2% salt og andre prøven med tilsatt polymyxin B utsæd på selektivt medium Thiosulfate Citrate Bile Sucrose (TCBS) med sterile podeøser 10 $\mu$ L og strøket utover på skålene. Disse skålene ble inkubert ved  $37 \pm 1,0^\circ\text{C}$  i  $24 \pm 3$  timer.

### 3.2.2 Tang

Oslo/Bergen

Blæretang ble plukket og klippet med steril saks. Den spiselige delen ble samlet inn, og stilken ble fjernet. Innveiting av blæretang, totalt 100 gram per posisjon (AT-CT), 50 gram til MPN-metoden og (20x2 gram) til *Vibrio*-metoden. Prøven fra CT hadde lite prøvematerialet som tilsvarer 45 gram til MPN og kun 16 gram til kun alkalisk for *Vibrio*-analysen.

Prøvetaking av tang fra Nordåsvannet (BAT-BCT), lokalitet BAT, hadde lite prøvemateriale. Derav ble det veid inn kun 83 gram.

### 3.2.3 Sjøvann

Hver vannprøve ble filtrert gjennom et filter med 0,22 $\mu$ m porer ved bruk av EZ-pak membrane filters (Merck Millipore, Tyskland). For hver posisjon ble hvert filter overført til selektivt agarmedie, som TCBS-agar for *Vibrio*-analysen og m-FC agar for deteksjon og telling av fekale koliforme-bakterier.

Innsamlede prøver av sjøvann fra Oslofjorden ble fordelt på to analyser for påvisning av *Vibrio*-arter og Termotolerante koliforme bakterier. Gjennomføres ved at 1000µL sjøvann filtreres til *Vibrio*-analysen gjennom et filter med 0,22 µm porer ved bruk av EZ-pak membrane filters (Merck Millipore, Tyskland). Filteret ble overført til Thiosulfate Citrate Bile Sucrose (TCBS) agar (Oxoid, England) og inkubert ved 30°C i 24 timer. For påvisning av termotolerante koliforme bakterier ble 100 ml sjøvann filtrert gjennom et filter med 0,22µm porer. Filteret ble overført til m-FC agar (Sigma-Aldrich), og inkubert ved 44°C i 18-24 timer.

Som tidligere nevnt ble vannprøver fra Nordåsvannet samlet fra tre posisjoner (BAS-BCS), som tilsvarer mengde vann fra prøvetakning i Oslofjorden. Fra hver lokalitet ble det vannprøvene fordelt til to analyser som *Vibrio*-analysen og termotolerante koliforme bakterier. Til påvisning av *Vibrio spp.* ble sjøvann filtrert 50mL gjennom et filter med 0,22 µm porer. Ved bruk av vakuumpumpe og EZ-fit manifold 3-place system (Merck Millipore, Tyskland). Deretter ble filtret 0,22µm overført videre på tre TCBS-skåler, for hver posisjon og inkubert ved 30°C i 24 timer. For termotolerante koliforme ble sjøvann filtrert 200 ml, og inkubert ved 44°C i 18-24 time.

### 3.3 Isolering og langtidslagring av bakteriekultur

Bakteriekolonier ble blandet med 700µL med Mueller-Hinton buljong (MH-buljong, Oxoid, England) inkubert ved 37°C i 20-22 timer. Etter inkubasjonstiden var ferdig, tilsatt 200µL av 100% glyserol og lagret ved -80°C inntil januar 2022.

Nedfrysning av 98 bakterieisolatene fra sjøvann, som utgjorde 38 bakterieisolater fra termotolerante koliforme og 60 isolater fra *Vibrio*-metoden. Fra TBX-skåler ble de typiske koloniene fra blåskjell og blæretang plukket ut, og isolert til sammen 83 bakterieisolater. Rundt 70 bakterieisolater ble isolert fra TCBS-skåler for videre identifisering av *Vibrio spp.*

## 3.4 Karakterisering av Isolater

### 3.4.1 Oppdyrking av sjøvann i buljong

Totalt 113 bakterieisolater tatt opp fra langtidslagring (-80) siden august 2021, disse ble dyrket opp igjen 17 januar 2022 for identifisering av *Vibrio spp.* 60 av bakterieisolatene fra sjøvann ble fordelt til ulike 60 reagensrør og tilsatt med Mueller-Hinton Broth buljong (MH), (Oxoid, England) 5 ml per rør. 60 rør med tilsatt MH-buljong ble autoklavert i 121°C og 15 minutter. Ved bruk av pødeøse overført 1µL væsken fra Eppendorfrør med isolater over til

MH-buljong og inkubert ved  $22\pm 1$  timer  $37^{\circ}\text{C}$ . Rør med vekst strykes videre på *Vibrio* ChromoSelect agar for å oppnå renkultur (Sigma-Aldrich, Tyskland), og inkubert overnatt ved  $37^{\circ}\text{C}$ .

For isolater som hadde tett med vekst på skåler fra blåskjell og blæretang. Ble dyrket opp på nytt med Standard Plate Count agar (OXOID, England) med tilsatt ulike konsentrasjon av NaCl 2%, 4% og 6% (Merck Millipore, Danmark). Ulike saltkonsentrasjon for å hindre sverming på PCA. PCA-agar med tilsatt NaCl konsentrasjon ble autoklavert ved  $121^{\circ}\text{C}$  og 15 minutter. Deretter ble isolatene overført ved bruk av steril pøse 1  $\mu\text{l}$  strykes på PCA-skåler og inkubert overnatt.

### 3.4.2 MALDI-TOF

Identifisering av bakterieisolater ble utført ved bruk av matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) ved Havforskningsinstituttet (Bruker, Daltonics, Tyskland). Totalt 130 *Vibrio*-isolater fra blåskjell, blæretang og sjøvann fra Oslofjorden og Bergen ble identifisert av MALDI-TOF, (Bruker, Daltonics, Tyskland). For å oppnå en ren bakteriekultur ble isolatene dyrket opp på nytt på *Vibrio* ChromoSelect Agar (Sigma-Aldrich, Tyskland) ved  $37\pm 1^{\circ}\text{C}$  i  $18\pm 4$  timer. Deretter ble bakterieisolatene overført på liten metallplate full av små runde ringer. Hver «ring» representere et bakterieisolat som skal identifisere. Ved bruk av tannpirker til å plukke opp en bakteriekoloni fra agarskålen. Strike på en av de små ringene på metallplate. Bakteriene ble dekket med 1  $\mu\text{L}$  matriksemiddel HCCA (Bruker, Tyskland). Til slutt skal matriksen fordampes og tørkes i cirka 2-3 minutter.

Resultat fra MALDI TOF Biotyper identifikasjon baseres på en poengsum. En poengsum på  $>2,0$  gir en høysikkerhets identifikasjon, der arten eller slekten er identisk med bakterieprofilen lagret i database.

#### 3.4.4 API

Totalt 10 isolater ble dyrket på nytt på en Plate Count agar (PCA) (Oxoid, England) med tilsatt 2 % NaCl, deretter inkubert overnatt. Karakterisering av isolatene ble utført ved Gram-testing, Oksidase-testing samt Analytical Profile Index (API) 20E (BioMèreux, Frankrike).

Enkel koloni ble overført og mikset med 5 ml sterilt saltvann (0.85% NaCl) ved bruk av en steril podeøse. Blandet godt ved å pipettere opp og ned for å oppnå homogent blanding. Deretter tilsette bakteriesuspensjonen til en av brønnene på API 20E test kit (BioMèreux, France). Ulike brønner ble fylt med forskjellige volumer. For brønner som er merket med Citrat (CIT), Voges-Proskauer (VP) og Gelatin (GEL), ble fylt helt til suspensjonen dekket overflaten. For de brønnene som inneholder Arginin (ADH), Lysin (LDC), ornitin (ODC), natriumtiosulfat (H<sub>2</sub>S) og Urea (URE) ble fylt og dekket med mineralolje for å danne et anaerobt miljø. Til slutt ble de resterende brønnene fylt kun til halvparten av brønnen, og inkubert ved 36±1°C i 24 timer.

#### 3.4.5 Hemolyseaktivitet

Hemolytisk aktivitet for 10 *V. parahaemolyticus* isolater ble bestemt på blodagar-skåler, tryptisk soyagar (TSA) med 5% saueblod (VWR<sup>TM</sup>). Mediet er anvendt for bakterie diagnostikk der de fleste vanlige bakterier kan vokse og gir hemolyse på skålen. Hvert isolat ble strøket på blodagar-skåler, deretter inkubert ved 37°C i 24 timer. Bakterier som viser grønn sone rundt koloniene er klassifisert som α-hemolytiske, for β-hemolytiske vises en klar sone rundt koloniene.

#### 3.5 Sensitivitetstesting for antibiotika

Sensitivitetsprofilen til 10 *V. parahaemolyticus* isolater ble bestemt mot 12 antibiotika og en kontroll som var *E. coli* CCUG17620. De spesifikke antibiotika brukt i denne studien inkluderer: Gentamicin (GEN), Oxolinic Acid (OXO), Sulfamethoxazole (SMX), Trimethoprim/Sulfamethoxazole (SXT), Chloramphenicol (CHL), Meropenem (MERO), Ampicillin (AMP), Ceftazidime (TAZ), Enrofloxacin (ENTERO), Florfenicol (FFN) og Oxytetracycline (OXY).

