

دو فصلنامه طبّ جنوب
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر
سال پنجم، شماره ۲، صفحه ۱۱۷-۱۱۲ (اسفند ۱۳۸۱)

جداسازی ویبریوها از روده و هپاتوپانکراس میگوی پنائید خلیج فارس*

محمد علی حقیقی**^۱، پروفیسور لطفعلی حقیقی^۲، دکتر ایرج نبی پور^۳، سید مجتبی جعفری^۴، الیزابت آژرون^۵

^۱ کارشناس ارشد میکروبیشناسی، آموزشکده بربزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بوشهر

^۲ استاد میکروبیشناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز

^۳ استادیار غدد درون ریز و متابولیسم، مرکز پژوهش های سلامت خلیج فارس، دانشگاه علوم پزشکی بوشهر

^۴ کارشناس ارشد ایمونولوژی، مرکز پژوهش های سلامت خلیج فارس، دانشگاه علوم پزشکی بوشهر

^۵ کارشناس ارشد میکروب شناسی، بخش باکتری های روده ای انستیتو پاستور پاریس

چکیده:

ویبریوها به عنوان فلور غالب، از پاتوژن های عمده در باکتریوز میگوهای پرورشی هستند. از آنجا که بیشتر ویبریوها از میگوهای سالم نیز جدا شده اند، فرضیه ماهیت فرصت طلبی ویبریو در پاتوژنز بیماری های میگوها مورد قبول واقع شده است. همچنین شناخت فلور باکتریال طبیعی می تواند در کاربرد آنها به عنوان باکتری های پروبیوتیک سودمند باشد. برای شناخت گونه های غالب ویبریویی به عنوان فلور میگوهای سالم خلیج فارس، ویبریوهای جدا شده از میگوهای پنائید Penaeid خلیج فارس مورد بررسی باکتریولوژیک فرار گرفته و با برنامه RECOGNIZER انستیتو پاستور فرانسه آنالیز گردید. از ۵۹ سویه ویبریویی جدا شده، ۱۷ مورد مربوط به ویبریو آلجینولیتیکوس، ۵ مورد ویبریو هارویی، ۹ مورد ویبریو ناتریجنس، ۶ مورد ویبریو نریس، ۸ مورد ویبریو فلوویالیس و یک مورد از هر کدام از ویبریو متشینکوی و ویبریو کامپلی بود. یکی از سویه های جدا شده ویبریویی، در انستیتو پاستور فرانسه به عنوان ویبریو ناشناخته قلمداد گردید. بنابراین ویبریو آلجینولیتیکوس، به عنوان سویه غالب ویبریو در فلور طبیعی میگوی خلیج فارس بوده و می بایست برنامه های پژوهشی برای کاربرد آن به عنوان یک پروبیون طرح ریزی گردد.

واژگان کلیدی: ویبریو، میگو، فلور، هپاتوپانکراس

* این پروژه با بودجه تحقیقاتی مصوب شورای پژوهش و فناوری استان و با حمایت سازمان مدیریت و برنامه ریزی استان بوشهر انجام گردید.

مقدمه

میگوهای پنائید *Penaeid* از سخت پوستان با پتانسیل بالا در صنعت پرورش آبزیان در سطح جهان می باشند. اکنون ۷۱ درصد از تولید میگوی پرورشی جهان از کشورهای شرقی می باشد و کشور ما در این صنعت نوپا نیز جوان و پویا است. با افزایش پیشرفت اخیر در صنعت پرورش میگو، سیستم های پیچیده ای برای پرورش این ارگانسیم دریایی بکار برده شده اند که این سیستم ها افزایش رشد باکتریایی در محیط های رشد مصنوعی آنها را نیز فراهم نموده اند که بصورت دوره ای نیز موجب بیماری های روده ای می گردند.

بیشتر این گونه های باکتریایی، بخشی از فلور طبیعی میگو و اکوسیستم آن می باشند (۱-۳). اقدامات مختلف بر روی بهسازی آب، تراکم میگوی فراوان، حضور مواد ارگانیک (مواد تغذیه ای، میگوی مرده و غیره)، ایجاد اختلال در جمعیت باکتریال استخرهای پرورش میگو کرده و موجب تحریک رشد باکتری های فلور طبیعی که بصورت فرصت طلب عمل می کنند می شوند. از این رو بیماری های باکتریایی میگو از عوامل عمده خسارت اقتصادی در صنعت پرورش آبزیان می باشند (۴).

