

## Bazı Balık Türlerinden ve Kum Midyelerinden (*Venus gallina*) *Vibrio parahaemolyticus* İzolasyonu ve İdentifikasyonu\*

Ayşegül AYDIN

Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Bornova, İzmir - TÜRKİYE

Ece SOYUTEMİZ

Uludağ Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, Bursa - TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 04.06.2001

**Özet:** Balık ve kum midyelerinde *Vibrio parahaemolyticus*'un izolasyon ve identifikasyon metodunun yerleştirilerek varlığının araştırılması amacıyla bu çalışma yapılmıştır. Haziran 1998-Haziran 2000 tarihleri arasında yapılan çalışmada Bursa'daki balık marketlerinden alınan 14 adet hamsi, 12 adet mezzgit, 10 adet istavrit ve 10 adet sardalya olmak üzere toplam 46 adet balık numunesinde ve Batı Karadeniz sahillerinde bulunan çift kabuklu yumuşakça üretim ve avcılık alanlarından Sakarya ve Kocaeli illerine bağlı farklı istasyonlardan elde edilen 70 canlı kum midyesi örneğinde *V. parahaemolyticus*'un varlığı araştırıldı.

Balık örneklerinde *V. parahaemolyticus*'a rastlanılmadı. Kum midyelerine ait toplam izolasyon sayısının 10 adet (%14,3) olduğu saptandı. Tüm *V. parahaemolyticus* izolatlarının üreyi hidrolize etmediği ve Kanagawa negatif olduğu bulundu.

**Anahtar Sözcükler:** *Vibrio parahaemolyticus*, balık, kum midyesi (*Venus gallina*)

### Isolation and Identification of *Vibrio parahaemolyticus* in Some Fish Species and Clams (*Venus gallina*)

**Abstract:** This study was performed to establish techniques used in the isolation and identification of *Vibrio parahaemolyticus* and investigate the presence of *V. parahaemolyticus* in fish and clams. Between June 1998 and June 2000, a total of 46 fish samples including 14 anchovies, 12 whiting, 10 horse mackerel and 10 sardines collected from fish markets in Bursa and a total of 70 clam samples collected from shellfish stations in Sakarya and Kocaeli districts were tested for *V. parahaemolyticus*.

Fish samples were found to be free of *V. parahaemolyticus*. It was detected that total isolation from clams was 10 (14.3%). All the *V. parahaemolyticus* isolates were Kanagawa and urea hydrolysis negative.

**Key Words:** *Vibrio parahaemolyticus*, fish, clam (*Venus gallina*)

### Giriş

Birçok bilinen gıda zehirlenmesi sendromları çeşitli gıdalardan kaynaklanırken deniz ürünleri *Vibrio parahaemolyticus* (*V. parahaemolyticus*)'tan ileri gelen gıda zehirlenmelerinde hemen hemen tek kaynak olarak gösterilmektedir (1). *V. parahaemolyticus* Japonya'da ve diğer dünya ülkelerinde hem gıda kökenli zehirlenmelerin nedeni olarak, hem de sağlığı etkileyen bir risk faktörü olarak kabul edilmektedir. Bu mikroorganizmanın ılık kıyı sularında yaygın şekilde bulunması, bu sularda avlanan deniz ürünlerinin dağıtımının, depolanmasının ve hatta işlenmesinin uygun koşullarda yapılmaması

kontaminasyon riskini yükseltirken, üreme hızının da yüksek oluşu enfeksiyonda önemli bir faktör olarak ortaya çıkmakta ve zehirlenmelerin temel kaynağını oluşturmaktadır (2,3).

Su ürünleri ihracatımızda bir problem olarak karşımıza çıkan önemli bir parametreyi oluşturduğu gözönünde bulundurularak, Batı Karadeniz bölgesinde bulunan çift kabuklu yumuşakça üretim ve avcılık istasyonlarından elde edilen canlı kum midyelerinde ve Bursa'daki balık marketlerinden satın alınan balıklarda *V. parahaemolyticus*'un varlığının tespit edilmesi amacıyla bu çalışma gerçekleştirilmiştir.

\* Bu çalışma aynı isimli doktora tezinden özetlenmiştir.