Metoden for antimikrobiell sensitivitetstesting inkluderer rendyrking av bakteriekultur og utstryk på *Vibrio*-Chromo Select agar (Sigma-Aldrich, Tyskland) med sterilt podeøse, deretter inkubering ved 37°C i 18-24 timer. Etter at inkuberingstiden er ferdig, ble hver bakteriekoloni

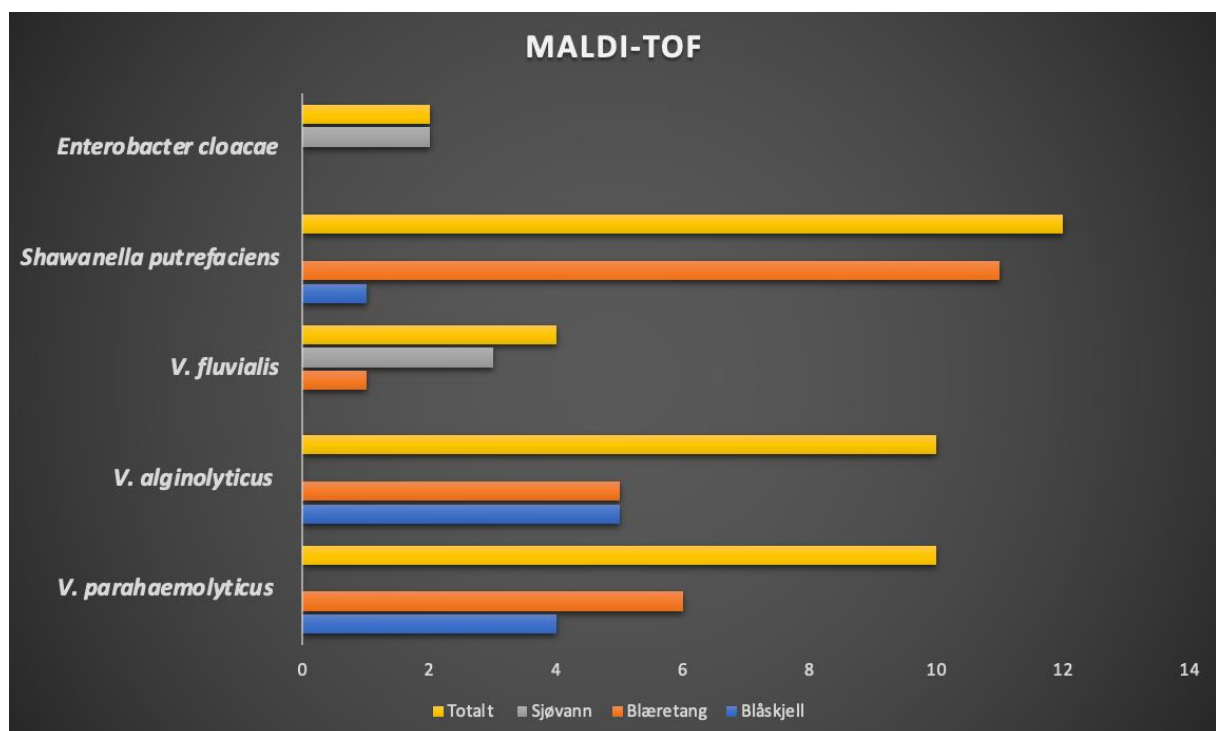
valgt ut og inokulert i en 96-brønners MIC-plate med Mueller-Hinton buljong (MH) (Oxoid, England). Bakteriekolonier ble tilberedt og blandet i sterilt saltvann 0.85% (MacFarland standard 0.5) og overført med 10µl til MH-buljong. Selve bakteriesuspensjon overført videre til en ikke kommersielt Sensititre<sup>tm</sup> ECOFFVIB-plater som er laget for Havforskningsinstituttet. MIC-plater ble plassert på en automatisert maskin som tilsatt 100µl på hver MIC-brønn og inkubert ved 37°C i 24 timer. Resistensbestemmelse ble gjennomført med utgangspunkt i kliniske MIC-verdier for brytningspunktet etter versjon 12.0 (EUCAST, 2022).

## 4.0 Resultat

### 4.1 MALDI-TOF AS

Fra *Vibrio*-metoden ble 113 kolonier fra blæretang, blåskjell og sjøvann samlet fra øst- og vestkysten, plukket fra TCBS-skåler og isolert til identifisering. Fra prøver av skjell og tang ble det samlet 19 kolonier isolert fra østkysten, og 51 kolonier fra vesten samt 60 kolonier av sjøvann fra øst- og vestkysten. Av de 113 isolatene ble 38 undersøkt ved MALDI-TOF. Av disse ble 10 stammer identifisert som *V. alginolyticus* og 10 stammer som *V.*

*parahaemolyticus*. Tolv isolater ble identifisert som *Shewanella putrefaciens*, og 4 som *V. fluvialis* og 2 som *Enterobacter cloacae*. Resultatet vist i figur 4.1 nedenfor.



**Figur 4.1.** Viser oversikt over arter som ble identifisert på MALDI-TOF fra blåskjell, blæretang og sjøvann.

MALDI-TOF resultatene er illustrert i Figur 4.1. For blåskjell ble ett isolat identifisert som *Shewanella putrefaciens*, fem isolat som *V. alginolyticus* og fire isolat som *V. parahaemolyticus*. For blæretang ble seks isolat identifisert som *V. parahaemolyticus*, fem isolat som *V. alginolyticus*, ett isolat som *V. fluvialis* og elleve isolat som *Shewanella putrefaciens*. For sjøvann ble tre isolat identifisert som *V. fluvialis* og to isolat som *Enterobacter cloacae*.

#### 4.2 Forekomst av bakterier i sjøvann

Det ble samlet 6 sjøvannsprøver fra østkysten (Oslofjorden) og vestkysten (Nordåsvannet, Bergen). For hver region ble det fordelt vannprøver til to analyser. Analysen av sjøvann fra østkysten ble utført ved at 1 ml sjøvann filtreres til *Vibrio*-analysen, 100 ml filtreres til analysen for termotolerante koliforme bakterier. For prøver fra vestkysten ble det filtrert 200 ml sjøvann for termotolerante koliforme, og 50 ml for *Vibrio*-analysen. Resultatene er vist i *Tabell 4.2*. Maksimal temperatur på østkysten ved prøvetakning CS var 20°C. For alle prøver tatt fra vestkysten var den målte temperaturen 18°C.

**Tabell 4.2.** Platelling av sjøvann samlet fra Oslofjorden(Vollen, Asker) og Bergen (Nordåsvannet). Målt temperatur oppgitt i (°C) og antall kolonidannende enheter på skåler oppgis per (1 ml).

Sjøvann fra Oslofjorden/ Vollen i Asker	Temperatur °C	Antall kolonidannende enheter på skåler pr 1 ml	
		<i>mFC-skåler</i>	<i>TCBS-skåler</i>
AS	19	16	64
BS	19	92	115
CS	20	11	24
Sjøvann fra Nordåsvannet, Bergen.	Temperatur °C	Antall kolonidannende enheter på skåler pr 1 ml	
		<i>mFC-skåler</i>	<i>TCBS-skåler</i>
BAS	18	1	2
BBS	18	1	2
BCS	18	0	3

Alle prøver fra sjøvann viste store forskjeller i vekst. Når en sammenlignet resultatene fra østkysten og vestkysten, hadde østkysten betydelig mer vekst på TCBS-skåler. For termotolerante koliforme bakterier, hadde østkysten betydelig mer vekst, særlig i prøve (BS).



### 4.3 Karakterisering av isolater

Totalt ble 38 isolater plukket fra *Vibrio*ChromoSelect skåler, og isolert i renkulturer for videre identifisering. Av disse ble 10 isolater identifisert som *V. parahaemolyticus*. Disse ble testet for gram-reaksjon, oksidase-egenskaper og siden identifisert ved API 20E, MALDI-TOF og bestemmelse av hemolytisk aktivitet.

**Tabell 4.3.** Bakteriesolater identifisert av API 20E og MALDI-TOF. Karakterisering ved urease, oksidase, Gram- og bestemmelse av hemolytisk aktivitet i prøve BVB5, VA1, VA2, VATP2, VBT3, VBT2, VBT4, VATP1, VAT3 og VC2.

Lokasjon	Isolat kode	API		Oksidase	Gram	Hemolyse Alfa	MALDI-TOF	
		Ureas e	ID					
Nordåsvannet	BVB5	-	Ingen ID	+	-	+	<i>V. parahaemolyticus</i>	
	VA1	-	<i>V. parahaemolyticus</i>	+	-	+	<i>V. parahaemolyticus</i>	
	VA2	-	<i>V. parahaemolyticus</i>	+	-	+	<i>V. parahaemolyticus</i>	
	VATP2	-	Ingen ID	+	-	+	<i>V. parahaemolyticus</i>	
	Oslofjorden	VBT3	-	<i>V. parahaemolyticus</i>	+	-	+	<i>V. parahaemolyticus</i>
		VBT2	-	<i>V. parahaemolyticus</i>	+	-	+	<i>V. parahaemolyticus</i>
		VBT4	-	<i>Burkholderia Cepacia</i>	+	-	+	<i>V. parahaemolyticus</i>
		VATP1	-	<i>V. parahaemolyticus</i>	+	-	+	<i>V. parahaemolyticus</i>
VAT3		-	<i>V. parahaemolyticus</i>	+	-	+	<i>V. parahaemolyticus</i>	
	VC2	-	<i>V. parahaemolyticus</i>	+	-	+	<i>V. parahaemolyticus</i>	

Som vist Tabell 4.3. er det observert alfa-hemolyse hos alle bakteriestammene.

Bakteriestammer ble identifisert ved MALDI-TOF som 10 *V. parahaemolyticus*. Fra API 20E

ble 7 stammer identifisert som *V. parahaemolyticus*, 2 med ingen ID og 1 som *Burkholderia cepacia*. Alle bakteriestammene var gramnegative og oksidasepositive.

#### 4.3.1 Bakterieidentitet med score-verdier fra MALDI-TOF

Totalt 10 kolonier plukket fra *Vibrio*ChromSelect agar (VCS) for MALDI-TOF identifikasjon. Den høyeste poengsummen for rangeringen er 2.00-3.00, og være i kategori A (High Confidence identification). Alle isolerte *V. parahaemolyticus* fikk >2.00, og klassifisert som kategori A. Resultatene er vist i *Tabell 4.3.1* nedenfor.

**Tabell 4.3.1.** Identifisering av MALDI-TOF og identitetsscore (%).

Prøve	Bakterieidentitet	Score verdi%
<b>BVB5</b>	<i>V. parahaemolyticus</i>	2.33
<b>VA1</b>	<i>V. parahaemolyticus</i>	2.35
<b>VA2</b>	<i>V. parahaemolyticus</i>	2.30
<b>VATP2</b>	<i>V. parahaemolyticus</i>	2.11
<b>VB3</b>	<i>V. parahaemolyticus</i>	2.35
<b>VB2</b>	<i>V. parahaemolyticus</i>	2.16
<b>VB4</b>	<i>V. parahaemolyticus</i>	2.30
<b>VATP1</b>	<i>V. parahaemolyticus</i>	2.41
<b>VAT3</b>	<i>V. parahaemolyticus</i>	2.35
<b>VC2</b>	<i>V. parahaemolyticus</i>	2.21

#### 4.4 Antimikrobiell sensitivitetstesting

Antimikrobielle resistensprofilene til 10 *V. parahaemolyticus* isolater, ble bestemt mot 12 ulike antibiotika og en kontrollbakterie fra *E. coli* CCUG 17620. Alle bakterieisolatene var mottakelig for antimikrobielt middel brukt i denne studien.