ویربویها از فلور غالب در مراحل رشد و نمو لاروی میگو هستند. این باکتری ها، بعنوان پاتوژن های عمده در باکتریوز میگوهای پرورشی مطرح می باشند. از آنجا که بیشتر ویربویها از میگوهای سالم پنائید نیز جدا شده اند، فرضیه ماهیت فرصت طلبی ویربوی در پاتوژن بیماری های میگوهای پنائید بصورت گسترده مورد قبول واقع شده است (۵). باکتری های فرصت طلب موجب خسارت جدی در تولید میگو شده و اثرات ویژه ای نیز در تولید ضایعات نکروتیک بافتی، مالفورماسیون های بدنی، رشد آهسته در تمامورفوز لاروی دارند (۴). اثر و شدت عفونت بستگی به گونه های ویربویی، دوزاژ، آب، تغذیه، کیفیت میگو و مدیریت صنعت پرورش میگو دارد (۶).

در صنعت میگو، عفونت های باکتریایی با آنتی بیوتیک کنترل می شوند. اما این شیوه موجب تولید مقاومت در میان

باکتری های فرصت طلب می شود. استفاده از فرآورده های شیمیایی نیز بدلیل اثرات زیست محیطی آنها هنوز در پرده بحث و جدل می باشد. یکی از راههای مبارزه با عفونت های باکتریایی، استفاده از باکتری های پروبیوتیک است. باکتری های پروبیوتیک بعنوان باکتری های خوب بر علیه باکتری های پاتوژن بعنوان پیشگیری استفاده می شوند.

این باکتری ها با تجزیه بیولوژیک رسوبات و ضایعات ارگانیک و همچنین رقابت با ارگانسیم های پاتوژن، بعنوان عوامل پیشگیرانه طب آبزیان، کاربرد نوین یافته اند (۷).

دو گونه از ویربویها که بعنوان فلور میگو در استخرهای پرورش میگو مطرح می باشند، از لحاظ فعالیت ضد ویروسی، بر علیه ویروس نکروز دهنده هماتوپوئیک عفونی (IHNV) و OMV مورد مطالعه قرار گرفته اند که اثرات ضد ویروس این ویربویها، نشانگر سودمندی فلورباکتریایی، بر علیه عفونت های میگوها هستند (۸).

ترسیم فلور طبیعی میگو می تواند در شناخت عفونت های این ارگانسیم، سهم عمده ای داشته باشد و همچنین شناخت فلور باکتریال طبیعی می تواند در کاربرد آنها بعنوان باکتری های پروبیوتیک سودمند باشد. بدلیل رشد شتابان صنعت میگو در استان های جنوبی کشور و تهدیدهای عفونت های باکتریایی، بویژه ویربوی این ارگانسیم ها، در این پژوهش تلاش نموده ایم تا فلور طبیعی میگوهای سالم خلیج فارس را شناسایی کنیم.

مواد و روش کار

در شهریورماه (فصل صید میگوی خلیج فارس) تعداد ۲۵ میگوی شیلاتی *Penaeid sp.* که از لحاظ مشاهدات بالینی (رنگ، آبشش، لوله گوارش و هیپوتانکراس) فاقد نشانه های بیماری بودند، بلافاصله پس از صید از آبهای ساحلی بندر بوشهر، مورد مطالعه قرار گرفتند.

در شرایط استریل، لوله گوارش و هیپوتانکراس میگوها، پس از هموژنیزه شدن، در فلاسک های حاوی ۵۰ سی سی آلکالین پپتون با اثر قلیایی (PH=۸/۵) که حاوی ده گرم در

جدول ۱) خصوصیات بیوشیمیایی و فیزیولوژیک سویه های ویبریوهای شناخته شده جدا شده از میگو
 پنانید Panacid خلیج فارس

