«مقاله اصیل»

شناسایی گونه های پاتوژن ویبریونا سه (Vibrionaceae) در رودخانه کارون اهواز

حامد گودرزی[1*]، نرسی نصیرآبادی[2]، منیژه مهدی نژاد[2]

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

2ـ کارشناس آزمایشگاه، گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور 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 ارگانیسم از طریق خوردن آب، سبزیجات و موادغذایی که آلوده به مواد مدفوعی بوده، همچنین در اثر خوردن غذاهای دریایی خام ویا غذاهایی که خوب حرارت ندیده باشند مثل صدف، انتقال می یابد. هدف اصلی این مطالعه جداسازی ویبریو کلرای (V. cholera O1)O1 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 وpH آن از 7-8 بود. نمونه های آب جمع آوری شده بوسیله سانتریفیوژ با دور 5000 تغلیظ شد و در آب پپتونه قلیایی انکوبه گردید. بعد از 24 ساعت اینکوبه شدن به داخل محیط اختصاصی ویبریو (TCBSآگار) انتقال داده شد وکلونی های که از نظر مورفولوزیکی 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 وتهیه 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: 32015888-0611
موبایل: 09177058911
پست الکترونیک:
goodarzi200055@yahoo.com

تاریخ دریافت: 90/1/15 تاریخ پذیرش: 90/4/6

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

جنس ویبریو شامل گروه های متنوعی از ارگانیسمهای 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 شدیدا" 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 خصوصیاتی هستند که ویبریوناسه را از انتروباکتریاسه متمایز می نماید. دمای مطلوب جهت تکثیر ویبریوها c 42-28° است و در زیر c4° و بالای c60° قادر به تکثیرنمی 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 نرمتنان و سخت پوستان یافت می شوند(2و1).تقریبا" تمامی گونه های این جنس در 20 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،نرمتنان و ماهیان ساحلی بدست بیایند(3،4).همچنین در خیلی اوقات در مناطق ساحلی ژاپن،مصرف خام ویا نپختن صدفها و نرمتنان دریایی باعث آلودگی با ویبرو می گردد.

از جمله گونه های ویبریو شامل :

Vibrio cholerae, Vibrio. parahaemolyticus,and Vibrio. vulniThcus که از نظر بهداشت همگانی عامل پتانسیلی جهت همه گیرشدن 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 بیوتایپ التور(EL-Tor biotype) وکلاسیک ایجاد وبای کلاسیک در انسان می نمایند. گونه مهم دیگری به نام ویبریو پاراهمولیتیکوس (V.parahemolyticus) عامل عفونتهای متفاوتی در انسان می باشد و به دنبال مصرف غذاهای دریایی مثل نرمتنان،صدفها،میتیلوسها،اویسترها،ماهیان و میگوها آلوده ایجاد گاستروآنتریت نموده و V.vulniThus که در ایجاد ضایعات پوستی شدید و یا جراحات خونی در افرادیکه با مصرف صدف و سایر جانوران دریایی بصورت خام و یا نپخته نقش داشته و نیز گاهی با آنتریت،باکتریمی 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 وبر اساس Ag O به 150 سروتایپ تقسیم شده واز این میان تنها سروتایپ 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 التورویبریوکلرا ایجاد شده متغیر می باشد و حدود 75% 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 درحالیکه التور، 23% بیماری خفیف و فقط 2% بیماری شدید تولید می کنند(6،7).