**Tabell 4.4.** MIC-verdier for 10 *V. parahaemolyticus* isolater og *E. coli* CCUG17620 mot 12 ulike antibiotikaklasser, oppgitt (mg/L).

Isolater	GEN	OXO	SMX	SXT	CHL	MERO	AMP	TAZ	ENRO	FFN	OXY
<i>E. coli</i> CCUG17620	1 (S)	0.12	16	0.03/0.6 (S)	4 (S)	0.015 (S)	4 (S)	0.25 (S)	0.015	4	1
<i>BVB5</i>	1	0.06	<4	0.03/0.6 (S)	<0.5	<0.008 (S)	8	0.25 (S)	0.06	0.25	0.12
<i>VA2</i>	1	0.06	<4	0.06/1.19 (S)	<0.5	<0.008 (S)	8	0.25 (S)	0.03	0.5	0.06
<i>VATP2</i>	1	0.25	8	0.06/1.19 (S)	2	0.06 (S)	0.25	0.25 (S)	0.06	0.5	0.5
<i>VBT3</i>	1	0.03	<4	0.03/0.6 (S)	<0.5	<0.008 (S)	8	0.25 (S)	0.03	0.5	0.25
<i>VBT4</i>	1	0.03	<4	0.06/1.19 (S)	<0.5	<0.008 (S)	4	0.25 (S)	0.03	0.5	0.25
<i>VBT2</i>	1	0.06	<4	0.03/0.6 (S)	<0.5	<0.008 (S)	8	0.25 (S)	0.03	0.5	0.25
<i>VA1</i>	1	0.06	<4	0.06/1.19 (S)	<0.5	<0.008 (S)	8	0.25 (S)	0.06	0.25	0.12
<i>VATP1</i>	1	0.03	<4	0.03/0.6 (S)	<0.5	<0.008 (S)	4	0.25 (S)	0.03	0.5	0.25
<i>VAT3</i>	1	0.03	8	0.06/1.19 (S)	<0.5	<0.008 (S)	4	0.25 (S)	0.03	0.5	0.25
<i>VC2</i>	1	0.03	<4	0.06/1.19 (S)	<0.5	<0.008 (S)	4	0.25 (S)	0.03	0.5	0.25

*Gentamicin* = GEN; *Oxolinic Acid* = OXO; *Sulfamethoxazole* = SMX; *Trimethoprim/sulfamethoxazole* = SXT; *Chloramphenicol* = CHL; *Meropenem* = MERO; *Ampicillin* = AMP; *Ceftazidime* = TAZ; *Enrofloxacin* = ENTERO; *Florfenicol* = FFN; *Oxytetracycline* = OXY.

(S) =Sensitiv.

#### 4.4.1 EUCAST-tabell for klinisk brytningspunkt

MIC-verdier for 10 *V. parahaemolyticus* isolater ble målt i henhold til EUCAST brytningspunkt tabellen (Versjon 12.0) (EUCAST, 2022). Tabellen er gyldig for *Vibrio*-arter, inkludert *V. alginolyticus*, *V. cholerae*, *V. fluvialis*, *V. parahaemolyticus* og *V. vulnificus*.

**Tabell 4.4.1.** MIC-verdier for kontroll *E. coli* CCUG 17620 og *Vibrio spp.* i henhold til EUCAST-tabell. MIC-verdier oppgis i (mg/L). For mottakelig (<S) viser mindre enn eller lik en verdi og resistens viser større enn en verdi (>R). En strek (-) i tabellen indikerer at sensitivitetstesting ikke anbefales fordi arten er et dårlig mål for medikamentell behandling. Typisk verdi og Normalområde referer til «Target» og «Range» i henhold til EUCAST-tabell.

Antibiotika	MIC <i>E. coli</i> CCUG 17620 (mg/L)	
	Typisk verdi	Normalområde
<b>Ampicillin</b>	4	2-8
<b>Ceftazidime</b>	0.125-0.25	0.06-0.5
<b>Chloramphenicol</b>	4	2-8
<b>Gentamicin</b>	0.5	0.25-1
<b>Meropenem</b>	0.016-0.03	0.008-0.06
<b>Trimethoprim-sulfamethoxazole</b>	≤0.5	-
Antibiotika	MIC <i>Vibrio spp.</i> (mg/L)	
	Mottakelig	Resistent
<b>Ceftazidime</b>	≤1	≥1
<b>Meropenem</b>	≤0.5	≥0.5
<b>Trimethoprim-sulfamethoxazole</b>	≤0.5	≥0.5

## 5.0 Diskusjon

### 5.1 Identifisering av *Vibrio parahaemolyticus*

For å vurdere forekomst av *V. parahaemolyticus* i blåskjell, blæretang og sjøvann, ble prøver samlet fra østkysten (Vollen, Oslofjorden) og vestkysten (Nordåsvannet, Bergen). Det første steget i denne studien var å kartlegge *Vibrio* og indikatorbakterier (*E.coli*) fra blåskjell, blæretang og sjøvann tatt fra samme lokasjon og til samme tid. Valget av prøvetakingssteder vil estimere forskjellen i tilstedeværelse/fravær av *V. parahaemolyticus* på det valgte stedet av interesse. I tillegg ble disse stammene bekreftet ved en rekke tester, blant annet ved karakterisering ved Gram-testing, oksidase-testing, hemolyseaktivitet og identifisering ved bruk av API 20 E og MALDI-TOF MS.

TCBS-agar brukes ofte for seleksjon av sykdomsfremkallende *Vibrio*-bakterier i sjømat (NMKL. 1997). Grønne kolonier isolert fra TCBS-skåler ble antatt å være *V. parahaemolyticus*. Siden denne bakterien ikke fermenterer sukrose, vokser bakteriene som blågrønne kolonier på TCBS-skåler. I denne studien har alkaliske peptonvann (APW) som inneholder 2% salter og polymyxin B kun brukt for isolering av *V. parahaemolyticus* (Crocini, L. et al. 2007; Hara-Kudo, Y., et al. 2001). Selv med 2 % NaCl og polymyxin B er imidlertid dyrkingen av denne organismen vanskelig fordi det meste av *V. parahaemolyticus* isolert i denne studien vokste uten tilsetning av polymyxin B. Dette gjør utvalgt av isolert kolonier problematisk. På grunn av evnen til andre *Vibrio*-arter som *V. alginolyticus* til å vokse på TCBS-mediet. For eksempel vokser kolonier av *V. alginolyticus* i fravær av polymyxin B. Videre produksjon av *V. alginolyticus* fører til en sukrosefermentering som dekker koloniene med et gul farget lag, noe som gjør det vanskelig å visuelt skille bakteriekolonier (Kourany, M. 1983; Bauer, A., & Rørvik, L. M. 2007). Derfor kan isolering av *V. parahaemolyticus* være vanskelig fordi *V. alginolyticus* kan hindre påvisning av *V. parahaemolyticus* produserende kolonier på TCBS-agar. I tillegg kan det være vanskelig å gjøre en vurdering av mistenkelige kolonier på øyemål.

#### 5.1.1 Artsidentifikasjon ved MALDI-TOF og API 20E

Fra *Vibrio*-metoden ble 113 miljøisolater identifisert ved bruk av MALDI-TOF MS. Av de 113 isolatene ble totalt 38 identifiserte som *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. fluvialis*, *Shewanella putrefaciens* samt *Enterobacter cloacae*. Denne studien fokuserte videre på *V.*

*parahaemolyticus*, som ble utvunnet fra seks prøver av blæretang (VATP2, VBT3, VBT2, VBT4, VATP1 og VAT3) og tre blåskjellprøver (VA1, VA2 og VC2) hentet fra østkysten, og en prøve av blåskjell (BVB5) samlet fra vestkysten i Bergen. Resultatene oppnådd i denne studien tyder på at den fenotypiske identifiseringen av *V. parahaemolyticus* som miljøstammer er problematisk. Hovedsakelig på grunn av omfattende variasjon i biokjemiske egenskaper, noe som stemmer overens med tidligere studier (Fabbro, C., et al. 2010; Thompson, F. L. et al. 2004). I tillegg representerer marine miljøer den største delen av biosfæren og inneholder mange arter av organismer. Som vist i Figur 4.1, andre bakteriearter som kunne vokse på TCBS-agar i denne studien, er *Enterobacter cloacae*, *Shewanella putrefaciens*, *V. fluvialis* og *V. alginolyticus* identifisert av MALDI-TOF.

I denne studien ble TCBS- og *Vibrio*ChromoSelect (VCS) medier brukt. Resultatene av denne studien tyder på at VCS-agar er mer egnet for selektiv vekst av *Vibrio*-arter (Sigmaaldrich, 2018). Imidlertid er identifiseringen av *Vibrio*-arter ved bruk av TCBS-agar problematisk, hovedsakelig på grunn av de nært beslektede sukrose-fermenterende bakteriene. Ved bruk av VCS-medier er fargeutviklingen til *Vibrio*-arter dermed ikke påvirket av tilstedeværelsen av andre bakteriekolonier.