ویبریو کامپلی	مشتبندی ویبریو	فلوریالیس ویبریو	ناثریجنس ویبریو	ویبریو نویس	ویبریو هاروی	آلجیولیتکوس ویبریو
+	-	+	+	+	+	+
K/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	K/A
Y	Y	Y	Y	Y	Y	G
+	+	+	+	+	+	+
+	+	+	+	+	+	+
+	+	+	-	+	+	+
+	+	-	-	-	-	-
+	+	+	+	+	+	+
+	-	+	+	+	+	-
+	+	+	+	-	+	+
-	-	-	-	-	+	-
+	+	-	+	+	+	+
-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-
+	+	+	+	+	+	-
-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-
+	+	+	+	+	+	+
+	+	+	+	+	+	+
+	+	+	+	+	+	-
+	-	-	+	+	-	-
اکسیداز						
TSI						
TCBS						
String						
نشاسته						
ژلاتین						
V.P						
رشد در 30 سانتیگراد						
رشد در 40 سانتیگراد						
اندول						
H2S						
مانیتول						
اینوزیتول						
آرابینوز						
سوکروز						
D. glucose gas						
مقاومت نسبی به نمک						
٪۰						
٪۲						
٪۶						
٪۸						
٪۱۰						

نشاسته و ژلاتین، تخمیر قندهای مانیتول، اینوزیتول، آرابینوز، سوکروز، گلوکز، بررسی تولید گاز از دی گلوکز، تولید سیتوکروم سی، آزمایش استرینگ تحمل نمک طعام با غلظت های صفر، ۳،۶،۸ و ۱۰ درصد، توانایی رشد در دمای ۳۰ و ۴۰ درجه سانتیگراد مورد بررسی قرار گرفتند.

مطالعات تاکسونومیک بر اساس کتابنامه باکتریولوژی سیستماتیک برگی انجام گردید و تعدادی از سویه های جدا شده نیز به انستیتویاستورپاریس انتقال یافت که نتایج بدست

لیتر نمک طعام بودند گذاشته و در درجه حرارت ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده شدند. بعد از ۶ الی ۸ ساعت از انکوباسیون، از فلاسک ها بر روی محیط TCBS، آگار خون دار، تریپتیکاز سویا آگار، برای ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده شدند. پس از خالص سازی کلنی های رشد یافته، باکتری های جدا شده از لحاظ تولید اسید و گاز با TSI (Merk)، تولید استون، متیل رد (Merk)، تولید گاز سولفید هیدروژن (Merk)، هیدرولیز

میگوه‌های سالم خلیج فارس بود. این میکروب مسئول صدمات نفوذی در دریا (۹)، سلولیت (۱۰) و زخم (۱۱) است. همچنین ویریه‌های آلجینولیتیکوس بعنوان عامل اوتیت میانی و خارجی (۱۲-۱۳)، التهاب ملتحمه (۱۴)، اسفوندیت و عفونت درون جمجمه‌ای (۱۵-۱۶) شناخته شده است. همچنین می‌تواند موجب باکتری می‌کشنده در افرادی که سیستم ایمنی ضعیفی دارند شود (۱۷-۱۸). این ویریه‌ها نمک دوست از ماهیان شیلاتی و فرآورده‌های دریایی جدا شده است و بعنوان یک پاتوژن در مسمومیت‌های غذایی معرفی شده است (۱۹-۲۰).

ما در سال ۱۳۷۶، برای نخستین بار، این گونه از ویریه‌ها را از آب و پلانکتون‌های خلیج فارس جدا کردیم (۲۱). این ویریه، بعنوان فلور غالب لارو میگو مطرح می‌باشد. بطوریکه در تمام مراحل لاروی *Litopenaeus vannamei* غالب بوده و در مراحل زونوا و ناپلیوس آن نیز دیده شده است (۲۲).

آسیب‌های پاتولوژیک حاصله از عفونت با ویریه‌های آلجینولیتیکوس در سیستم گوارشی و هپاتوپانکراس میگوها نیز بررسی شده است (۲۳).

خواص پروبیوتیک سویه ویریه‌های آلجینولیتیکوس *Ili* در شرایط تجربی آزمایشگاهی نشان داده شده است و این سویه بعنوان یک پروبیون در مقیاس وسیع در زمان رشد و نمو لاروهای میگوها بکار رفته است. امروزه از این گونه در استراتژی تکنولوژی جانوری، بعنوان کنترل سلامت لارو میگو، استفاده می‌شود (۲۴). وجود ویریه‌های آلجینولیتیکوس، بعنوان سویه غالب ویریه در فلور طبیعی میگوی خلیج فارس نیز نشانگر توان کاربردی این باکتری، بعنوان یک پروبیون در مقابله با عفونت‌های باکتریال میگوهای پرورشی می‌باشد.

