

شناسایی گونه های پاتوژن ویبریوناسه (Vibrionaceae) در رودخانه کارون اهواز

حامد گودرزی¹، نرسی نصیرآبادی²، منیژه مهدی نژاد²

1- دانشجوی کارشناسی ارشد گروه میکروب شناسی و عضو کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران

2- کارشناس آزمایشگاه، گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران

چکیده

زمینه: بیماری وبا یک عفونت حاد روده ای می باشد که توسط باکتری ویبریو کلرا ایجاد می شود. ترس از این بیماری به خاطر اپیدمیک شدن آن بوده و همواره به عنوان یک تهدید برای سلامتی در بخش های بزرگی از آسیا، آفریقا و آمریکای لاتین مطرح بوده است. ویبریو کلرا دارای دو سروتایپ اصلی اوگاوا و اینابا می باشد که در خانواده ویبریوناسیه قرار می گیرد. این ارگانسیم از طریق خوردن آب، سبزیجات و مواد غذایی که آلوده به مواد مدفوعی بوده، همچنین در اثر خوردن غذاهای دریایی خام و یا غذاهایی که خوب حرارت ندیده باشند مثل صدف، انتقال می یابد. هدف اصلی این مطالعه جداسازی ویبریو کلرای (O1) (V. cholera) از آب رودخانه کارون می باشد.

روش: در طول چهار ماه تعداد 100 نمونه از آب رودخانه کارون گرفته شد. در حین نمونه گیری درجه حرارت آب رودخانه بین 25-35 درجه سانتیگراد و pH آن از 7-8 بود. نمونه های آب جمع آوری شده بوسیله سانتریفیوژ با دور 6000 تغلیظ شد و در آب پیتونه قلیایی انکوبه گردید. بعد از 24 ساعت اینکوبه شدن به داخل محیط اختصاصی ویبریو (TCBS آگار) انتقال داده شد و کلونی های که از نظر مورفولوژیکی شبیه ویبریوکلرا بودند از نظر تستهای بیوشیمیایی و کیت های API20E، آنتی سرم های اختصاصی تایید گردید.

نتایج: گونه های ویبریوکلرا از نمونه های آب رودخانه کارون جدا گردید، که از این موارد 8 نمونه به عنوان ویبریوکلرا O1، (اینابا) و 1 مورد نیز با مشخصات کلونی ویبریو پاراهمولیتیکوس شناسایی گردید.

نتیجه گیری: کنترل بیماری وبا بخاطر تهدید سلامت عمومی بسیار اهمیت دارد، به همین خاطر بهبود کیفیت آب، بهداشت آب، نظارت، تامین تسهیلات مراقبتی و تهیه واکسن مناسب همواره مد نظر می باشد.

واژگان کلیدی: ویبریوکلرا O1، نمک دوست، رودخانه کارون

*نشانی نویسنده مسئول: حامد گودرزی، ایران، اهواز، جاده ی گلستان، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور، دانشکده پزشکی گروه میکروب شناسی
تلفن: 3201588-0611
موبایل: 9911/058911
پست الکترونیک: goodarzi200055@yahoo.com

تاریخ پذیرش: 90/4/6

تاریخ دریافت: 90/1/15

مقدمه

جنس ویبریو شامل گروه های متنوعی از ارگانیسیمهای دریایی می باشد که در آبهای سطحی در سرتاسر دنیا یافت شده و شامل 36 گونه بوده که 11 گونه از آنها در انسان ایجاد بیماری می نمایند. جنس ویبریو در خانواده ویبریوناسه قرار دارد که از نظر مورفولوژی بصورت باسیلهای خمیده توصیف گردیده اند و گاهی ویبریوها بصورت باسیلهای گرم منفی مستقیم که شدیداً پلئومرفیک می باشند مشاهده شده اند بویژه مواقعی که شرایط تکثیر باکتری چندان مطلوب نباشد. بعضی از گونه ها هالوفیلیک بوده و به کلرید سدیم برای تکثیر نیاز دارند. همچنین فلاژل قطبی و واکنش اکسیداز مثبت خصوصیتی هستند که ویبریوناسه را از انتروباکتریاسه متمایز می نماید. دمای مطلوب جهت تکثیر ویبریوها 28-42°C است و در زیر 4°C و بالای 60°C قادر به تکثیر نمی باشند. زیستگاه طبیعی (کنج اکولوژیکی) گونه های ویبریو، آبهای شور و محیطهای دریایی بویژه مناطق حاره ای در دنیا می باشد. *V. mimicus* و *V. cholerae* دو گونه از جنس ویبریوناسه هستند که از آبهای شیرین، دریاچه ها، رودخانه ها و از پرندگان ماهیخوار یافت شده اند. همچنین گونه های ویبریو را می توان در رسوبات سطحی و سطح خارجی نرمتان و سخت پوستان یافت می شوند (لوا). تقریباً تمامی گونه های این جنس در 2 سال گذشته شناخته شدند و هیچ یک از آنها قسمتی از فلور نرمال روده انسان نمی باشند. تعداد زیاد گونه های حاضر و پخش و پراکنش ویبریوها باعث شده که از آب، محیط زیست، غذاهای دریایی، نرمتان و ماهیان ساحلی بدست بیایند (3,4). همچنین در خیلی اوقات در مناطق ساحلی ژاپن، مصرف خام ویا نپختن صدفها و نرمتان دریایی باعث آلودگی با ویبریو می گردد.