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

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

www.SID.ir
Archive of SID

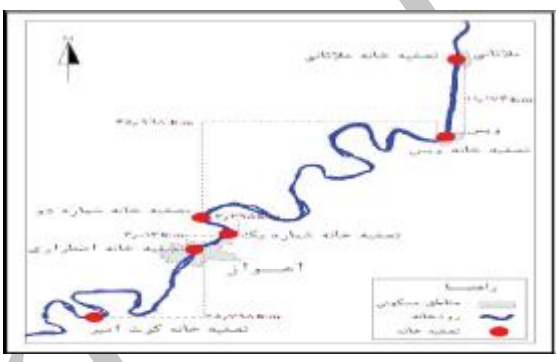
گاستروانتریت وحتی عفونت های زخم وسپتی سمی در افراد مستعددر جامعه می باشد.ویبریوکلرای non O1 شامل گونه های: Vibrio Thvialis,V.furnisii,V. harveyi,V.metschnikovii,V.cincinnatiensis,V. proteolyticus,V.campbellii, V.natriegens می باشند(10،11،12).

به دلیل تماس فراوان جامعه شهری و روستایی با آب رودخانه کارون، در صورت حضور گونه های پاتوژن ویبریوکلراو می تواند همواره به عنوان یک تهدید بزرگ برای سلامت عمومی باشد. به همین خاطر این مطالعه به منظور بررسی حضور وشیوع 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) واز محلهای ورودی آب رودخانه به تصفیه خانه ها، درمحدوده شهر اهواز با طول جغرافیایی "20، `48،68° و عرض جغرافیایی "20، `31،25° در شش ماهه اول (ازفروردین تاشهریور ماه) سال 1389 انجام گردید(تصویر 1). از محل کانال به فاصله 100 متر بالاتر و 100 متر پائین برای هر کانال انتخاب شد. نمونه های آب داخل شیشه های استریل با ظرفیت 500 cc جمع آوری و سپس در کلمنهای مخصوص همراه با یخ خشک با دمای 4° c نگه داری و در کوتاهترین زمان به آزمایشگاه منتقل گردید.سپس در شرایط استریل 10 cc از نمونه آب خام، به لوله های استریل مخصوص سانتریوفوژمنتقل 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 10cc آب پپتون قلیایی قلیایی (Alkaline peptone water)استریل با 1 % نمک (Nacl) منتقل شد.

بعد از4-6 h ساعت انکوبه در دمای 37° c از محیط کشت آب



تصویر شماره1: مکان های نمونه برداری از آب رودخانه کارون

پپتون قلیایی(Alkaline peptone water (APW) با لوپ بر روی محیط اختصاصی تیوسولفات سیترات بایل سوکروز آگار Thiosulfate Citrate Bile Salts Sucrose agar(TCBS) کشت و سپس در انکوباتور با دمای 37° c به مدت 18-24 ساعت نگه 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 ظاهرمرفولوژیکی کلونی ها نیز می توان این دوگونه از ویبریو را ازهم جدا نمود. کلنیهای ایزوله شده زرد رنگ از محیط کشت TCBS آگار، به محیط کلیگلرایرون آگار(KIA) منتقل شد، کلنیهای رشد یافته بر روی محیط (KIA) که بصورت واکنش اسید/قلیایی بوده، از نظر حضور آنزیم اکسیداز به وسیله تست اکسیداز بررسیشد . ویبریوکلرا یک ارگانیسم اکسیداز مثبت می باشد، بنابراین از این مرحله به بعد تستهای بیوشیمیایی- افتراقی برروی کلنی های اکسید از مثبت انجام شد. کلونی های رشد یافته بر روی محیط KIA ، به داخل کیتهای استاندارد API 20Eنیز برده شد و بعد از 24 ساعت انکوباسیون در دمای 37 درجه سانتیگراد و از روی جدول پیوستی کیت تشخیص اولیه ویبریو کلرای O1 انجام گردید. بعد از انجام تست API 20E، با روش مقایسه ای آگلوتیناسیون با آنتی سرم پلی والان V.cholerae O1، تایید گردید و با انجام یک تست آگلوتیناسیون تکمیلی دیگربه

www.SID.ir
Archive of SID

کمک آنتی سرمهای Inaba وogawa این دو بیوگروه تشخیص داده شد. متاسفانه 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 تصیفه خانه ها در محدوده اهوازدر شش ماه اول سال 1389 ، هشت مورد V.cholerae O1 جدا گردیدکه تمام سروتایپ های مذکور متعلق به بیوگروه اینابا بودند ودر هفت مورد از نمونه های رشد یافته برروی محیط TCBS سبز رنگ بوده واز نظر مورفولوژی مشابه گونه های پاراهمولیتیکوس می باشد.در این میان گونه های متعددی از خانواده انتروباکتریاسیه نیز جدا گردید .