## Materyal ve Metot

### Materyal

*V. parahaemolyticus*'un varlığını saptamak amacıyla Haziran 1998-Haziran 2000 tarihleri arasında yapılan çalışmada kullanılan balıklar Bursa'daki balık marketlerinden temin edilerek aseptik koşullarda laboratuvara getirildi. Bu amaçla 14 adet hamsi, 12 adet mezigit, 10 adet istavrit ve 10 adet sardalya olmak üzere toplam 46 adet balık numunesi materyal olarak kullanıldı. Canlı kum midyeleri ise çift kabuklu yumuşakça üretim ve avcılık alanlarının kontrolü amacıyla Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Bursa İl Kontrol Laboratuvarı Müdürlüğü'ne gönderilen numunelerden elde edildi. Bu amaçla Batı Karadeniz sahillerinde yer alan Sakarya iline bağlı 47, 48, 49 numaralı istasyonlardan ve Kocaeli iline bağlı 34, 35, 36 numaralı istasyonlardan elde edilen toplam 70 adet canlı kum midyesi örneği materyal olarak kullanıldı.

### Metot

#### Numunelerin Hazırlanması

Balıklar iç organları ayrıldıktan sonra bütünüyle parçalandı ve aseptik bir şekilde 25 g tartıldı. Kum midyelerinin ise kabukları ayrıldıktan sonraki kabuklar arası sıvısı ve etinden 25 g tartıldı (4).

#### Zenginleştirme

25 g olarak tartılan numuneler zenginleştirme amacıyla % 3 NaCl içeren alkali peptonlu sıvı (225 ml) besiyerine ilave edildi ve stomacherde homojenize edildi. 37 °C'de 18-24 saat inkübasyona bırakıldı (5).

#### İzolasyon ve İdentifikasyon

Zenginleştirme vasatından bir öze dolusu alınarak Thiosulphate Citrate Bile Salt Sucrose (TCBS) Agar'a FDA'nın belirttiği şekilde çizme yöntemi ile ekim yapıldı (4). Bu petriyerler 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda TCBS agarda üreyen 2-3 mm çapında, yuvarlak, yeşil veya mavi-yeşil renkli koloniler şüpheli koloni olarak değerlendirildi. Gram negatif, düz veya kıvrık çomakçık şeklinde görülen koloniler seçilerek oksidaz testi uygulandı. Oksidaz pozitif sonuç veren *V. parahaemolyticus* şüpheli kolonilerden Tryptone Soya Agar (TSA)'a pasaj yapıldı ve 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. Subkültürü yapılan bu koloniler gerekli diğer biyokimyasal ve fizyolojik testler için kullanıldı. TSA'dan alınan koloniden Triple Sugar Iron

(TSI) Agar'a ekim yapıldı. 37 °C'de 24 saat inkübasyonu sonunda laktoz ve glukoz fermentasyonu, gaz ve H<sub>2</sub>S oluşumu değerlendirildi. β-galaktosidaz testi negatif, salisin, sellobiyoz, sukroz testleri negatif, arabinoz testi pozitif veya negatif, Hugh-Leifson's O/F besiyerinde ise mikroorganizmanın oksidatif ve fermentatif olarak glukozu fermentasyonu pozitif / pozitif, mannitol ve hareketlilik pozitif, lizin dekarboksilaz pozitif, ornitin dekarboksilaz pozitif veya negatif ve arjinin dihidrolaz negatif, %3 NaCl içeren TSA besiyerinde 42 °C'de üreme pozitif, NaCl içermeyen ortamda üreme negatif ve %3, 6, 8 NaCl içeren Tryptone Soya Broth'da üreme pozitif ve %10 NaCl içeren ortamda üreme negatif olan, üre pozitif veya negatif, indol pozitif, 2,4-diamino-6,7-di-isopropylpteridine phosphate içeren O129 150 µg'lık Vibriostat diske duyarlılık testinde duyarlı bulunan, koloniler *V. parahaemolyticus* olarak değerlendirildi. Ayrıca Wagatsuma Agar'da eritrositlerde oluşan hemoliz sonucu koloni etrafında oluşan zon oluşumuna göre Kanagawa reaksiyonu belirlendi (4-10).

### Bulgular

Tablo-1'de çift kabuklu yumuşakça üretim ve avlanma alanlarından alınan canlı kum midyesi örneklerinin gönderildiği illerdeki istasyonlara göre *V. parahaemolyticus*'un izolasyon sayıları verilmektedir.