از جمله گونه های ویبریو شامل :

Vibrio cholerae, *Vibrio. parahaemolyticus*, and *Vibrio. vulnificus* که از نظر بهداشت همگانی عامل پتانسیلی جهت همه گیر شدن جهانی محسوب می گردد. در این جنس علاوه بر ویبریوکلرا (*V. cholerae*) که مهمترین گونه از نظر بیماریزایی و علم اپیدمیولوژی در انسان محسوب شده، با دو بیوتاایپ التور (*EL-Tor biotype*) و کلاسیک ایجاد وبای کلاسیک در انسان می نمایند. گونه مهم دیگری

به نام ویبریو پاراهمولیتیکوس (*V. parahaemolyticus*) عامل عفونتهای متفاوتی در انسان می باشد و به دنبال مصرف غذاهای دریایی مثل نرمتان، صدفها، میتیلوسها، اویسترها، ماهیان و میگوها آلوده ایجاد گاستروآنتریت نموده و *V. vulnificus* که در ایجاد ضایعات پوستی شدید و یا جراحات خونی در افرادی که با مصرف صدف و سایر جانوران دریایی بصورت خام و یا نپخته نقش داشته و نیز گاهی با آنتریت، باکتری می و حتی مرگ در افراد مسن و ضعیف در رابطه است (5).

ویبریو کلرا عامل وبا پاندمیک و اپیدمیک در انسان می شود. در اواسط 1930 مشاهده گردید که همه سویه های باکتری با یک آنتی سرم واحد بنام O1 آگلوتینه می گردند که از این جهت این سویه ها را بنام ویبریو کلرا O1 می نامند و بر اساس *Ag O* به 150 سروتاایپ تقسیم شده و از این میان تنها سروتاایپ های O1 و O139 عامل بیماری وبا بوده. در صورتیکه، سویه های ویبریوکلرا غیر O1 به ندرت بیماری شبه وبا را ایجاد می نمایند. ویبریو کلرا به سه بیوگروه *Ogava, Inaba, Hikojima* تقسیم می شوند. شدت بیماری هایی که به وسیله بیوتیپ کلاسیک و بیوتیپ التور ویبریوکلرا ایجاد شده متغیر می باشد و حدود 15% عفونتهای بیوتیپ التور و حدود 60% از عفونت های بیوتیپ کلاسیک بدون علامت هستند. بیماری ایجاد شده توسط بیوتیپ کلاسیک در 30% موارد عفونت ملایم و در 10% موارد عفونت شدید گزارش شده در حالیکه التور، 23% بیماری خفیف و فقط 2% بیماری شدید تولید می کنند (6,7).

فاکتورهای واگیر O139 و مشابه با سروتاایپ O1 بوده و جزئیات کامل آنالیزها نشان می دهد که *V. cholerae O139* شباهتی با بیوتاایپ التور O1 داشته (8) به استثناء حضور کپسول پلی ساکاریدی و تفاوت آنتی ژنی در جسم O1 (9).