Ti *V. parahaemolyticus* isolater ble videre undersøkt ved bruk av API 20E systemet. De fleste *Vibrio*-arter er halofiler og krever tilsetning av NaCl for å øke enzymaktiviteten (Thompson, F. L. et al. 2004; Granum, P. E. 2015; Håkonsholm, F. et al. 2020). NaCl-konsentrasjoner kan imidlertid påvirke biokjemiske profiler og resultere til feilidentifikasjon av *V. parahaemolyticus* fra API 20E (Martinez-Urtaza, J., 2006). I denne studien ble 10 miljøisolater av *V. parahaemolyticus* analysert i henhold til API 20E-systemet ved 0.85% saltholdighet. Fra API 20E analysen ble 7 av 10 isolatene identifisert som *V. parahaemolyticus*. Sammenlignet API 20E med MALDI-TOF, klarte API 20E å identifisere færre. Videre ble bakterieisolatene undersøkt i denne studien for ureaseproduksjon av API-systemet, resultatene var negative. API 20E er designet for klinisk bruk og er hovedsak ikke egnet for testing av miljøisolater (Martinez-Urtaza, J., 2006). Videre er det vanskelig å identifisere miljøbakterier fra det marine miljøet ved å bruke standard API-testingsprosedyrer ved 0.85% saltholdighet. Standard laboratorietester kan være begrenset på grunn av de spesifikke saltkravene til *V. parahaemolyticus* og manglende kunnskap om salt-supplerte medier. Identifikasjon av *V. parahaemolyticus* ved hjelp av API 20E er også kjent for å være vanskelig og ender ofte opp med å være en mindre pålitelig metode. En rekke faktorer kan føre til feiltolkning av resultatene, blant annet feil avlesning av reaksjonene, da dette gjøres

manuelt øyemål. Under testing kan dannelsen av luftbobler i de anaerobe brønnene også påvirke analysen, noe som igjen kan føre til feiltolkning av resultatene. Tidligere studier har også vist at for eksempel inkubasjonstemperaturen for optimale uttrykk av miljøbakterier og biokjemiske egenskaper kanskje ikke er optimale (Martinez-Urtaza, J., 2006; Håkonsholm, F. et al. 2020; King, N. et al. 2018). Ifølge API 20E standardmetode skal testen inkuberes ved 37 grader, og dersom man endrer temperaturen vil resultatene ikke være pålitelig. I denne studien ble API-testene inkubert ved 37°C som er optimal temperatur for de humanpatogene. Optimumstemperatur for *Vibrio*-bakterier vil være fra 30-35°C, men disse bakteriene har også blitt rapportert å kunne formere seg rask i buljong og sjømat mellom 18 og 40 °C (Mudoh, M. F. et al. 2014; Parveen, S. et al. 2013).

Resultatene fra *Vibrio*-delen i denne studien oppgitt i *Tabell 4.3* indikerer ingen ureaseproduksjon, men dette betyr ikke nødvendigvis at *V. parahaemolyticus* stammer ikke vil være sykdomsfremkallende. Som nevnt tidligere er det vanskelig å vurdere virulensen til *V. parahaemolyticus* ved bruk av API 20E-analysen. Det finnes imidlertid andre mer pålitelige metoder for å undersøke dette, for eksempel PCR-metoder ved påvisning av genene for hemolyse. I en tidligere studier som utførte standardprosedyren til API-systemet ble det observert at *V. parahaemolyticus* isolert som en miljøstamme ikke var i stand til å fermentere glukose med 0,85% NaCl, men var i stand til å fermentere glukose når 2% NaCl ble brukt (Martinez-Urtaza, J., 2006; MacDonell, M. T. et al. 1982). Resultatene av denne studien kan tyde behovet for mer kunnskap om bruken av saltsupplerte medier i API-standardtestprosedyrer. Selv om ureaseaktivitet ikke ble påvist i *V. parahaemolyticus* isolater i denne studien, kan det ikke konkluderes med at ureaseproduksjon er fraværende på bakgrunn av ulike faktorer, deriblant NaCl konsentrasjonen og feilavlesning, som kan påvirke resultatene av bakterielle biokjemiske reaksjoner.

## 5.2 Forekomst av *Vibrio spp.* og *E.coli* i sjøvann samlet fra Oslofjorden og Nordåsvannet

Sjøvann hentet fra østkysten (Oslofjorden) ble filtrert med 100 ml mens sjøvann hentet fra vestkysten filtrert med 200 ml, og disse ble deretter dyrket på m-FC skåler. Ved å sammenligne resultatene fra Oslofjorden og Nordåsvannet (Bergen), hadde Oslofjorden

betydelig mer vekst med tanke på forekomst av termotolerante koliforme. Det var tynn vekst på m-FC-skåler fra vestkysten, med kun 1 koloni per skål fra prøver (BAS og BBS) og ingen vekst for prøver BCS. Dette til tross for at sjøvann fra vestkysten filtreres mer enn prøver fra østkysten. Fra *Vibrio*-metoden (NMKL, 1997) ble 1 ml sjøvann fra østkysten og 50 ml fra vestkysten filtrert. Tall fra platetelling vist i *Tabell 4.2* indikerer betydelig mer vekst av bakterier i sjøvannsprøver samlet ved østkysten. Resultatene viste dermed at sjøvann samlet fra østkysten hadde høyest vekst i m-FC-skåler og TCBS-skåler.

Resultatene indikerte at prøver samlet inn fra vestkysten hadde høye tall i TCBS-skåler, men begrenset vekst på m-FC-skåler. Resultatet stemmer overens med teorien om at tilstedeværelsen av *V. parahaemolyticus* ikke er assosiert med tilstedeværelsen av fekal forurensing (Watkins, W. D., et al. 1985). Likevel rapporterte Watkins og Cabelli (1985) at fekal forurensing kan ha indirekte effekt på økning i bakteriekonsentrasjoner gjennom dyreplankton.

Fra *Vibrio*-metoden (NMKL, 1997) ble kolonier dyrket i TCBS-skåler valgt ut for isolering for videre identifisering. 30 kolonier fra østkysten og 30 kolonier fra vestkysten ble samlet inn for isolering. Resultatet, som er oppgitt i *Figur 4.1*, viste at ingen av isolatene ble identifisert som *V. parahaemolyticus*. Bare 5 av 60 isolater ble gjenvunnet fra *Vibrio*ChromoSelect agar (VCS). To stammer *Enterobacter cloacae* ble isolert fra sjøvann hentet fra Bergen. Ytterligere tre isolater fra østkysten ble identifisert som *V. fluvialis*.

Selv om antallet isolater som ble gjenvunnet fra VCS var lavt, antydte ikke resultatene fraværet av *V. parahaemolyticus*, på grunn av levedyktige, men ikke-dyrkbare celler (VBNC). Tilstanden der levende bakterier verken kunne vokse eller dele seg er vanlige blant *Vibrio*-arter (Mizunoe, Y., et al. 2000). Organismen som *V. parahaemolyticus* er kjent for å være levedyktig i det marine økosystemet det isoleres fra, men vil ikke kunne dyrkes ved bruk av standard laboratoriemetoder. Stressende tilstander som frysing og gjenopplivingsfasen til isolatene kan være årsaken til induksjon av VBNC-tilstanden.

Tidligere studier fra Norge har påvist forekomst av *Vibrio*-bakterier i norske farvann (Gjerde, J., & Bøe, B. 1981; Bauer, A. et al., 2006; Håkonsholm, F., Lunestad, B. T. et al. 2020). I en av disse studiene ble de tre hovedpatogene *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus* og *V. cholerae* isolert fra norske marine miljøer, og *trh+* *V. parahaemolyticus* var funnet i norske blåskjell.



Resultatet fra denne studien indikerte en potensiell fare for *V. parahaemolyticus* infeksjon i Norge, og at visse grupper av *V. parahaemolyticus* kan være spesielt tilpasset det kjølige klimaet (Bauer, A. et al., 2006). I en tidligere studie utført i Chile, som har lignende klimatiske forhold som Norge, ble det påvist *V. parahaemolyticus* for første gang i 2004, til tross for at sjøvannstemperaturer er lave og sjelden høyere enn 16 °C (Fuenzalida, L., 2006). Dette igjen antyder at *V. parahaemolyticus* kan tilpasse seg kjøligere temperaturer enn før antatt.

Prøvene som ble samlet i denne studien viste ikke store forskjeller i vanntemperatur fra vestkysten og østkysten av Norge. Likevel viser resultatet fra østkysten betydelig mer vekst fra plattetelling av sjøvannsprøver. De fleste prøver som ble identifisert som *V. parahaemolyticus* var samlet fra østkysten, og kun 1 isolert *V. parahaemolyticus* fra vestkysten. En rekke studier påpeker også at dersom miljøforholdene er gunstige, kan vekst av *Vibrio*-arter øke hos toskallede bløtdyr (Gjerde, J., & Bøe, B. 1981; Bauer, A. et al., 2006; Håkonsholm, F., Lunestad, B. T. et al. 2020) og tang (Mahmud, H. Z., Neogi, B. S., et al., 2007). Dette ble også bekreftet fra en tidligere rapport på arbeid utført i New Zealand som vist at *V. parahaemolyticus* ble funnet i blåskjell (King, N. et al. 2018). Fra denne rapporten kan man se at *V. parahaemolyticus* også ble isolert fra kaldere områder med klimaforhold tilsvarende Norge. Det er derfor antatt at *Vibrio*-arter kan overleve i kaldere områder i andre marine organismer, som for eksempel blåskjell, men at de trives bedre i høyere temperaturer.

### 5.3 Hemolyseaktivitet

De 10 *V. parahaemolyticus* isolater ble vurdert til bakterielle hemolytiske egenskaper assosiert med virulensgener som *tdh* og/eller *trh*. Hemolysin er et giftstoff som angriper røde blodceller, og forårsaker cellelysering kalt hemolyse (Mizuno, T., et al. 2019). Resultatene i denne studien viste at ingen av *V. parahaemolyticus* stammene testet på blodagar med 5% saueblod var positive for  $\beta$ -hemolyse, noe som indikerer at mekanismer for erythrocythemolyse forårsaket av at *tdh*, og/eller *trh* ikke var til stede. Dette er fordi virulensen til det humanpatogene *V. parahaemolyticus* er sterk korrelert med disse genene (Gutierrez West, C. K. et al. 2013; Granum, P. E. 2015). Dette samsvarer med teorien om at flertall av miljøstammer av *V. parahaemolyticus* er negative for *tdh* og *trh* og dermed ikke er patogene. En tidligere studie utført i Norge, viste derimot tilstedeværelse av *trh*<sup>+</sup> i enkelte

isolater fra blåskjell (Bauer, A. et al., 2006). Det er velkjent at tilstedeværelsen av *trh*<sup>+</sup> er assosiert med produksjon av urease, en viktig virulensfaktor og ofte involvert i infeksjonsprosessen (Osawa, R., et al. 1996). Derfor vil forekomsten av *trh*<sup>+</sup> gi bakterier med større potensial til å forårsake sykdom. Tidligere studier har vist at miljøstammer av *V. parahaemolyticus* inneholder bare 1-2% av *tdh*- og *trh* genene (Wong, H. C. et al. 2000; Jahangir Alam, M. et al. 2002; Hervio-Heath, D. et al. 2002).