بحث

جنس و یبریو شامل 34 گونه است که 12 گونه آن برای انسان بیماریزاست. گونه های بیماریزا ا ین جنس بیشتر در کشورهایی مانند ا یالات متحده و ژاپن که فر آوردهای غذا یی دریایی را به صورت خام زیاد مصرف می کنند، گزارش شده است(13).در خصوص فراوانی گونه های جنس و یبریو و بیمار یزایی آنها در ا یران، مطالعه گسترد ه ای صورت نگرفته است . فقط در مورد گونه و یبریوکلرا 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(15و13) 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 ارگانیسم را از آب، رسوبات و حیوانات دریایی، همچنین از گیا هخواران غرب کلرادو خصوصاً گاوها و خو کها جدا کردند (16).

در مطالعه ای که توسط Katsuaki Hoshino و سایر همکاران در سال 1988 درتوکیوی ژاپن بر روی 121 بیمار با بیماری عفونی که به مرکاز درمانی مراجعه کردند بکمک روش PCR، 38 مورد بعنوان ویبریوکلرای O139 و O1 شناسایی شدند که همگی واجد ژنهای CTX بودند (17).

Thomson و همکاران در سال 1998 نمونه های آب ازدریاچه ها، فاضلا ب ها و آ ب های آشامیدنی شهرVellore در جنوب هند را مورد مطالعه قرار دادند که از100 % نمونه های گرفته شده از دریاچه ها و از87 % نمونه های فاضلا بها و از41 % 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 گاومیش که مبتلا به اسهال بودند ، جدا کردند .همچنین از آ ب های سطحی نزدیک استبلهای حیوانات اهلی نیز این باکتری را پیدا نمودند(19).

در ایالات متحده Dalsgaard وسایر همکاران در سال2000 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).

درمطالعه ای که در سال 2007 توسط Pramuan Tapchaisri وسایر 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 1943-1942 (12 گونه متعلق به بیمار و یک گونه محیطی) همگی واجد ژنهایctxA, ace, zot, tcpA , toxR دخیل در بیماریزایی ویبریوکلرا بودند(22).

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

www.SID.ir
Archive of SID

سروتیپ اوگاوا بودند(23).

در مطالعه ای که توسط Raychoudhuri سایر همکاران در سال 2005 - 2004 بر روی بیماران اسهالی که در بیمارستان کلکته هند بستری شده بودند، انجام گرفت، غالب نمونه های ویبریوکلرا جداسازی شده ازنوع ویبریو کلرای O1، بیووار اوگاوا بوده وتعداد نمونه های O139 ناچیز بوده .دراین میان تعداد 42 گونه O1 واجد ژنهای بیماریزایی tcpA و ctx بودند(24).

در پا ییز 1383 ایزدی و همکاران 61 مورد و یبریوکلرا ازآ بهای 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 یبریوکلراجدا نشد .تمامی ویبریوکلراهای 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 ویبریوکلرا O1 در آب رودخانه کارون، احتمال آلودگی در میان افرادی که با آب در تماس بوده همواره وجود داشته وبه عنوان تهدیدی بزرگ برای ورود این گونه پاتوژن در جامعه و اپیدمیک شدن مطرح می باشد . بهتر است تحقیقاتی در زمینه بررسی وجود توکسین های بیماریزایی در این گونه ها در آینده صورت بگیرد.

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. ClinicalMicrobiology. 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.

Archive of SID
www.SID.ir

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, Yolken RH.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, Chongsa-nguan 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, NandyRK, 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.

Archive of SID

www.SID.ir