Analiz bulguları çerçevesinde 46 adet balık örneğinde *V. parahaemolyticus*'un varlığına rastlanmadı. Analize alınan canlı kum midyesi örneklerinde 47 numaralı istasyondan alınan 5 örnekte 1'inde, 49 numaralı istasyondan alınan 13 örnekte 2'sinde, 34 numaralı istasyondan alınan 13 örnekte 2'sinde, 35 numaralı istasyondan alınan 13 örnekte 3'ünde, 36 numaralı istasyondan alınan 13 örnekte 2'sinde *V. parahaemolyticus* izole edilirken, 48 numaralı istasyondan alınan 13 canlı kum midyesi örneğinde etken bulunmadı. Toplam 70 adet canlı kum midyesi örneğinin 10'unda (%14,3) *V. parahaemolyticus* bulundu. Pozitif olarak bulunan sonuçlar, Kasım 1998'de 36, 47, 49 numaralı istasyonlardan, Ocak 1999'da 34, 35, 36 numaralı istasyonlardan, Şubat 1999'da 34, 35, 49 numaralı istasyonlardan, Eylül 1999'da 35 numaralı istasyondan elde edildi. Elde edilen bütün *V. parahaemolyticus* izolatlarının üreyi hidrolize etmediği ve Kanagawa negatif olduğu saptandı.

Tablo 1. Kum midyesi örneklerinin elde edildiği illerdeki istasyonlara göre dağılımları, pozitif *V. parahaemolyticus* sayıları.

İstasyonlar	İller		Sakarya			Kocaeli		
	Toplam		47 numaralı istasyon	48 numaralı istasyon	49 numaralı istasyon	34 numaralı istasyon	35 numaralı istasyon	36 numaralı istasyon
	PS/NS	%P	PS/NS	PS/NS	PS/NS	PS/NS	PS/NS	PS/NS
Canlı kum midyesi	10/70	%14,3	1/5	0/13	2/13	2/13	3/13	2/13

PS/NS: Pozitif Sayı/Numune Sayısı    %: Pozitif sonuçların yüzde oranı

## Tartışma

Bu çalışmada, Bursa'daki balık marketlerinden satın alınan 46 deniz balığı örneğinin hiçbirinde *V. parahaemolyticus* izole edilmemiştir. İnal ve ark. (11), 1971 yılında 299 deniz balığından bir örnekte *V. parahaemolyticus*'un elde edildiğini, yine 1971 ve 1972 yıllarında yaptıkları bir başka araştırmada Karadeniz'de Samsun-Sinop arasındaki kıyıda yaz mevsiminde avlanan balıklarda 53 örnekte 37 pozitif sonuç elde edildiğini bildirmektedirler (12). Binta ve ark. (13), Kenya'da 370 deniz balığının %1,4'ünde, Schandevyl ve ark. (14), Senegal'de kıyı sularından elde edilen 128 deniz balığından %21 oranında, Fang ve ark. (15), Tayvan'daki balık örneklerinde %40, Wong ve ark. (16), Hong Kong, Endonezya, Tayland ve Vietnam'dan Tayvan'a ithal edilen balıklarda %29,3 oranında *V. parahaemolyticus*'un bulunduğunu rapor etmişlerdir. Franca ve ark. (17), Brezilya'da 64 balık örneğinden % 4,68, Torres Vitela ve Fernandez Escartin (18), Meksika'daki balıklardan % 71,4 oranında etkeni izole ettiklerini, Zaleski ve ark. (19) da, Güney Baltık Denizi'nden elde ettikleri 541 balık örneğinin hiçbirinde etkene rastlamadıklarını açıklamaktadırlar. Bulgularımız Zaleski ve ark.'nın (19) bulguları ile paralellik göstermektedir.