De fleste *V. parahaemolyticus* isolater fra pasienter med diaré viste  $\beta$ -hemolyse på blodagar. I motsetning, i denne studien ble hemolyseaktivitet observert som alfa-hemolyse i alle isolater. Resultatene av denne studien viste at bakterier delvis var i stand til å lysere de røde blodceller på blodagar, og dermed forandret blodskålene til grønn farge (Mizuno, T., et al. 2019). Dette er ikke på grunn av en fullstendig lysering av blodcellene, men som et resultat av oksidering av hemoglobin til methemoglobin.

Under prøvetakingsprosessen ble det målt temperaturer som var over 15 °C for både øst- og vestkysten, men salinitet ble derimot ikke målt. Tidligere studier tyder på at dersom saliniteten er under 25%, kan dette gi gunstige vekstforhold for humanpatogene *Vibrio* (Håkonsholm, F., et al. 2020).

*V. parahaemolyticus* i mat og miljøprøver er ikke fullt forstått. Miljøforhold kan ha hatt en effekt på bakterier, for eksempel i å fremme utviklingen av ulike overlevelsesstrategier som tilpasser bakterien til ulike miljøer (Jahangir Alam, M. et al. 2002). I denne studien kan ulike årsaker som fysiske og kjemiske faktorer påvirke gjenopplivingsfasen. Som nevnt tidligere kunne koloniene vokse på skålene, men de var ikke i stand til å generere metabolske aktiviteter, noe som kan være årsak til mulig feiltolkning av resultatene. Det vil derfor kunne være interessant å teste dette på en alternativ metode, for eksempel ved bruk av PCR (polymerasekjedereaksjon). Resultatene i denne studien kan dermed ikke med sikkerhet avgjøre om disse potensielt kan være patogene eller ei.

#### 5.4 Antimikrobiell sensitivitetstesting

Sensitivitetstesting av 10 *V. parahaemolyticus* isolater ble utført mot 12 forskjellige typer antibiotika. Resultatene ble sammenlignet med de kliniske konsentrasjonsverdiene for brytningspunkt i henhold til EUCAST *Tabell 4.4.1* (EUCAST, 2022). MIC-

brytningspunktverdien satt av EUCAST inkluderer imidlertid ikke alle typer antibiotika som ble testet i denne studien, inkludert Gentamicin, Oxolinic Acid, Sulfamethoxazole, Chloramphenicol, Ampicillin, Enrofloxacin, Florfenicol, Oxytetracycline (Chiou, J., Li, R., & Chen, S. 2015). *V. parahaemolyticus* er kjent for å være svært følsom for nesten alle antimikrobielle midler bortsett fra penicillin. Generelt er penicillin et dårlig mål i Gram-negative bakterier på grunn av celleveggen. Dette kan skyldes at det ikke er noen brytningspunktverdi for ampicillin, siden sensitivitetstesting anbefales ikke fordi *Vibrio* er et dårlig mål for behandling med dette stoffet (Ottaviani, D. et al. 2001; Devi, R. et al. 2009; Shaw, K. S., et al. 2014). Funnene i denne studien samsvarer med tidligere studier som rapporterte mottakeligheten av *V. parahaemolyticus* for Trimethoprim/Sulfamethoxazole (Ottaviani, D. et al. 2013). I en tidligere studie utført i Italia ble det ikke funnet resistens mot Chloramphenicol hos *V. parahaemolyticus*, mens en studie utført av Shaw og medarbeidere (Shaw, K. S. et al. 2014) viste middels resistens mot dette antibiotikumet. Et interessant funn fra den italienske studien var at alle isolatene var middels resistens for Trimethoprim/Sulfamethoxazole (SXT). Resultatene i denne studien viser ingen resistens for disse (SXT) blant de 10 *V. parahaemolyticus* isolatene, siden høyeste MIC-konsentrasjonen ble målt til 0.06/1.19, der brytningsverdier som er ansett som å indikere mottakelighet er satt av EUCAST <4.

EUCAST er en tabell som primært brukes til kliniske isolater og pasientbehandling, og dersom en bakterie ikke anses å være relevant for behandlinger på sykehus vil den som regel ikke være i EUCAST-tabellen. Mange antibiotika brukt i denne studien vil ikke bli funnet i EUCAST tabellene. Disse verdiene er oppgitt ifølge EUCAST “Klinisk brytningspunkt er til daglige bruk i kliniske laboratoriet for å gi råd om pasientbehandling” (EUCAST, 2022).

*V. parahaemolyticus* har stadig blitt rapportert i en rekke land som USA, Chile og Kina for økt resistens mot antibiotika (Han, F., et al. 2007; Dauros, P., et al. 2011; Jiang, Y., et al. 2014). Nyere studier har også vist at *V. parahaemolyticus* og *V. vulnificus* har utviklet sterkere antimikrobiell resistens, noe som kan skyldes tilstedeværelsen av patogene bakterier med antimikrobielle resistensgener i avløpsvann som slippes ut (Baquero, F., et al. 2008; Elmahdi, S. et al. 2018).

Prevalensen og spredningen av antimikrobielle resistensgener i miljøbakterier har økt de siste årene (Zhao, S. et al 2018). Dette har utviklet seg til å bli et folkehelseproblem. Siden ARG i

miljøet kan erverves av menneskelige patogene bakterier gjennom horisontal genoverføring, gjør dette behandlingen av infeksjonssykdommer vanskelig. Selv om resultatene i denne studien ikke viste resistens eller virulens blant 10 *V. parahaemolyticus* stammer, er dette fortsatt et problem (Grevskott, D. H., et al. 2021). I en nyere studie har det blitt påvist antibiotikaresistens fra avløpsvann isolert fra *E.coli*-stammer samlet fra vestkysten av Norge. Dette demonstrerer alvoret av utviklingen av antibiotikaresistens og mulig ansvar for spredning av klinisk relevante patogener og antibiotikaresistensgener (ARG) til det marine miljøet (Grevskott, D. H., et al. 2017). En tidligere studie fra Norge viser at marine muslinger kan representere et viktig "hotspot" for resistensoverføring. Studien bemerket også at forurenset sjømat, som fisk og skalldyr, kan føre til at antibiotikaresistente bakterier fra marin og fekal opprinnelse når mennesker under håndtering og konsum. Derfor bør dette tas med i betraktningen når det skal avgjøres om muslinger bør inkluderes i årlig overvåking av ABR i kystnære områder.

Antimikrobielt resistente fekale bakterier fra dyr eller mennesker kan spres gjennom vannmiljøer. Spredning av antibiotikaresistente bakterier i sjømat kan påvirke utvikling og spredning av resistens blant matbårne patogener. Med tilførsel av avfall og kloakk påvirker omfanget av menneskelig aktivitet kystvannets økosystem negativt (Adams, M. R., et al. 2008). Dette skjer blant annet gjennom horisontal genoverføring, som er viktig i utvikling og overføring av resistensgener mellom arter, samt for overføring av resistensgener fra fekale bakterier til miljøbakterier (Shaw, K. S., et al. 2014; Letchumanan, V., et al. 2015; Baquero, F., et al. 2008).

## 6.0 Konklusjon

Risikoen forbundet med humanpatogene *V. parahaemolyticus* kan være undervurdert på grunn av utilstrekkelig overvåking og undersøkelse av matbårne sykdommer. Det er begrenset informasjon om virulensegenskaper og historisk utvikling til *V. parahaemolyticus* i Norge. Det kan derfor antas at *V. parahaemolyticus* infeksjoner i Norge har vært høyere enn antatt.

*V. parahaemolyticus* forekommer naturlig i havet og tilstedeværelsen av denne organismen i skalldyr og alger er uunngåelig. Det er dermed ikke overraskende at *V. parahaemolyticus* ble påvist, og at *Vibrio*-bakterier som er påvist i sjømat ikke alltid er sykdomsfremkallende. For å forebygge sykdom forårsaket av *V. parahaemolyticus* i sjømat, er karakterisering av isolater viktig for å få en samlet vurdering av risiko, spesielt for humane patogene stammer. Det er viktig å øke forståelsen om virulens- og antimikrobielle egenskaper, da noen av disse kan være menneskelige patogener. I tillegg er det lite kjent om hvorfor visse stammene av *V. parahaemolyticus* forårsaker sykdom hos mennesker.

Klimaendringer vil sannsynligvis øke utbredelsen av denne organismen, da økte vanntemperaturer vil gi gunstigere vekstforhold for mange patogene *Vibrio*-bakterier. Hyppigere overvåking av forekomst, resistens og virulens hos *Vibrio*-bakterier er derfor nødvendig for å forberede seg på fremtidige folkehelseutfordringer. Man burde etablere overvåkingssystemer for offentlige badeplasser samt for muslinger og tang som brukes til konsum. Overvåking av *Vibrio*-bakterier som finnes naturlig i vannmiljøer kan brukes til å kartlegge endring i marine økosystemer og mulig utvikling av AMR. Spredningene av antimikrobiell resistens er godt forstått i klinisk sammenheng, men vannmiljøets rolle i spredningen av AMR er fortsatt ukjent. Derfor er det viktig å etablere standardiserte antimikrobiell følsomhetstest for sjøvannsbakterier for å overvåke spredningen og utviklingen i marine miljøet. Videre er det viktig å øke kunnskapen rundt hvordan sjømat skal håndteres både under høsting og hos forbrukerne. Dette kan bidra til å forebygge risikoen ved inntak av sjømat, da feilhåndtering av sjømat kan føre til matforgiftning forårsaket av *V. parahaemolyticus*.

Hovedfunnene i denne studien viser at *V. parahaemolyticus* isolert fra blåskjell og blæretang gjennomgående er følsom for antibiotika. Forekomsten av *V. parahaemolyticus* i sjømat er lav og det er fravær av hemolyse. Risikoen for *Vibrio*-infeksjon gjennom bading eller inntak av forurenset sjømat kan derfor ikke vurderes med sikkerhet. Videre viste funnene i denne

studien forskjeller i bakterietall i blåskjell og tang samlet på samme sted (Oslofjorden) og til samme tid. I prøver fra A (blåskjell) og AT (blæretang) (Vedlegg A) ble det oppdaget gjennom MPN-metoden flere bakterier MPN/100g i tang enn i blåskjell. Dette kan tyde på at blæretang kan være mer attraktiv som et reservoar for fekale bakterier og som habitat for mikrobielle samfunn.