از ویریه‌های جدا شده در این پژوهش، ویریه‌های فلورویالیس بود و این ویریه در چندین اپیدمی‌های بزرگ منطقه‌ای اسهالی در جنوب آسیا و خاورمیانه، گزارش شده است (۲۵). تولید اندونوکسین به نظر می‌رسد که در پاتوژنز اسهال با این ارگانیزم مؤثر باشد. در مطالعات آمریکایی‌ها،

آمده در این انستیتو، توسط برنامه RECOGNIZER (Institut Pasteur Taxolab) آنالیز گردید.

نتایج

در این مطالعه، تعداد ۵۹ سویه ویریه‌های شناسایی شدند و هیچ سویه‌ای از آنروموناتس و پلزیوموناتس جدا نگردید. از ۵۹ سویه ویریه‌های جدا شده در این پژوهش، ۱۷ مورد مربوط به ویریه‌های آلجینولیتیکوس، ۵ مورد ویریه‌های *V. harveyi*، ۹ مورد ویریه‌های *V. natrigens*، ۶ مورد ویریه‌های *V. nereis*، ۸ مورد ویریه‌های *V. fluvialis* و ۱ مورد از هر کدام از ویریه‌های *V. metschnikovii* و *V. campbellii* و ویریه‌های کامپبلی *V. campbellii* و همچنین تعدادی ویریه‌های مجهول مشخص گردید. خصوصیات بیوشیمیایی و فیزیولوژیک سویه‌های ویریه‌های جدا شده از میگوهای خلیج فارس در جدول ۱ نمایان است.

از سویه‌های ویریه‌هایی که موفق به شناسایی دقیق آنها نشدیم، ۶ سویه دارای توانایی تخمیر و تولید گاز از دی گلوکز را دارا بوده ولی فاقد خصوصیات شیمیایی منطبق با گونه‌های *V. fluvialis* II و *V. gazogenes* بودند. یک سویه از ویریه‌های نیز جدا گردید که فاقد توانایی تولید گاز از دی گلوکز و تخمیر آرابینوز و اینوزیتول و فاقد توانایی هیدرولیز ژلاتین و نشاسته و دارای توانایی تخمیر مانیتول، سوکروز و رشد در دماهای ۳۰ و ۴۰ درجه سانتی‌گراد و رشد در محیط آبی ۳ و ۶ درصد نمک طعام بود. این ویریه بر اساس برنامه RECOGNIZER انستیتو پاستور پاریس، تحت عنوان ویریه‌های ناشناخته قلمداد گردید. شش سویه دیگر از ویریه‌های ناشناخته در این پژوهش، فاقد توانایی تولید گاز از دی گلوکز بودند، ولی خصوصیات فیزیولوژیک و بیوشیمیایی آنها نیز منطبق با گونه‌های *V. nereis*، *V. marinus* و *V. anguillarum* نیز نبود. (جدول ۱).

بحث

میگوهای سالم خلیج فارس، نیاز به بررسی بسیار گسترده تری دارد.

برعکس، در این بررسی، ما موفق شدیم گونه های مختلف دیگر ویبریو از میگوهای خلیج فارس جدا کنیم که تعدادی از آنها نیز فعلاً قابل شناسایی نیستند و یکی از گونه های مجهول نیز که به بخش باکتری های روده ای انستیتو پاستور فرانسه ارسال شد، فاقد توانایی تولید گاز از دی گلوزک و تخمیر آرا بینوز و اینوزیتول و فاقد توانایی هیدرولیز ژلاتین و نشاسته و دارای توانایی تخمیرمانیتول، سوکروز و رشد در دماهای ۳۰ و ۴۰ درجه سانتیگراد و رشد در محیط آبی ۳ و ۶ درصد نمک طعام بود.

امیدواریم که با بررسی تایپینگ ملکولی این سویه های جدا شده، راهی برای شناخت عفونت های باکتریایی ویبریویی میگوهای پرورشی باز نماییم. زیرا استفاده از RAPD-PCR برای مطالعه ویبریوز در میگوهای پنانید، نشانگر قدرت تشخیص بالای آن و ردیابی اطلاعات اپیدمیولوژیک عفونت های ویبریویی بوده است. استفاده از تکنیک های ملکولی، ما را در کسب دانش بهتر در درک اکولوژی گونه های ویبریو و تأثیر آن ها در بیماری زایی میگوها در شرایط پرورشی مدد خواهد رساند (۲۴).