Bu çalışmada, 70 adet canlı kum midyesinin 10 tanesinde (%14,3) *V. parahaemolyticus* izole edilmiştir. Akalın ve Tuna (20), 583 su ürününün %11,5'inde *V. parahaemolyticus*'u izole ettiklerini, ürünlere göre izolasyon sıklığının ise midyelerde %7,3 olduğunu bildirmişlerdir. Karaçam ve ark. (21), Trabzon sahillerindeki 3 farklı istasyondan birine ait midyelerde hiç izolasyon olmadığını bildirirken, iki istasyonda aylara göre değişiklik gösteren 3-3,47 log.bakteri sayısı/g arasında etkeni izole ettiklerini açıklamışlardır. Şentürk (22),

Çanakkale, Marmara ve Karadeniz Bölgesi istasyonlarından elde ettikleri kum midyelerini taze, haşlanmış ve dondurulmuş olarak incelemiş ve etkene rastlamadığını bildirmiştir. Çaklı ve ark. (23), ise İzmir Körfezi'nin farklı istasyonlarından toplanan akivadeslerde etkenin bulunmadığını rapor etmişlerdir. Awad ve El Shater (24), Mısır'da iki ayrı şehirdeki marketlerden toplanan 20 istiridye örneğinin %15'inde etkeni izole ettiklerini bildirirken, bulunma oranı açısından bulgularımıza uyum göstermektedir. Fang ve ark. (15), Tayvan'da 770 deniz ürününden 352'sinde etkeni izole ettiklerini ve bu ürünlerin içinde çift kabuklu yumuşakçaların %68,7 izolasyon sıklığı ile ilk sırada yer aldığını, Torres Vitela ve Fernandez Escartin (18), Meksika'da istiridyelerde % 44, Franca ve ark. (17), Brezilya'da 36 kabuklu örneğinde % 19,9, Binta ve ark. (13), Kenya'da 214 kabuklu örneğinde % 22,4, Van den Broek ve ark. (25), Hollanda'da 23 midye örneğinde % 26, Berzero ve ark. (26), İtalya'da 284 kabuklu örneğinde % 4,3 etkene rastlamışlardır. Bu çalışmada, farklı istasyonlardan alınan kum midyelerinden elde edilen değerler arasında %23,07'ye ulaşan farklılıklar tespit edilmiş olup gerek Türkiye'de gerekse yurt dışında yapılan çalışmalarda çeşitli deniz ürünlerine ait *V. parahaemolyticus*'un izolasyon oranları büyük farklılıklar göstermektedir. Ürünlerin farklı bölgelerden elde edilmiş olmasının ve elde edildikleri suların hijyenik kalitesinin etkenin bulunma oranı üzerinde etkili olduğu düşünülmektedir.

Ayrıca çalışmamızda canlı kum midyelerinden elde ettiğimiz bütün izolatlardan Kanagawa negatif olduğu ve üreyi hidrolize etmediği saptanmıştır. Bulgularımız deniz ürünlerinde Kanagawa negatif suşların yaygın olduğu görüşü ve bazı araştırmacıların deniz ürünlerinden izole

ettikleri suşların Kanagawa negatif olduğu yönündeki bulgularıyla paralellik göstermektedir (13,27,28,29). Ancak, Akalın ve Tuna (20) deniz ürünlerinden izole ettikleri suşların % 44,8 oranında, Abdelnoor ve Roumani (30) de izole ettikleri 3 suştan 2'sinin Kanagawa pozitif olduğunu bildirmiştir. Honda ve ark. (31), üreaz pozitif suşların ençok klinik izolatlardan elde edildiğini (204 suştan %11,2), dondurulmuş deniz ürünlerinde bu oranın %5,7 olduğunu ve deniz suyundan elde edilenlerin ise üreaz negatif olduğunu rapor etmektedirler. Buna karşılık Akalın ve Tuna (20), deniz suyu ve deniz ürünlerinden izole ettikleri toplam 98 suşun % 8,2'sinde üre hidrolizini pozitif bulduklarını bildirmişlerdir. Kaysner ve ark. (32), Washington'da deniz suyu, istiridye ve sedimentte etkenin % 71,5 oranında bulunduğunu ve % 58,4'ünün üreyi hidrolize ettiğini açıklamışlardır. Wong ve ark. (33),

Tayvan'da 1992 ve 1995 yılları arasında oluşan gıda kökenli zehirlenmelerden elde edilen 371 izolatin % 4'ünün üreaz pozitif olduğunu, % 92,4'ünün ise Wagatsuma agarda  $\beta$ -hemoliz oluşturduğunu saptamıştır.