## 7.0 Forslag til videre studier

For fremtidige studier av forekomst og egenskaper til *V. parahaemolyticus* i muslinger og makroalger i norske farvann, bør studien gjennomføres over lengre periode, med prøvetaking som dekker en stor del av norskekysten. Spesielt sørkysten hvor vanntemperaturen overstiger 20 grader. Det er viktig å måle saltholdighet og temperatur under prøvetaking. På grunn av den sterke sesongvariasjonen av menneskelig patogener, øker bakterietallene når temperaturen stiger over 18 °C og saltholdigheten (saliniteten) faller under 25%.

I tillegg er det viktig å gjennomføre prøvetaking i 2 forskjellige omganger, for eksempel om vinteren og sommeren. Dette er viktig for å kunne sammenligne forekomst av denne organismen om vinteren og sommeren, da dette vil bidra til å øke kunnskapen om hvorvidt blåskjell og tang kan fungere som et viktig reservoar for *V. parahaemolyticus* til ulike tider av året. I tillegg har tang og blåskjell unik biologi, og det kan derfor være nyttig å samle forskjellige arter av skjell og tang. Videre kan både blåskjell og tang fungere som et reservoar for antibiotikaresistente bakterier som kommer fra kloakkutslipp til det marine miljøet.

Dermed er kartlegging av resistens mønstre for både *Vibrio*-bakterier og fekale forurensingsbakterier svært viktig for å sikre folkehelse i fremtiden.

## 8.0 Litteraturliste

- Adams, M.R., Moss, M. O. (2008).** Food Microbiology. Third Edition. University of Surrey, Guildford, UK.
- Alipour, M., Issazadeh, K., & Soleimani, J. (2014).** Isolation and identification of *Vibrio parahaemolyticus* from seawater and sediment samples in the southern coast of the Caspian Sea. *Comparative clinical pathology*, 23(1), 129-133.
- Baker-Austin, C., Oliver, J. D., Alam, M., Ali, A., Waldor, M. K., Qadri, F & Martinez-Urtaza, J. (2018).** *Vibro spp.* Infections. Nature Reviews Disease Primers, 4.
- Banerjee, S. K., Farber, J. M. 2018.** Trend and Pattern of Antimicrobial Resistance in Molluscan *Vibrio* Species Sourced to Canadian Estuaries. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 62 (10): e00799-18. DOI: <https://doi.org/10.1128/AAC.00799-18>.
- Baquero, F., Martínez, J. L., & Cantón, R. (2008).** Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Current opinion in biotechnology*, 19(3), 260-265.
- Bauer, A., & Rørvik, L. M. (2007).** A novel multiplex PCR for the identification of *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae* and *Vibrio vulnificus*. *Letters in Applied Microbiology*, 45(4), 371-375.
- Bauer, A., Østensvik, Ø., Florvåg, M., Ørmen, Ø., & Rørvik, L. M. (2006).** Occurrence of *Vibrio parahaemolyticus*, *V. cholerae*, and *V. vulnificus* in Norwegian Blue Mussels (*Mytilus edulis*). *Applied and environmental microbiology*, 72(4), 3058–3061. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.4.3058-3061.2006>
- Biomèrieux. (2002).** API 20E Identification system for Enterobacteriaceae and other non-fastidious Gram-negative rods. Internett. Tilgjengelig fra: <https://faculty.fiu.edu/~makemson/MCB3020Lab/API20eInstructions.pdf> (Hentet fra 14.04.2022)
- Biomèrieux. (2015).** API & ID 32 Identification Databases. Internett. Tilgjengelig fra: <https://www.biomerieux-diagnostics.com/sites/clinic/files/9308960-002-gb-b-apiweb-booklet.pdf> (Hentet 05.04.2022)
- Burge, A. C., Closek, J. C., Friedman, S. C. et al. (2016).** “The Use of Filter-feeders to Manage Disease in a Changing World”. *Integrative and Comparative Biology*. Volume 56, Issue 4, Pages 573–587. Tilgjengelig fra: <https://academic.oup.com/icb/article/56/4/573/2198269> (Hentet 29.03.2022)
- Cassini, A., Högberg, L. D., Plachouras, D., Quattrocchi, A., Hoxha, A., Simonsen, G. S., Colomb-Cotinat, M., Kretzschmar, M. E., Devleeschauwer, B., Cecchini, M., Ouakrim, D. A., Oliveira, T. C., Struelens, M. J., Suetens, C., Monnet, D. L., & Burden of AMR Collaborative Group. (2019).** Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: a population-level modelling analysis. *The Lancet. Infectious diseases*, 19(1), 56–66. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(18\)30605-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30605-4)
- Chiou, J., Li, R., & Chen, S. (2015).** CARB-17 family of  $\beta$ -lactamases mediates intrinsic resistance to penicillins in *Vibrio parahaemolyticus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 59(6), 3593-3595.

- Chowdhury, N. R., Chakraborty, S., Ramamurthy, T., Nishibuchi, M., Yamasaki, S., Takeda, Y., & Nair, G. B. (2000).** Molecular evidence of clonal *Vibrio parahaemolyticus* pandemic strains. *Emerging infectious diseases*, 6(6), 631–636. <https://doi.org/10.3201/eid0606.000612>
- Costello, C., Cao, L., Gelcich, S. et al. (2020).** The future of food from the sea. *Nature* 588, 95–100. Tilgjengelig fra: <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2616-y>
- Croci, L., Suffredini, E., Cozzi, L., Toti, L., Ottaviani, D., Pruzzo, C., ... & *Vibrio parahaemolyticus* Working Group. (2007).** Comparison of different biochemical and molecular methods for the identification of *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of applied microbiology*, 102(1), 229-237.
- Daniels, N. A., MacKinnon, L., Bishop, R., Altekruse, S., Ray, B., Hammond, R. M., Thompson, S., Wilson, S., Bean, N. H., Griffin, P. M., & Slutsker, L. (2000).** *Vibrio parahaemolyticus* infections in the United States, 1973-1998. *The Journal of infectious diseases*, 181(5), 1661–1666. <https://doi.org/10.1086/315459>
- Dauros, P., Bello, H., Domínguez, M., Hormazabal, J. C., & Gonzalez, G. (2011).** Characterization of *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated in Chile in 2005 and in 2007. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 5(07), 502-510.
- Devi, R., Surendran, P. K., & Chakraborty, K. (2009).** Antibiotic resistance and plasmid profiling of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from shrimp farms along the southwest coast of India. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(11), 2005-2012.
- Dieckmann, R., Strauch, E., & Alter, T. (2010).** Rapid identification and characterization of *Vibrio* species using whole-cell MALDI-TOF mass spectrometry. *Journal of applied microbiology*, 109(1), 199-211.
- Drake, S. L., DePaola, A., & Jaykus, L. A. (2007).** An overview of *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus*. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 6(4), 120-144.
- Duinker, A. Roiha, S. I., Amlund, H. et al. (2016).** «Potential risk posed by macroalgae for application as feed and food – a Norwegian perspective». National Institute of Nutrition and Seafood Research (NIFES). Rapport.
- Egan, S., Harder, T., Burke, C., Steinberg, P., Kjelleberg, S., & Thomas, T. (2013).** The seaweed holobiont: Understanding seaweed–bacteria interactions. *FEMS Microbiology Reviews*, 37(3), 462-476.
- Elmahdi, S., Parveen, S., Ossai, S., DaSilva, L. V., Jahncke, M., Bowers, J., & Jacobs, J. (2018).** *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* Recovered from Oysters during an Oyster Relay Study. *Applied and environmental microbiology*, 84(3), e01790-17. <https://doi.org/10.1128/AEM.01790-17>
- EUCAST. (2022).** EUCAST Disk Diffusion Method for Antimicrobial Susceptibility Testing. Version 12.
- Fabbro, C., Cataletto, B., & Del Negro, P. (2010).** Detection of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* through biochemical and molecular-based methodologies in coastal waters of the Gulf of Trieste (North Adriatic Sea). *FEMS microbiology letters*, 307(2), 158–164. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2010.01969.x>



- FHI. (2019).** Bakterier i sjøvann kan gi infeksjoner. Folkehelseinstituttet. Internett. Tilgjengelig fra: <https://www.fhi.no/ml/badevann/bakterier-i-sjovann-kan-gi-infeksjoner/> (Hentet 27.01.2022)
- Fiskeridirektoratet. (2021).** Statistikk for akvakultur: Bløtdyr, krepsdyr og pigghuder (skjell, skalldyr etc.) Salt 1999-2020. Tilgjengelig fra: <https://www.fiskeridir.no/Akvakultur/Tall-og-analyse/Akvakulturstatistikk-tidsserier/Bloetdyr-krepsdyr-og-pigghuder-skalldyr> (Hentet 04.03.2022)
- FN, FN-Sambandet. (2021).** «FNs bærekraftsmål».FN. Tilgjengelig fra: <https://www.fn.no/om-fn/fns-baerekraftsmaal> (Lest 16.01.2022)
- Fuenzalida, L., Hernández, C., Toro, J., Rioseco, M. L., Romero, J., & Espejo, R. T. (2006).** *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish and clinical samples during two large epidemics of diarrhoea in southern Chile. *Environmental Microbiology*, 8(4), 675-683.
- Gjerde, J., & Bøe, B. (1981).** Isolation and Characterization of *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio parahemolyticus* from the Norwegian Coastal Environment. *Acta veterinaria scandinavica*, 22(3), 331-343.
- Granum, P. E. (2015).** Matforgiftning - Smitte gjennom mat og vann. 4 utg. Cappelen damm.
- Grevskott, D. H., Ghavidel, F. Z., Svanevik, C. S., & Marathe, N. P. (2021).** Resistance profiles and diversity of  $\beta$ -lactamases in *Escherichia coli* strains isolated from city-scale sewage surveillance in Bergen, Norway mimic clinical prevalence. *Ecotoxicology and environmental safety*, 226, 112788. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112788>
- Grevskott, D. H., Svanevik, C. S., Sunde, M., Wester, A. L., & Lunestad, B. T. (2017).** Marine Bivalve Mollusks as Possible Indicators of Multidrug-Resistant *Escherichia coli* and Other Species of the Enterobacteriaceae Family. *Frontiers in microbiology*, 8, 24. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00024>
- Gutierrez West, C. K., Klein, S. L., & Lovell, C. R. (2013).** High frequency of virulence factor genes *tdh*, *trh*, and *tlh* in *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated from a pristine estuary. *Applied and environmental microbiology*, 79(7), 2247–2252. <https://doi.org/10.1128/AEM.03792-12>
- Håkonsholm, F., Lunestad, B. T., Aguirre Sánchez, J. R., Martinez-Urtaza, J., Marathe, N. P., & Svanevik, C. S. (2020).** *Vibrios* from the Norwegian marine environment: Characterization of associated antibiotic resistance and virulence genes. *MicrobiologyOpen*, 9(9), e1093. <https://doi.org/10.1002/mbo3.1093>
- Håkonsholm, F., Lunestad, B. T. & Svanevik, C. S. (2021).** Sykdomsfremkallende *Vibrio*-bakterier i havet – er det noe vi bør bekymre oss for?. *Naturen* Vol.145, utgave 6. <https://doi.org/10.18261/issn.1504-3118-2021-06-07>
- Han, F., Walker, R. D., Janes, M. E., Prinyawiwatkul, W., & Ge, B. (2007).** Antimicrobial susceptibilities of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* isolates from Louisiana Gulf and retail raw oysters. *Applied and environmental microbiology*, 73(21), 7096-7098.
- Hara-Kudo, Y., Nishina, T., Nakagawa, H., Konuma, H., Hasegawa, J., & Kumagai, S. (2001).** Improved method for detection of *Vibrio parahaemolyticus* in seafood. *Applied and environmental microbiology*, 67(12), 5819–5823. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.12.5819-5823.2001>