V. cholerae non-O1/ non-O139 بیانگر سروتاایپ ناهمگن بوده بطوریکه عاری از ژنهای واگیردار مشترک از سروتاایپهای O1, O139 می باشند (ژنهای بیماریزایی نظیر *Ctx, tcp A* و ...) اما به ندرت سروتاایپ های *V. cholerae non-O1/ non-O139* به دلیل دارا بودن ژنهای شبه توکسینی دو سروتاایپ O1 و O139 عامل اسهال شبیه وبا و سایر عفونتهای روده ای نظیر

خانه ها، در محدوده شهر اهواز با طول جغرافیایی "2U، 48.68° عرض جغرافیایی "2U، 31.25° در شش ماهه اول (از فروردین تا شهریور ماه) سال 1389 انجام گردید (تصویر 1). از محل کانال به فاصله 100 متر بالاتر و 100 متر پایین برای هر کانال انتخاب شد. نمونه های آب داخل شیشه های استریل با ظرفیت 50 cc جمع آوری و سپس در کلمنهای مخصوص همراه با یخ خشک با دمای °C 4 نکه داری و در کوتاهترین زمان به آزمایشگاه منتقل گردید. سپس در شرایط استریل 10 cc از نمونه آب خام، به لوله های استریل مخصوص سانتریفوژ منتقل شد. لوله ها به مدت 15 دقیقه با 6000 دور در دقیقه سانتریفوژ شد. سپس محلول سطحی را دور ریخته و 1-2 cc باقیمانده نمونه را به 10 cc آب پپتون قلیایی (Alkaline peptone water) استریل با 1% نمک (NaCl) منتقل شد.

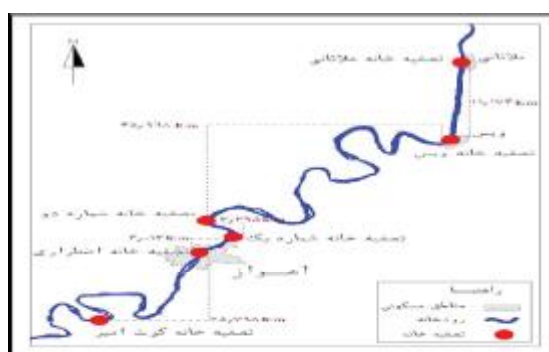
بعد از 4-6 h ساعت انکوبه در دمای °C 37 از محیط کشت آب

گاستروانتریت و حتی عفونت های زخم و سپتی سمی در افراد مستعد در جامعه می باشد. ویبریوکلرای *non O1 Vibrio Thvialis, V.furnisii, V. harveyi, V. metschnikovii, V. cincinnatiensis, V. proteolyticus, V. campbellii, V. natriegens* می باشند (10, 11, 12).

به دلیل تماس فراوان جامعه شهری و روستایی با آب رودخانه کارون، در صورت حضور گونه های پاتوژن ویبریوکلرا می تواند همواره به عنوان یک تهدید بزرگ برای سلامت عمومی باشد. به همین خاطر این مطالعه به منظور بررسی حضور و شیوع بیوتایپ های مربوطه انجام شد

روش

نمونه برداری از آب رودخانه کارون از مکان کانالهای خروجی فاضلاب ها به رودخانه کارون در چهار تراک (بالاتر و پایینتر از خروجی فاضلاب) و از محلهای ورودی آب رودخانه به تصفیه



تصویر شماره 1: مکان های نمونه برداری از آب رودخانه کارون

بر روی محیط (KIA) که بصورت واکنش اسید/قلیایی بوده، از نظر حضور آنزیم اکسیداز به وسیله تست اکسیداز بررسی شد. ویبریوکلرا یک ارگانسیم اکسیداز مثبت می باشد، بنابراین از این مرحله به بعد تستهای بیوشیمیایی - افتراقی بر روی کلنی های اکسیداز مثبت انجام شد. کلونی های رشد یافته بر روی محیط KIA، به داخل کیت های استاندارد API 2UE نیز برده شد و بعد از 24 ساعت انکوباسیون در دمای °C 37 درجه سانتیگراد و از روی جدول پیوستی کیت تشخیص اولیه ویبریوکلرای *O1 V.cholerae* انجام گردید. بعد از انجام تست API 2UE، با روش مقایسه ای آگلوتیناسیون با آنتی سرم پلی والان، *O1 V.cholerae* تایید گردید و با انجام یک تست آگلوتیناسیون تکمیلی دیگر به

پپتون قلیایی (Alkaline peptone water (APW) با لوپ بر روی محیط اختصاصی تیوسولفات سترات بایل سوکروز آگار Thiosulfate Citrate Bile Salts Sucrose agar (TCBS) کشت و سپس در انکوباتور با دمای °C 37 به مدت 24-18 ساعت نکه داری گردید. کلنیهای رشد یافته بر روی این محیط دو نوع مختلف بود، که ویبریوکلرا کلونی های زرد رنگ و ویبریو پاراهمولیتیکوس کلونی های سبز رنگ را ایجاد نمودند. بنابراین از روی مشخصات ظاهر مرفولوژیکی کلونی ها نیز می توان این دو گونه از ویبریو را از هم جدا نمود. کلنیهای ایزوله شده زرد رنگ از محیط کشت TCBS آگار، به محیط کلیگلرایون آگار (KIA) منتقل شد، کلنیهای رشد یافته

کردند (16).

