مجله میکروب شناسی پزشکی ایران
سال ۱ شماره ۲ تابستان ۱۳۸۶، صفحات ۱۵- ۲۰

کاربرد PCR با استفاده از پرایمرهای کد کننده پروتئین های غشای خارجی *OmpW* جهت تعیین هویت ویبریو کلرا و مقایسه آن با روش های استاندارد کشت و تست های بیوشیمیایی

آذر دخت خسروی [۱*] ، عفت عباسی [۲] ، عبدالرزاق هاشمی [۲] ، منیژه اسکندری [۳] ، فریدون کمائی [۳]

۱) گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز و مرکز تحقیقات بیماری های عفونی و گرمسیری دانشگاه
۲) گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز
۳) آزمایشگاه رفرانس التور، مرکز بهداشت اهواز
نویسنده رابط: آذردخت خسروی، دانشیار گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، کد پستی ۶۱۳۳۵
تلفن: ۰۶۱۱-۳۳۳۰۰۷۴ فاکس: ۰۶۱۱-۳۳۳۲۰۳۶ khosraviaz@yahoo.com

تاریخ دریافت مقاله: ۸۶/۵/۲۲ تاریخ پذیرش مقاله: ۸۶/۷/۲

چکیده:

زمینه و اهداف: ویبریو کلرا عامل بیماری اسهالی وبا می باشد، که بعنوان عامل بیماری و مرگ ومیر در بسیاری از مناطق جهان محسوب می گردد. سویه های O1 وO139 ویبریو کلرا عامل ایجاد کننده وبای کلاسیک بوده و دیگر سویه های ویبریو کلرا از جمله ویبریوهای غیر آگلوتینه شونده (NAG) می توانند عامل بیماری اسهالی در انسان بصورت تک گیر باشند. به دلیل مشابهت خصوصیات بیوشیمیایی ویبریو کلرا با سایر گونه های ویبریو و آئروموناس، بندرت تشخیص آزمایشگاهی توسط کشت و تست های بیوشیمیایی، تعیین هویت این ارگانیسم را مشکل ساز می نماید. در تحقیق حاضر انجام تکنیک PCR جهت تعیین هویت ویبریو کلرا مورد استفاده قرار گرفت و نیز سویه های NAG جدا شده از نظر سروتیپ O139 مورد بررسی قرار گرفتند.

روش بررسی: تعداد ۱۵۶ مورد ویبریو کلرای جدا شده از نمونه های محیطی و بالینی توسط کشت و تست های بیوشیمیایی و سروتایپینگ، از نظر مولکولی مورد بررسی قرار گرفتند. تست PCR با استفاده از پرایمر های اختصاصی کد کنندهٔ پروتئین های غشاء خارجی (*OmpW*) برای تایید موارد ویبریو کلرا و پرایمرهای اختصاصی O139-rfb برای جستجوی سروتایپ O139روی سویه هایNAG انجام گرفت.

یافته ها: در روش متداول آزمایشگاهی ، ۶ مورد به عنوان ویبریو کلرای التور O1 سروتایپ اوگاوا (۵ عدد) و هیکوجیما (یک عدد) و ۱۵۰ مورد بعنوان سوش های غیر آگلوتینه شوندهٔ ویبریو کلرا (NAG) جدا سازی شدند. توسط تکنیک PCR ، از ۱۵۶ نمونه، ۱۳۶ نمونه (۸۷/۱ ٪) مثبت شد که نتایج کشت را تائید می نمود. هیچیک از سویه های NAG توسط پرایمرهای اختصاصی O139 مثبت نگردیدند.

نتیجه گیری: در تحقیق حاضر تکنیک PCR مزیت قابل توجهی نسبت به روش های تشخیصی غیر مولکولی نشان نداد. گونه غالب ویبریو کلرا در منطقه مورد بررسی NAG تشخیص داده شد. تعداد موارد معدود بیماریزای جدا شده سروتیپ O1 اوگاوا بود و هیچ موردی از O139 در منطقه شناسایی نگردید.

کلید واژه ها: ویبریو کلرا ، PCR ، پروتئین های غشای خارجی ، NAG

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه:

خانواده ویبریوناسیه دارای سه جنس ویبریو، آئروموناس و پلزیوموناس می باشد که برای انسان اهمیت بالینی دارند و بطور وسیعی در طبیعت پراکندگی دارند. ویبریوها در آب برکه ها و آب شور یافت می شوند و توسط واکنش اکسیداز مثبت و وجود فلاژل قطبی از انتروباکتریاسیه جدا می شوند(۱).