- Hervio-Heath, D., Colwell, R. R., Derrien, A., Robert-Pillot, A., Fournier, J. M., & Pommepuy, M. (2002).** Occurrence of pathogenic *vibrios* in coastal areas of France. *Journal of applied microbiology*, 92(6), 1123-1135.
- Huss, H. H., et al. (2003).** «Assessment and Management of Seafood Safety and Quality». FAO Fisheries Technical Paper No. 444. Food and agriculture Organization of the United Nations Rome, FAO. Tilgjengelig fra: <https://www.fao.org/3/y4743e/y4743e00.htm>
- Iwamoto, M., Ayers, T., Mahon, B. E., & Swerdlow, D. L. (2010).** Epidemiology of seafood-associated infections in the United States. *Clinical microbiology reviews*, 23(2), 399-411.
- Jahangir Alam, M., Tomochika, K. I., Miyoshi, S. I., & Shinoda, S. (2002).** Environmental investigation of potentially pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in the Seto-Inland Sea, Japan. *FEMS microbiology letters*, 208(1), 83-87.
- Jiang, Y., Yao, L., Li, F., Tan, Z., Zhai, Y., & Wang, L. (2014).** Characterization of antimicrobial resistance of *Vibrio parahaemolyticus* from cultured sea cucumbers (*Apostichopus japonicas*). *Letters in applied microbiology*, 59(2), 147-154.
- Joseph, S. W., Colwell, R. R., & Kaper, J. B. (1982).** *Vibrio parahaemolyticus* and related halophilic *Vibrios*. *Critical reviews in microbiology*, 10(1), 77–124. <https://doi.org/10.3109/10408418209113506>
- King, N. MacCoubrey, J. D. & Cressey, P. (2018).** Risk profile: *Vibrio parahaemolyticus* in bivalve molluscan shellfish. New Zealand Food Safety. ISBN No: 978-1-77665-821-3. (Online). Tilgjengelig fra: <https://www.mpi.govt.nz/dmsdocument/30023-Risk-Profile-Vibrio-parahaemolyticus-in-bivalve-molluscan-shellfish> (Hentet 29.03.2022)
- Kourany, M. (1983).** Medium for isolation and differentiation of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio alginolyticus*. *Applied and environmental microbiology*, 45(1), 310-312.
- Letchumanan, V., Chan, K. G., & Lee, L. H. (2014).** *Vibrio parahaemolyticus*: a review on the pathogenesis, prevalence, and advance molecular identification techniques. *Frontiers in microbiology*, 5, 705. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00705>
- Letchumanan, V., Chan, K. G., & Lee, L. H. (2015a).** An insight of traditional plasmid curing in *Vibrio* species. *Frontiers in microbiology*, 6, 735. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00735>
- Letchumanan, V., Pusparajah, P., Tan, L. T., Yin, W. F., Lee, L. H., & Chan, K. G. (2015b).** Occurrence and Antibiotic Resistance of *Vibrio parahaemolyticus* from Shellfish in Selangor, Malaysia. *Frontiers in microbiology*, 6, 1417. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01417>
- Lopatek, M., Wiczorek, K., & Osek, J. (2018).** Antimicrobial Resistance, Virulence Factors, and Genetic Profiles of *Vibrio parahaemolyticus* from Seafood. *Applied and environmental microbiology*, 84(16), e00537-18. <https://doi.org/10.1128/AEM.00537-18>
- Løvdal, T. Lunestad, B. T. Myrmel, M. Rosnes, J. T. & Skipnes, D. (2021).** Microbiological Food Safety of Seaweeds. *Foods*, 10(11), 2719. doi:10.3390/foods10112719

- Lunestad, B. T., S. Frantzen, et al. (2016).** "Time trends in the prevalence of *Escherichia coli* and enterococci in bivalves harvested in Norway during 2007–2012." *Food Control* **60**: 289-295.
- MacDonell, M. T., Singleton, F. L., & Hood, M. A. (1982).** Diluent composition for use of API 20E in characterizing marine and estuarine bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, *44*(2), 423-427.
- Mahmud, Z. H., Neogi, S. B., Kassu, A., Mai Huong, B. T., Jahid, I. K., Islam, M. S., & Ota, F. (2008).** Occurrence, seasonality and genetic diversity of *Vibrio vulnificus* in coastal seaweeds and water along the Kii Channel, Japan. *FEMS microbiology ecology*, *64*(2), 209–218. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2008.00460.x>
- Martinez J. L. (2009).** Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. *Environmental pollution (Barking, Essex: 1987)*, *157*(11), 2893–2902. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2009.05.051>
- Martinez-Urtaza, J., Lozano-Leon, A., DePaola, A., Ishibashi, M., Shimada, K., Nishibuchi, M., & Liebana, E. (2004).** Characterization of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* isolates from clinical sources in Spain and comparison with Asian and North American pandemic isolates. *Journal of clinical microbiology*, *42*(10), 4672–4678. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.10.4672-4678.2004>
- Martinez-Urtaza, J., Lozano-Leon, A., Viña-Feas, A., de Nova, J., & Garcia-Martin, O. (2006).** Differences in the API 20E biochemical patterns of clinical and environmental *Vibrio parahaemolyticus* isolates. *FEMS microbiology letters*, *255*(1), 75-81.
- Martinez-Urtaza, J., Trinanes, J., Abanto, M., Lozano-Leon, A., Llovo-Taboada, J., Garcia-Campello, M., Pousa, A., Powell, A., Baker-Austin, C., & Gonzalez-Escalona, N. (2018).** Epidemic Dynamics of *Vibrio parahaemolyticus* Illness in a Hotspot of Disease Emergence, Galicia, Spain. *Emerging infectious diseases*, *24*(5), 852–859. <https://doi.org/10.3201/eid2405.171700>
- Mizuno, T., Debnath, A., & Miyoshi, S. I. (2019).** Hemolysin of *Vibrio* species. In *Microorganisms*. IntechOpen.
- Mizunoe, Y., Wai, S. N., Ishikawa, T., Takade, A., & Yoshida, S. (2000).** Resuscitation of viable but nonculturable cells of *Vibrio parahaemolyticus* induced at low temperature under starvation. *FEMS microbiology letters*, *186*(1), 115–120.
- Mudoh, M. F., Parveen, S., Schwarz, J., Rippen, T., & Chaudhuri, A. (2014).** The Effects of Storage Temperature on the Growth of *Vibrio parahaemolyticus* and Organoleptic Properties in Oysters. *Frontiers in public health*, *2*, 45. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2014.00045>
- Munita, J. M., & Arias, C. A. (2016).** Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiology spectrum*, *4*(2), 10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015>
- Nair, G. B., Ramamurthy, T., Bhattacharya, S. K., Dutta, B., Takeda, Y., & Sack, D. A. (2007).** Global dissemination of *Vibrio parahaemolyticus* serotype O3:K6 and its serovariants. *Clinical microbiology reviews*, *20*(1), 39–48. <https://doi.org/10.1128/CMR.00025-06>