در مطالعه ای که توسط **Katsuaki Hoshino** و سایر همکاران در سال 1988 در توکیو ژاپن بر روی 121 بیمار با بیماری عفونی که به مرکز درمانی مراجعه کردند بکمک روش PCR، مورد بعنوان ویبریوکلرای O139 و O1 شناسایی شدند که همگی واجد ژنهای CTX بودند (17).

Thomson و همکاران در سال 1998 نمونه های آب از دریاچه ها، فاضلاب ها و آب های آشامیدنی شهر **Vellore** در جنوب هند را مورد مطالعه قرار دادند که از 100% نمونه های گرفته شده از دریاچه ها و از 81% نمونه های فاضلابها و از 41% نمونه های آب آشامیدنی **V.cholera non-O1** جدا گردید (18).

Visser و همکاران در سال 1999، **V.cholera** را از حیوانات اهلی مثل گوسفند و گاو میش که مبتلا به اسهال بودند، جدا کردند. همچنین از آب های سطحی نزدیک استبلهای حیوانات اهلی نیز این باکتری را پیدا نمودند (19).

در ایالات متحده **Dalsgaard** و سایر همکاران در سال 2000 موارد زیادی از بیماری گاستروانتریت **V.cholera non O1** در اواخر تابستان گزارش شده است که سویه های **V.cholera non-O1** در محیط زیست آب افزایش می یابند و رابطه مستقیمی بین درجه حرارت آب و میزان تراکم این باکتری وجود دارد (20).

در مطالعه ای که در سال 2007 توسط **Pramuan Tapchaisri** و سایر همکاران در تایلند بر روی 240 بیمار مبتلا به وبا از سال 2002-1999 انجام گردید تمام نمونه ها از نظر وجود ژنهای **CTX, Zot, ToxR, TcpA, HlyA** مثبت بودند (21).

- در مطالعه ای که توسط **Nina** و سایر همکاران در سال 2004 بر روی 13 گونه ویبریوکلرا متعلق به یک اپیدمی در سال 1942-1943 (12 گونه متعلق به بیمار و یک گونه محیطی) همگی واجد ژنهای **ctxA, ace, zot, tcpA, toxR** دخیل در بیماریزایی ویبریوکلرا بودند (22).

Miyagi و همکاران در سال 2003 از آب های دریایی از آکا در ژاپن، ویبریوکلرا جدا کردند که همه آنها بیوتیپ التور و

کمک آنتی سرمهای **Inaba** و **ogawa** این دو بیوگروه تشخیص داده شد. متأسفانه به دلیل موجود نبودن آنتی سرم O139 در ایران، تنها با روش مولکولی می توان آن را شناسایی نمود که در حیطه کاری ما نبود.

نتایج

از مجموع 100 نمونه جمع آوری آب خام از ورودی کانالهای تصفیه خانه ها در محدوده اهواز در شش ماه اول سال 1389، هشت مورد **V.cholerae O1** جدا گردید که تمام سرو تایپ های مذکور متعلق به بیوگروه اینابا بودند و در هفت مورد از نمونه های رشد یافته بر روی محیط **TCBS** سبز رنگ بوده و از نظر مورفولوژی مشابه گونه های پاراهمولیتیکوس می باشد. در این میان گونه های متعددی از خانواده انتروباکتریاسیه نیز جدا گردید.

بحث

جنس ویبریو شامل 34 گونه است که 12 گونه آن برای انسان بیماریزاست. گونه های بیماریزا این جنس بیشتر در کشورهای مانند ایالات متحده و ژاپن که فرآوردهای غذایی دریایی را به صورت خام زیاد مصرف می کنند، گزارش شده است (13). در خصوص فراوانی گونه های جنس ویبریو و بیماریزایی آنها در ایران، مطالعه گسترده ای صورت نگرفته است. فقط در مورد گونه ویبریوکلرا مطالعاتی انجام شده است که در فصل تابستان انتشار آن زیاد می شود (14).