Etkenin kum midyelerindeki %14,3'lük izolasyon oranı, Türkiye'de sağlıklı su ürünleri tüketimini sağlayarak halk sağlığının korunması gerektiğini ortaya koymaktadır. Balıklar, *V. parahaemolyticus* bakımından halk sağlığı üzerinde bir risk faktörü olarak görülmemesine rağmen, kirlilik oranının yükseldiği sularımızda olası bir durumla karşılaşmamak için avlandıktan sonra tüketiciye sunuluncaya kadar geçen tüm aşamalarda gerekli hijyenik tedbirlerin alınması yanında özellikle kum midyelerinden elde edilecek ürünlerde pişirme işlemi önem kazanmaktadır.

## Kaynaklar

1. Jay, J.M.: Modern food microbiology, 4<sup>th</sup> edition, Van Nostrand, Reinhold, New York, 583-590, 1992.
2. Twedt, R.M.: *Vibrio parahaemolyticus*. Foodborne bacterial pathogens, Marcel Dekker, Inc., Basel, 544-597, 1989.
3. Ünlütürk, A., Turantaş, F.: Gıda mikrobiyolojisi, Mengi Tan Basımevi, İzmir, 128-132, 1998.
4. Elliot E.L., Kaysner, C.A., Jackson, L., Tamplin, M.L.: Bacteriological analytical manual. Food and drug administration, 8<sup>th</sup> edition, AOAC International, 481 North Frederick Avenue, Suite 500, Gaithersburg, USA, 9.01-9.27, 1995.
5. Roberts, D., Hooper, D.G., Farkas, D.F.: Practical food microbiology, 2<sup>nd</sup> edition, Public Health Laboratory Service, London, 155-157, 209-210, 1995.
6. Barrow, G.I., Feltham R.K.A.: Manual for the identification of medical bacteria, Cowan and Steels, 3<sup>rd</sup> edition, Cambridge University Press, Cambridge, 121-128, 1993.
7. Kaysner, C.A., Tamplin, M.L., Twedt, R.M.: *Vibrio*. Vanderzant, C., Splittstoesser, D.F. Compendium for the microbiological examination of foods, 3<sup>rd</sup> edition, Washington, 451-473, 1992.
8. Baumann, P., Schubert, R.H.W.: Facultatively anaerobic gram negative rods, Vibrionaceae. Krieg, N.R., Holt, J.G. Bergey's manual of systematic bacteriology, Williams and Wilkins, Baltimore, 516-550, 1984.
9. Sakazaki, R., Shimada, T.: *Vibrio* species as causative agents of foodborne injection. Robinson, R.K. Developments in food microbiology 2, Elsevier Applied Science Publishers, London, 123-151, 1986.
10. Bekar, M.: Enterobacteriaceae familyası mikroorganizmaların genel karakterleri ve tanı yöntemleri, Kariyer Matbaacılık Limited Şirketi, Ankara, 69-92, 1997.
11. İnal, T., Yurtyeri, A., Ambarcı, İ.: Untersuchungen über das Vorkommen von *Vibrio parahaemolyticus* im Jahre 1971 in der Türkei. Die Fleischwirtschaft. 1973; 53 (9): 1299.
12. İnal, T., Yurteri, A., Ambarcı, İ., Tolgay, Z., Tezcan, İ.: Untersuchungen über das vorkommen von *Vibrio parahaemolyticus* an der Schwarzmeerküste der Türkei. Alimenta. 1977; 16: 129-133.
13. Binta, G.M., Tjaberg, T.B., Nyaga, P.N., Valland, M.: Market fish hygiene in Kenya. J. Hygiene. 1982; 89 (1): 47-52.
14. Schandevyl, P., Van Dyck, E., Piot, P.: Halophilic *Vibrio* species from seafish in Senegal. Appl. Environ. Microbiol. 1984; 48 (1): 236-238.
15. Fang, S.W., Huang, W.W., Chen, L.H.: Contamination of seafood by *Vibrio parahaemolyticus* in Taiwan. Chinese J. Microbiol. Immunol. 1987; 20 (2): 140-147.
16. Wong, H.C., Chen, M.C., Lui, S.H., Lui, D.P.: Incidence of highly genetically diversified *Vibrio parahaemolyticus* in seafood imported from Asian countries. Int. J. Food Microbiol. 1999; 52(3): 181-188.
17. Franca, S.M., Gibbs, D.L., Samuels, P., Johnson, W.D.: *Vibrio parahaemolyticus* in Brazilian coastal waters. J. Am. Med. Assoc. 1980; 244 (6): 587-588.
18. Torres Vitela, M.R., Fernandez Escartin, E.: Incidence of *Vibrio parahaemolyticus* in raw fish, oysters, and shrimp. Rev. Latinoamericana. Microbiol. 1993; 35 (3): 267-272.
19. Zaleski, S., Dackowska, E., Fik, A., Dzido, E., Gracz, J.: Surveys on the occurrence of *Vibrio parahaemolyticus* on fish caught in the Southern Central Baltic Sea in comparison with other European results. Zbl. Bakteriol. (B). 1975; 161(3): 288-294.