ویبریو کلرا عامل وبای اپیدمیک و اندمیک است که بعنوان عامل بیماری و مرگ ومیر در بسیاری از مناطق جهان خصوصا آسیا، آفریقا محسوب می گردد (۲). سازمان بهداشت جهانی (WHO) از وبا بعنوان تراژدی مصیبت یاد می کند زیرا اگرچه این بیماری بسهولت قابل پیشگیری است ولی یکی از عوامل اصلی مرگ ومیر در دنیا بشمار می آید. میزان بروز سالانه وبا ۵ میلیون مورد تخمین زده می شود(۳). در طول سال ۲۰۰۵ افزایش زیادی در موارد وبای گزارش شده توسط WHO بوجود آمد. این گزارش تعداد مبتلایان ۱۳۱۹۴۳ نفر، شامل ۲۲۷۲ موارد مرگ و میر را از ۵۲ کشور جهان شامل می شد (۴). در طبقه بندی ویبریو کلرا پیچیدگی خاصی مشاهده می شود. تفاوت در محتوای قندهای موجود در آنتی ژن سوماتیک O در ویبریو کلرا باعث تقسیم بندی سرولوژیکی ویبریو کلرا به ۲۰۶ سروگروه O می شود(۳). تا قبل از سال ۱۹۹۲ و شیوع وسیع بیماری توسط ویبریو کلرای O139 در بنگلادش و هند، ویبریو کلرای O1 بیوتایپ التور تنها عامل ایجاد کننده وبای اپیدمی تلقی می شد (۵). سویه O139 سپس از سایر کشورها نیز گزارش گردید (۶ ، ۷). سویه های ویبریو کلرای O1 وO139 عامل ایجاد کننده وبای کلاسیک هستند و دیگر سویه های ویبریو کلرا از جمله ویبریوهای غیر آگلوتینه شونده (NAG) می توانند عامل بیماری اسهالی در انسان بصورت تک گیر و غیر اپیدمیک باشند(۸). آنتی ژن سروگروه O1 در ویبریو کلرا، شاخصی است که تعیین سروتیپ ارگانیسم را امکان پذیر می سازد که به سروتیپ های اوگاوا، اینابا، هیکوجیما تقسیم می شوند (۳).

تشخیص آزمایشگاهی ویبریو کلرا معمولا" توسط روش های کشت بر روی محیط های اختصاصی و تست های بیوشیمیایی و تست سرولوژیک انجام می گیرد ولی بندرت مشابهت خصوصیات بیوشیمیایی ویبریو کلرا با سایر گونه های ویبریو و آئروموناس تعیین هویت این ارگانیسم را مشکل ساز می نماید. لذا هدف از تحقیق حاضر تایید موارد ویبریو کلرای بدست آمده از کشت توسط PCR (۹) و بررسی سویه های NAG از نظرسروتیپO139 بود که بدلیل در دسترس نبودن آنتی سرم مربوطه در مرکز بهداشت در زمان انجام تحقیق این امر میسر نگردیده بود.

مواد و روش ها :

در این مطالعه توصیفی مقطعی کلیه نمونه های بالینی و محیطی ارسال شده به مراکز بهداشتی استان از خرداد سال ۱۳۸۲ الی آبان ماه ۱۳۸۳ (حدود ۳۵۰۰ نمونه) مورد بررسی قرار گرفت. کلیه این نمونه ها توسط سواپ های استریل درون محیط انتقالی کری بلر(Cary-Blair) به مرکز بهداشت استان خوزستان ارسال گردید. ابتدا از نمونه های ارسالی کشت انجام شد. جهت کشت نمونه ها سواپها به درون محیط غنی کننده آب پپتونه قلیایی (Alkaline Peptone Water (APW بمدت ۸-۶ ساعت انتقال داده شدند. سپس از این محیط بر روی محیط تیوسولفات سیترات بایل سالت سوکروز آگار (TCBS) ساب کالچر داده شدند. جهت کشت نمونه های آب و فاضلاب بعد از سانتریفیوژ نمودن نمونه ها رسوب آنها را در محیط APW وارد نموده و بعد از ۶ ساعت برروی محیط TCBS کشت داده شدند (۱۰). بعد از ۲۴ ساعت، کلنی های زرد بر روی محیط TCBS به عنوان نمونه های مشکوک به ویبریو انتخاب شده و بررسی شدند. از این کلنی ها ابتدا لام تهیه نموده و سپس بر روی محیط کلیگلر آیرون آگار (KIA) کشت داده شدند. کلنی های لاکتوز منفی و اکسیداز مثبت جهت تست های سرولوژی انتخاب شدند. کلنی ها با آنتی سرم پلی والان تعیین تیپ شده و چنانچه واکنش مثبت می دادند با آنتی سرم های اختصاصی اینابا، اوگاوا، هیکوجیما نیز بررسی می شدند (۱۱). ایزوله هایی که با پروسه های بیوشیمیایی فوق به عنوان ویبریو کلرا تشخیص داده شدند ولی تست سرولوژی آنها منفی شده بود به عنوان غیر اگلوتینه شونده (NAG) *V.cholerae* non O1 انتخاب شدند. تعداد ۹۰ نمونه بالینی (rectal swab) و ۶۶ نمونه آب محیطی و فاضلاب به عنوان ویبریو کلرا تعیین هویت شدند و برای انجام روش مولکولی مورد بررسی قرار گرفته و بر روی آنها تست PCR انجام گردید. استخراج DNA توسط روش ساده جوشانیدن از کلنی ها صورت گرفت(۱۲)، سپس با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ویبریو کلرا که بر اساس ژن پروتئین های غشاء خارجی (*ompW*) طراحی گردیده بود توسط روش PCR مورد بررسی قرار گرفتند(۹).