اکثر ویبریوها نمک دوست بوده و فقط گونه های **V.mimicus, V.cholera, V.cholera non-O1** قادر به رشد در اکوسیستمهای آب شیرین هستند (15 و 13) و به همین دلیل در هنگام کشت بعضی از نمونه های آب برداشت شده از آبهای سطحی خیلی بالاتر مکان نمونه برداری (1000 متر بالاتر) از ایستگاهها روی محیط **TCBS** هیچ نوع کلنی ایجاد نمی شد.

V.cholera non O1 سویه هایی هستند که از نظر بیوشیمیایی شبیه به **V.cholera** بوده ولی قادر نیستند آنتی سرم O1 را آگلوتینه کنند. در ایالات متحده **Kape** و همکاران این ارگانیزم را از آب، رسوبات و حیوانات دریایی، همچنین از گیاه هخواران غرب کلرادو خصوصاً گاوها و خوکها جدا

بیریوکلراجدا نشد. تمامی ویریوکلراهای جدا شده مربوط به ماه های خرداد، تیر، مرداد و شهریورماه سال 1389 بودند. بیوگروپ و سرگروپ *V.cholera O1* جدا شده التور اینابا بودند. بنابراین با اثبات حضور این گونه پاتوژن ویریوکلرا *O1* در آب رودخانه کارون، احتمال آلودگی در میان افرادی که با آب در تماس بوده همواره وجود داشته و به عنوان تهدیدی بزرگ برای ورود این گونه پاتوژن در جامعه و اپیدمی شدن مطرح می باشد. بهتر است تحقیقاتی در زمینه بررسی وجود توکسین های بیماریزایی در این گونه ها در آینده صورت بگیرد.

سروتیپ اوگاوا بودند (23). در مطالعه ای که توسط **Raychoudhuri** سایر همکاران در سال 2004 - 2005 بر روی بیماران اسهالی که در بیمارستان کلکته هند بستری شده بودند، انجام گرفت، غالب نمونه های ویریوکلرا جداسازی شده از نوع ویریو کلرای *O1*، بیووار اوگاوا بوده و تعداد نمونه های *O139* ناچیز بوده. در این میان تعداد 42 گونه *O1* واجد ژنهای بیماریزایی *tcpA* و *ctx* بودند (24).

در پاییز 1383 ایزدی و همکاران 61 مورد و بیریوکلرا از آبهای سطحی و رودخانه ها جدا کردند که همه آنها بیوتیپ التور و سروتیپ اوگاوا بودند (25).

از نمونه های برداشت شده در فروردین و اردیبهشت و

References

منابع

- 1- Alsina M , Blanch A. R.A set of keys for biochemical identification of environmental *Vibrio* species. *Journal of Applied Bacteriology*. 1994; 76: 79-85.
- 2- Jesudason MV, Balaji V, Mukundan U ,Thomson CJ. Ecological study of *Vibrio cholerae* in Vellore. *Epidemiology and Infection*. 2000; 24(2):201-6.
- 3- DePaola A, Capers G.M, Alexander D. Densities of *Vibrio vulnificus* in the intestines of fish from the US Gulf coast. *Applied Environmental Microbiology*. 1994; 60: 984-988.
- 4- Feldhusen F. The role of seafood in bacterial foodborne diseases. *Microbes and Infection*. 2000;2:1651-1660.
- 5- Oliver JD , Kaper JB . *Vibrio* species. In *Food Microbiology Fundamentals and Frontiers*. Eds, MP Doyle, LR Beuchat , TJ Montville. Washington, DC: ASM Press. 1995; pp 263-300.
- 6- Blake P.A. Historical perspectives on pandemic cholera. In: *Vibrio cholerae and Cholera: Molecular to Global Perspectives*. Wachsmuth I.K., Blake P.A, Olsvik O. (Eds.). American Society for Microbiology, Washington, DC. 1995; pp. 293-295
- 7- Kaper, J.B, Morris J.G, Levine M.M. Cholera. *Clinical Microbiology*. 1995;8:48-86.
- 8- Berche P, Poyart C, Abachin E, Lelievre H, Vandepitte J, Dodin A, et al. The novel epidemic strain *O139* is closely related to the pandemic strain *O1* of *Vibrio cholerae*. *Journal of Infection Disease*. . 1995; 170: 701-704.
- 9- Johnson J.A, Salles C.A, Panigrahi P, Albert M.J, Wright A.C, Johnson R.J, Morris J.G. *Vibrio cholerae O139* synonym Bengal is closely related to *Vibrio cholerae El Tor* but has important deference. *Infection and Immunity*. 1994; 62: 2108-2110.
- 10- Morris J.G. Non-O group 1 *Vibrio cholerae* strains not associated with epidemic disease. In: *Vibrio cholerae and Cholera: Molecular to Global Perspectives* . Wachsmuth I.K, Blake P.A, Olsvik, O, Eds.