20. Akalin, N., Tuna, İ.: Bornova veteriner kontrol ve araştırma enstitüsünde 1998-1999 yıllarında muayene edilen çift kabuklu yumuşakça ve deniz suyu örneklerinde *Vibrio parahaemolyticus* izolasyonu. Bornova Vet. Kont. Araşt. Enst. Derg.1999; 38: 85-90.
21. Karaçam, H., Boran, M., Köse, S.: Trabzon sahillerindeki midyelerde (*Mytilus galloprovincialis*) bakteriyel kontaminasyon. Akdeniz Balıkçılık Kongresi, İzmir, 377-382, 1997.
22. Şentürk, A.: Kum midyelerinin (*Chamelea gallina* L.1758) işlenmesi ve mikrobiyolojik kriterlerinin belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi Fen Bil. Enst., İstanbul, 1997.
23. Çaklı, Ş., Hindioğlu, A., Arda, M.: İzmir körfezinden farklı istasyonlardan toplanan akivadeslerin (*Tapes decussatus*, L.1758) mikrobiyolojik kalite kontrolleri. Akdeniz Balıkçılık Kongresi, İzmir, 849-856, 1997.
24. Awad, H.A., El Shater, M.A.: Microbiological status and the depuration of the Egyptian oysters. Vet. Med. J. Giza. 1997; 45 (3): 337-343.
25. Van den Broek, M.J., Mossel, D.A., Eggenkamp, A.E.: Occurrence of *Vibrio parahaemolyticus* in Dutch mussels. Appl. Environ. Microbiol.1979; 37 (3): 438-442.
26. Berzero, R., Crescente, M.D., Zaffalon, C.: *Vibrio parahaemolyticus* in mollusks. Giornale di Batteriologia, Virologia ed Immunol. 1982; 75 (7-12): 264-272.
27. Doyle, M.P., Cliver, D.O.: *Vibrio*. Foodborne disease. Academic Press, Inc., 242-245, 1990.
28. Saha, M.R., Sen, D., De, S.P., Sircar, B.K., Sengupta, P.G., Deb, B.C., Pal, S.C.: Kanagawa phenomenon and serotypic pattern of *Vibrio parahemolyticus* strains isolated from various sources in Calcutta. Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg. 1982; 76 (6): 786-789.
29. Binta, M.G., Nyaga, P.N.: The distribution of *Vibrio parahaemolyticus* serotypes in Kenyan seafish, shellfish, marine water and sediment. Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg. 1982; 76 (4): 497-499.
30. Abdelnoor, A.M., Roumani, B.M.: Characterization of some *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated from seafoods in Lebanon. Zbl. Bakteriol. (B). 1980; 170 (5-6): 502-507.
31. Honda, S., Matsumoto, S., Miwatani, T., Honda, T.: A survey of urease-positive *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated from traveller's diarrhoea, seawater and imported frozen seafoods. Eur. J. Epidemiol. 1992; 8 (6): 861-864.
32. Kaysner, C.A., Abeyta, C. Jr., Stott, R.F., Lijja, J.L., Wekell, M.M.: Incidence of urea-hydrolyzing *Vibrio parahaemolyticus* in Willapa Bay, Washington. Appl. Environ. Microbiol. 1990; 56(4): 904-907.
33. Wong, H.C., Lui S.H., Ku, L.W, Lee, I.Y., Wang, T.K., Lee, Y.S., Lee, C.L., Kuo, L.P., Shih, D.Y.: Characterization of *Vibrio parahaemolyticus* isolates obtained from foodborne illness outbreaks during 1992 through 1995 in Taiwan. J. Food Protect. 2000; 63 (7): 900-906.