همانگونه که اشاره شد، امروز سه نکته حائز اهمیت در عفونت های باکتریایی میگو و استفاده از داروهای شیمیایی ضد باکتریایی وجود دارد:

۱/ بازمانده های دارو در میگو برای مصرف انسانی ممکن است شرایط ناگواری را فراهم آورد. ۲/ مصرف آنها با تولید مقاومت دارویی همراه بوده است. ۳/ اثرات سمی مستقیم بر روی انسان در نتیجه حمل و نقل این داروها بوجود می آید. بنابراین یافت میکروب های پروبیوتیک از اهمیت بسیاری برخوردار است و بررسی و پژوهش در دینامیسم فلور باکتریال طبیعی میگو، ما را قادر خواهد ساخت تا نسبت به شناسایی و بکارگیری باکتری های پروبیوتیک برای مقابله با عفونت های ویروسی و باکتریایی، بویژه ویبریوز، مسلح شویم.

۸۶ درصد از بیماران با گاستروانتریت با ویبریوفلوویالیس دارای مدفوعی خونی بودند (۲۶).

پانوزنیستی ویبریو متشینکوی نیز اثبات شده است. این ارگانیزم در یک بیمار با عفونت خون و التهاب کیسه صفرا گزارش شده است (۲۷).

در صنعت پرورش میگو، ویبریوها طی سالیان دراز مورد مطالعه قرار گرفته اند و بعنوان عوامل عفونی جدی و ایجاد مرگ و میر، ضایعات بافتی و نکروز، مالفورماسیون های بدنی و رشد آهسته در میگوها مطرح شده اند. مرگ و میرهای عمده ای در لاروهای *P. monodon* و *P. merguensis* در اندونزی، تایلند، فیلیپین و کشورهای دیگر در نتیجه ویبریوز گزارش شده است (۴).

افزایش در جمعیت ویبریویی از عوامل مهم در کاهش نرخ بقا در *P. indicus* مطرح شده است (۴). ما در پژوهش خود پنج سویه از *V. harveyi* از میگوهای سالم جدا کردیم. این ویبریو، موجب یک مرگ و میر توده ای در لارو *P. monodon* پرورشی در هند شده است (۴). بطور کلی، لارو میگوها دارای استعداد مختلف نسبت به عوامل پانوزنیک ویبریویی می باشند که بستگی به گونه ویبریو و مقداردوز باکتری دارد. مثلاً ویرو هارویی و ویرو پاراهمالیتیکوس موجب نرخ قابل ملاحظه مرگ و میر، تنها در دوزاز بالا در لارو میگو سفید در شرایط آزمایشگاهی می شود (۲۴).

از نکات قابل توجه در بررسی ما، عدم جداسازی ویبریو پاراهمالیتیکوس از روده میگوهای خلیج فارس است. وجود ویبریو پاراهمالیتیکوس در خلیج فارس، نخستین بار توسط پروفیسور حقیقی در سال ۱۹۷۸ گزارش گردید (۲۸) و ما نیز ۱۱ سویه آن را از پلانکتون ها و آب های سواحل خلیج فارس در بوشهر، به شکل گسترده توصیف کردیم (۲۱).

در پژوهش کنونی نیز، همچنین هیچ سویه ای از پلزیوموناس و آنروموناس جدا نگردید، در حالیکه از روده میگوی قهوه ای (*P. californiensis*) باکتری های ویبریو پاراهمالیتیکوس و آنروموناس جدا گردید (۲۹). در هر صورت، عدم جداسازی ویبریو پاراهمالیتیکوس از

REFERENCES:

1. Rothlisberg PC. Aspect of penaeid biology and ecology of relevance to aquaculture: a review. *Aquaculture* 1998;164:49-5.
2. Skjermo J, Vadstein O. Techniques for microbiological control in the intensive rearing of marine larvae. *Aquaculture* 1999;177:333-43.
3. Yasuda K, Kitao T. Bacterial flora in the digestive tract on prawns, *Penaeus japonicus* Bate. *Aquaculture* 1983;19:229-34.
4. Gabriel AG, Felipe AV. Infectious disease in shrimp species with aquaculture potential. *Resent Res Microbiol* 2000; 4:333-480.
5. Gomez-Gil B, Roque A, Turnbull JF, et al. The use and selection of probiotic bacteria for use in the culture of larval aquatic organisms. *Aquaculture* 2000;191:259-70.
6. Avault JW. Prevention of diseases, some fundaments reviews. *Aquaculture Mag* 1997;23:78-83.
7. Probiotics. Good news for all who raise fish, shrimp, etc. <http://www.enviro-reps.com/pblgdnws.html> (Updated: 5 September 2003).
8. Present situation of the probiotics' research. <http://www.alken-murray.com/China2.htm> (Updated: 5 September 2003).
9. Pien FD, Ang KS, Nakashima NT, et al. Bacterial flora of marine penetrating injuries. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1983;1:229-32.
10. Aelvoet G, Kets R, Pattyn SR. Cellulitis caused by *Vibrio alginolyticus*. *Acta Derm Venereol Stockh* 1983;63:559-60.
11. Ryan WJ. Marine vibrio associated superficial septic lesion. *J Clin Pathol* 1976;29:1014-5.
12. Hasyn JJ, Mauer TP, Warner R, et al. Isolation of *Vibrio alginolyticus* from a patient with chronic otitis media. *J Am Osteopath Assoc* 1987;87:560-2.
13. Ciufecu C, Nacescu N, Florescu D. Middle ear infection due to *Vibrio alginolyticus*. *Acta Microbiol Acad Sci Hung* 1979;26:95-8.
14. Lessner AW, Webb RM, Rabin B. *Vibrio alginolyticus* conjunctivitis. *Arch Ophthalmol* 1985;103:229-30.
15. Opaction SM, Saxon JR. Intracranial infection by *Vibrio alginolyticus* following injury in salt water. *J Clin Microbiol* 1986;23:373-4.
16. Lopes CM, Rabada EM, Vutura C, et al. A case of *Vibrio alginolyticus* bacteremia and probable sphenoiditis following a dive in the sea. *Clin Infect Dis* 1993;17:299-300.
17. Janda JM, Brenden R, Debenedetti JA, et al. *Vibrio alginolyticus* bacteremia in an immunocompromised patient. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1986;5:337-40.
18. Reina J, Fernandez-Baca V, Lopez A. Acute gastroenteritis caused by *Vibrio alginolyticus* in an immunocompetent patient. *Clin Infect Dis* 1995;21:1044-5.
19. Chan KY, Woo ML, French GL. *Vibrio parahaemolyticus* and other halophilic vibrios associated with seafood in Hong Kong. *J Appl Bacteriol* 1989;66:57-64.
20. Binta GM, Tjaberg TB, Nyaga PN. Market fish hygiene in Kenya. *J Hyg Lond* 1982;89:47-52.
۲۱. حقیقی ل، نبی پورا، جعفری س م، آرزون ا، حق شناس م، جداسازی ویبریوهای مهم بیماری زا از آب و پلانکتونهای خلیج فارس، طب جنوب، سال اول (شماره ۱): ۱۳۷۶، ۷۱-۶۴.
22. Vandenberghe J, Verdonck L, Robles-Arozarena R, et al. *Vibrio* associated with *Litopenaeus vannamei* larvae, postlarvae, broodstock and hatchery probionts. *Appl Environ Microbiol* 1999;65:2592-7.
23. Esteve M, Herrera FC. Hepatopancreatic alterations in *Litopenaeus vannamei* experimentally infected with a *Vibrio alginolyticus* strain. *J Invertebr Pathol* 2000;76:1-5.
24. Summary reports of European Commission supported STD-3 projects (1992-1995), published by CTA 1999, 230-32.
25. Levine WC, Griffin PM. *Vibrio* infections on the Gulf Coast: Results of first year of regional surveillance. *J Infect Dis* 1993;167:479-483.
26. Furniss AL, Lee JV, Donovan TJ, Group F, A new *Vibrio*? *Lancet* 1997;ii:565-6.
27. Jean-Jacques W, Rajashekaraiah KR, Farmer JJ. *Vibrio metschnikovii* bacteremia in a patient with cholecystitis. *J Clin Microbiol* 1981;14:711-2.
28. Haghghi L, Walch NS. Isolation of *Vibrio parahaemolyticus* from Persian Gulf. *J Trop Med Hyg* 1978;81:255-70.
29. Hernandez-Lopez J, Gollas-Galvan T, Magallon-Barajas F, et al. Isolation of *Vibrio* and *Pseudomonas* from brown shrimp (*Penaeus californiensis* Holmes) intestine. *Rev Latinoam Microbiol* 1997;39:109-15.