- American Society for Microbiology. 1994; pp. 103-115
- 11- Sharma C, Thungapathra M, Ghosh A, Mukhopadhyay A.K, Basu A, Mitra R, Basu I, et al. Molecular analysis of non-O1, non-O139 *Vibrio cholerae* associated with an unusual upsurge in the incidence of cholera-like disease in Calcutta, India. *Journal of Clinical Microbiology*. 1998; 36: 756-763.
- 12- Cheasty T, Said, B. and Threlfall, E.J. *Vibrio cholerae* non-O1: implications for man? *Lancet* . 1999; 354:89-90.
- 13- Murray PR, Baron EJ, Jorjensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC. *Manual of clinical microbiology*. 8th Ed. Washington DC:ASM Prss. 2005; pp: 706-714.
- 14- Izadi S, Shakeri H, Roham P, Sheikhzadeh K. Cholera outbreak in southeast of iran: routes of transmission in the situation of good primary health care services and poor individual hygienic practices. *Japanes Journal Infection Disease*. 2006; 59(3):174-8.
- 15- Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC. *Curved Gram-Negative Bacilli and Oxidase-Positive Fermenters: Campylobacteraceae and Vibrionaceae*. In: *Color atlas and text book of diagnostic microbiology*. 1997; pp:339-352.
- 16- Braunwald E, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Jameson L. *Harrison's principles of internal medicine*. Blackwell New York. 2001; 1:980-986.
- 17- Hoshino K, Yamasaki S, Mukhopadhyay A.K, Chakraborty S, Basu A and et al. Development and evaluation of a multiplex PCR assay for rapid detection of toxigenic *Vibrio cholerae* O1 and O139. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 1998; 20: 201- 207
- 18- Thomson CJ, Jesudason MV, Balaji V, Malathi B, Mukundan U, Amyes SG. The prevalence of *Vibrio* spp. in drinking water and environmental samples in Vellore South India. *Epidemiology and Infection*. 1998; 121(1):67-76.
- 19- Visser IJ, Vellema P, van Dokkum H, Shimada T. Isolation of *Vibrio cholerae* from diseased farm animals and surface water in The Netherlands. *Veterinary Record*. 1999; 144(16):451-2.
- 20- Dalsgaard A, Forslund A, Hesselbjerg A, Bruun B. Clinical manifestations and characterization of extra-intestinal *Vibrio cholerae* non-O1, non-O139 infections in Denmark. *Clinical Microbiology Infection*. 2000; 6(11):625-7.
- 21- Tapchaisri P, Na-Ubol M, Jaipaew J, Srimanote P, Chongsanguan M and et al. Virulence genes of clinical *Vibrio cholerae* O1 isolates in Thailand and their ribotypes. *Journal of Infection*. 2007; 55: 557- 565
- 22- Smirnov NI, Cheldyshova N.B, Zadnova S.P, Kutyrev V.V. Molecular-genetic peculiarities of classical biotype *Vibrio cholerae*, the etiological agent of the last outbreak Asiatic cholera in Russia. *Microbial Pathogenesis*. 2004; 36:131-139
- 23- Miyagi K, Nakano T, Yagi T, Hanafusa M, Imura S, Honda T, et al. Survey of *Vibrio cholerae* O1 and its survival over the winter in marine water of Port of Osaka. *Epidemiology and Infection*. 2003; 131(1):613-9.
- 24- Raychoudhuri A, Chatterjee S, Pazhani GP, Nandy RK, et al. Molecular characterization of recent *Vibrio cholerae* O1, El Tor, Inaba strains isolated from hospitalized patients in Kolkata, India. *Journal of Infection*. 2007; 55: 431- 438
- 25- Izadi S, Shakeri H, Roham P, Sheikhzadeh K. Cholera outbreak in southeast of iran: routes of transmission in the situation of good primary health care services and poor individual hygienic practices. *Japanes Journal of Infection Disease*. 2006; 59(3):174-8.