- Newton, A., Kendall, M., Vugia, D. J., Henao, O. L., & Mahon, B. E. (2012).** Increasing rates of *vibriosis* in the United States, 1996-2010: review of surveillance data from 2 systems. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 54 Suppl 5(0 5), S391–S395.  
<https://doi.org/10.1093/cid/cis243>
- NMKL. (1997).** Pathogenic *Vibrio* Species. Detection And Enumeration in Foods. NORDIC COMMITTEE ON FOOD ANALYSIS. 2 ed. Espoo, Finland.
- Norges sjømatråd. (2020).** «Sjømateksport for 107,3 milliarder kroner i 2019». Norges sjømatråd. Internett. Tilgjengelig fra:  
<https://seafood.no/aktuelt/nyheter/sjomateksport-for-1073-milliarder-kroner-i-2019/>  
(hentet 10.01.22).
- NORM/NORM-VET. (2020).** NORM/NORM-VET: Usage of Antimicrobial Agents and Occurrence of Antimicrobial Resistance in Norway. ISSN:1890-9965. Tromsø/Oslo 2021.
- Odeyemi, O. A., & Stratev, D. (2016).** Occurrence of antimicrobial resistant or pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in seafood. A mini review. *Revue de Médecine Vétérinaire*, 67(3-4), 93-98.
- Olafsen, T., Winther, U. et al. (2012).** «Verdiskaping basert på produktive hav i 2050». Rapport fra en arbeidsgruppe oppnevnt av Det kongelige Norske Videnskabers Selskab (DKNVS) og Norges Tekniske Vitenskapsakademi (NTVA). SINTEF. Tilgjengelig fra:  
[https://www.sintef.no/globalassets/upload/fiskeri\\_og\\_havbruk/publikasjoner/verdiskaping-basert-pa-produktive-hav-i-2050.pdf](https://www.sintef.no/globalassets/upload/fiskeri_og_havbruk/publikasjoner/verdiskaping-basert-pa-produktive-hav-i-2050.pdf) (Hentet 10.01.2022)
- Osawa, R., Okitsu, T., Morozumi, H., & Yamai, S. (1996).** Occurrence of urease-positive *Vibrio parahaemolyticus* in Kanagawa, Japan, with specific reference to presence of thermostable direct hemolysin (TDH) and the TDH-related-hemolysin genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(2), 725-727.
- Ottaviani, D., Bacchiocchi, I., Masini, L., Leoni, F., Carraturo, A., Giammarioli, M., & Sbaraglia, G. (2001).** Antimicrobial susceptibility of potentially pathogenic halophilic *vibrios* isolated from seafood. *International journal of antimicrobial agents*, 18(2), 135–140. [https://doi.org/10.1016/s0924-8579\(01\)00358-2](https://doi.org/10.1016/s0924-8579(01)00358-2)
- Ottaviani, D., Leoni, F., Rocchegiani, E., Mioni, R., Costa, A., Virgilio, S., ... & Lleo, M. M. (2013).** An extensive investigation into the prevalence and the genetic and serological diversity of toxigenic *Vibrio parahaemolyticus* in Italian marine coastal waters. *Environmental Microbiology*, 15(5), 1377-1386.
- Parveen, S., DaSilva, L., DePaola, A., Bowers, J., White, C., Munasinghe, K. A., ... & Tamplin, M. (2013).** Development and validation of a predictive model for the growth of *Vibrio parahaemolyticus* in post-harvest shellstock oysters. *International journal of food microbiology*, 161(1), 1-6.
- Semenza, J. C., Trinanes, J., Lohr, W., Sudre, B., Löfdahl, M., Martinez-Urtaza, J., Nichols, G. L., & Rocklöv, J. (2017).** Environmental Suitability of *Vibrio* Infections

- in a Warming Climate: An Early Warning System. *Environmental health perspectives*, 125(10), 107004. <https://doi.org/10.1289/EHP2198>
- Sharma, D., Misba, L., & Khan, A. U. (2019).** Antibiotics versus biofilm: an emerging battleground in microbial communities. *Antimicrobial resistance and infection control*, 8, 76. <https://doi.org/10.1186/s13756-019-0533-3>
- Shaw, K. S., Rosenberg Goldstein, R. E., He, X., Jacobs, J. M., Crump, B. C., & Sapkota, A. R. (2014).** Antimicrobial susceptibility of *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus* recovered from recreational and commercial areas of Chesapeake Bay and Maryland Coastal Bays. *PloS one*, 9(2), e89616.
- Sigmaaldrich. (2018).** 92323 *Vibrio* ChromoSelect Agar. The life science business of Merck KGaA, Darmstadt. Germany operates as MilliporeSigma in the US and Canada. Internett. Tilgjengelig fra: <https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/product/documents/104/958/92323dat.pdf>
- Singhal, N., Kumar, M., Kanaujia, P. K., & Viridi, J. S. (2015).** MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Frontiers in microbiology*, 6, 791. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00791>
- Su, Y. C., & Liu, C. (2007).** *Vibrio parahaemolyticus*: a concern of seafood safety. *Food microbiology*, 24(6), 549–558. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2007.01.005>
- Thompson, F. L., Iida, T., & Swings, J. (2004).** Biodiversity of *Vibrios*. *Microbiology and molecular biology reviews*, 68(3), 403-431.
- Tronsmo. A. (2016).** Mikrobiell vekst, Universitetsforlaget. *Innføring i mikrobiologi*. Oslo: Universitetsforlaget AS.
- Walker, D., et al. (2020).** «A qPCR-MPN method for rapid quantification of *Escherichia coli* in bivalve molluscan shellfish ». Centre for Environment, Fisheries and Aquaculture (CEFAS), Weymouth. UK. Tilgjengelig fra: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0167701220307831?via%3Dihub>
- Watkins, W. D., & Cabelli, V. J. (1985).** Effect of fecal pollution on *Vibrio parahaemolyticus* densities in an estuarine environment. *Applied and Environmental Microbiology*, 49(5), 1307-1313.
- Wong, H. C., Liu, S. H., Ku, L. W., Lee, I. Y., Wang, T. K., Lee, Y. S., ... & Shih, D. Y. C. (2000).** Characterization of *Vibrio parahaemolyticus* isolates obtained from foodborne illness outbreaks during 1992 through 1995 in Taiwan. *Journal of food protection*, 63(7), 900-906.
- World Health Organization & Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2021).** Advances in science and risk assessment tools for *Vibrio parahaemolyticus* and *V. vulnificus* associated with seafood. Meeting report. Microbiological Risk Assessment Series No. 35. Rome. ISSN 1726-5274.
- Zhao, S., Ma, L., Wang, Y., Fu, G., Zhou, J., Li, X., & Fang, W. (2018).** Antimicrobial resistance and pulsed-field gel electrophoresis typing of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from shrimp mariculture environment along the east coast of China. *Marine pollution bulletin*, 136, 164–170. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.09.017>

## Vedlegg

**Vedlegg A.** Most probable number fra blåskjell og tang prøver samlet i Oslofjorden.

Prøve	1g	0,1 g	0,01 g	MPN/100g
Blåskjell				
A	5	5	1	3500
B	5	2	1	700
C	5	4	1	1700
Tang				
AT	5	5	2	5400
BT	5	5	3	9200
CT	5	5	2	5400

**Vedlegg B.** Most probable number fra blåskjell og tang prøver samlet i Bergen (Nordåsvannet).

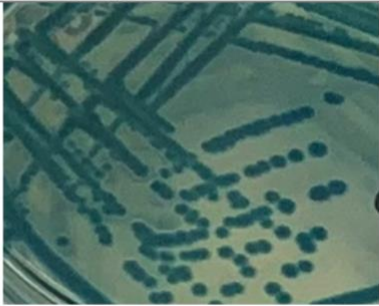

Prøve	1g	0,1 g	0,01 g	MPN/100g
Blåskjell				
BA	3	0	0	78
BB	3	1	0	110
BC	4	0	0	130
Tang				
BAT	5	2	0	490
BBT	2	0	1	68
BCT	4	0	0	130

## Vedlegg C. Identifisering ved MALDI-TOF

Lokasjon	Isolat navn	MALDI-TOF
<b>Vollen i Asker (Oslofjorden)</b>	VA2 <sup>1</sup>	<i>V. parahaemolyticus</i>
	VATP2 <sup>2</sup>	<i>V. parahaemolyticus</i>
	VAT4 <sup>2</sup>	<i>V. alginolyticus</i>
	VBT3 <sup>2</sup>	<i>V. parahaemolyticus</i>
	VAT5 <sup>2</sup>	<i>Shewanella putrefaciens</i>
	VB1 <sup>1</sup>	<i>Shewanella putrefaciens</i>
	VATP2 <sup>2</sup>	<i>Shewanella putrefaciens</i>
	VBT2 <sup>2</sup>	<i>V. parahaemolyticus</i>
	VBT3 <sup>2</sup>	<i>Shewanella putrefaciens</i>
	VAS1 <sup>3</sup>	<i>V. fluvialis</i>
	VAS4 <sup>3</sup>	<i>V. fluvialis</i>
	VA1 <sup>1</sup>	<i>V. parahaemolyticus</i>
	VBT4 <sup>2</sup>	<i>V. parahaemolyticus</i>
	VAT3 <sup>2</sup>	<i>V. parahaemolyticus</i>
	VAT1 <sup>2</sup>	<i>V. fluvialis</i>
	VC2 <sup>1</sup>	<i>V. parahaemolyticus</i>
	VAS3 <sup>3</sup>	<i>V. fluvialis</i>
<b>Nordåsvannet (Bergen)</b>	BVCTP6 <sup>2</sup>	<i>V. alginolyticus</i>
	BVAT3 <sup>2</sup>	<i>V. alginolyticus</i>
	BVAT1 <sup>2</sup>	<i>V. alginolyticus</i>
	BVB2 <sup>1</sup>	<i>V. alginolyticus</i>
	BVB5 <sup>1</sup>	<i>V. parahaemolyticus</i>
	BVATP1 <sup>2</sup>	<i>Shewanella putrefaciens</i>
	BVATP3 <sup>2</sup>	<i>Shewanella putrefaciens</i>
	BVAT4 <sup>2</sup>	<i>Shewanella putrefaciens</i>
	BVCTP8 <sup>2</sup>	<i>Shewanella putrefaciens</i>
	BVCTP4 <sup>2</sup>	<i>Shewanella putrefaciens</i>
	BVCTP5 <sup>2</sup>	<i>Shewanella putrefaciens</i>
	BVBT2 <sup>2</sup>	<i>Shewanella putrefaciens</i>
	BVBT3 <sup>2</sup>	<i>Shewanella putrefaciens</i>
	BVB4 <sup>1</sup>	<i>V. alginolyticus</i>
	VATP1 <sup>2</sup>	<i>V. parahaemolyticus</i>
	BVC4 <sup>1</sup>	<i>V. alginolyticus</i>
	VBBS3 <sup>3</sup>	<i>Enterbacter cloacae</i>
	VBAS5 <sup>3</sup>	<i>Enterbacter cloacae</i>
	BVBTP1 <sup>2</sup>	<i>V. alginolyticus</i>
	BVC2 <sup>1</sup>	<i>V. alginolyticus</i>
BVC3 <sup>1</sup>	<i>V. alginolyticus</i>	

Blåskjell<sup>1</sup>  
 Blæretang<sup>2</sup>  
 Sjøvann<sup>3</sup>

**Vedlegg D. VibrioChromoSelect skåler.**

<b>Isolat</b>	<b>Skål bilder</b>	<b>Kolonifarge</b>	<b>Organisme</b>
<b>VBT4</b>	 <p><i>VCS-agar</i> (Sigma-Aldrich, Tyskland)</p>	Blå/grønn	<i>V. parahaemolyticus</i>
<b>VAT1</b>	 <p><i>VCS-agar</i> (Sigma-Aldrich, Tyskland)</p>	Lilla	<i>V. fluvialis</i>





**Norges miljø- og biovitenskapelige universitet**  
Noregs miljø- og biovitenskapelige universitet  
Norwegian University of Life Sciences

Postboks 5003  
NO-1432 Ås  
Norway