در ضمن از آنجا که در زمان انجام تحقیق آنتی سرم O139 در دسترس نبود و کلیه سویه هایی که با آنتی سرم پلی والان O1

Archive of SID

www.SID.ir

منفی می شدند به عنوان NAG گزارش می گردیدند، لذا تصمیم گرفته شد که با استفاده از پرایمرهای اختصاصی سروتیپ O139 که بر اساس قطعه ژنی *rfb*-O139 ویبریو کلرا طراحی گردیده بودند، کلیه سویه های NAG بررسی گردند (۱۳). این پرایمرها عبارت بودند از:

O139 F2: 5′-AGCCTCTTTATTACGGGTGG -3′
O139 R2: 5′-GTCAAACCCGATCGTAAAGG -3′

جهت انجام PCR، راکسیون PCR در حجم نهایی۲۵µl آماده گردید. طبق این روش در هر میکروتیوپ ۵µl از نمونه Templete DNA به Master Mix ۲۰µl با ترکیب زیر اضافه گردید. ترکیب میکس عبارت بود از: ۵۰ میلی مول KCl ، ۱۰ میلی مول تریس HCl (pH= 8.3)، ۱/۵ میلی مول MgCl2 ، ۰/۲ میکرومول از هر یک از داکسی نوکلئوتید تری فسفات (dNTP)، ۰/۵ میکرومول از هر پرایمر، یک واحد آنزیم Taq DNA Polymerase (سینا ژن ، تهران) و آب مقطر استریل به میزان ۱۴/۴ میکرو لیتر.

سپس میکروتیوب ها را جهت انجام واکنش PCR به دستگاه ترموسیکلر (Techgene, UK) منتقل نموده و برنامه لازم به شرح زیر به دستگاه داده شد (۵) : دناتوراسیون (denaturation) اولیه در c ° ۹۴ بمدت ۵ دقیقه، و ۳۰ سیکل از دناتوراسیون اصلی در c ° ۹۴ بمدت ۳۰ ثانیه، آنیلینگ (annealing) در c ° ۶۳ بمدت ۳۰ ثانیه و اکستنشن (extension) درc ° ۷۲ بمدت ۳۰ ثانیه. قطعا ت DNA ی تکثیر یافته درون ژل آگاروز ۱/۵٪ حاوی اتیدیوم بروماید Load شدند. سپس ژل مورد نظر در ولتاژ ۱۲۰ ولت بمدت ۱ ساعت الکتروفورز گردید.قطعات DNA توسط اشعه U.V مشخص گردیدند. قطعات تکثیریافته در ناحیه bp ۵۸۸ مشاهده شدند (۹). در هر واکنش، کنترل مثبت ویبریو کلرا (ATCC 14035) و کنترل منفی (مخلوط راکسیون بدون نمونه حاوی آب مقطر) نیز لحاظ می شد. روش انجامPCR برای ردیابی سروتیپ O139 نیز بر اساس روش محققین قبلی انجام پذیرفت (۱۳).

یافته ها:

در این مطالعه تعداد ۱۵۶ نمونه بالینی و محیطی مثبت شده از نظر ویبریو کلرا بر اساس روش های کشت و تست های بیوشیمیایی، شامل ۹۰ مورد نمونه بالینی و ۶۶ مورد نمونه محیطی (۶ مورد از آب آشامیدنی، ۷ مورد آب رودخانه، ۴۷ مورد فاضلاب منازل و بقیه سایر فاضلاب ها) بود. با استفاده از سرولوژی با آنتی سرم های پلی والان و مونووالان از این تعداد، ۶ نمونه بعنوان ویبریوکلرا O1 تعیین هویت شدند که ۵ نمونه از آنها سروتیپ اوگاوا و ۱ سروتیپ هیکوجیما بود. چهار مورد سروتیپ اوگاوا از بیماران مراجعه کننده به مرکز بهداشت دو شهرستان استان جدا شده و برای تائید نهایی به مرکز التور استان ارسال گردیده بود و یک مورد اوگاوا و یک مورد هیکوجیما از نمونه های فاضلاب در همان شهرستان ها جدا گردیدند. تعداد ۱۵۰ نمونه باقیمانده بعنوان ویبریو کلرا NAG در نظر گرفته شدند.

توسط روش PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی، از ۱۵۶ نمونه مورد نظر، ۱۳۶ نمونه (۸۷/۱ ٪) به عنوان ویبریو کلرا، مثبت شدند که نتایج کشت را تائید می نمود (تصویر ۱) و۲۰ نمونه (۱۲/۹ ٪) توسط روش PCR منفی شدند. در جدول شماره ۱ روش های تشخیصی مورد استفاده مقایسه گردیده اند. هیچ یک از ۱۵۰ مورد NAG با استفاده از پرایمرهای اختصاصی O139 مثبت نگردیدند.

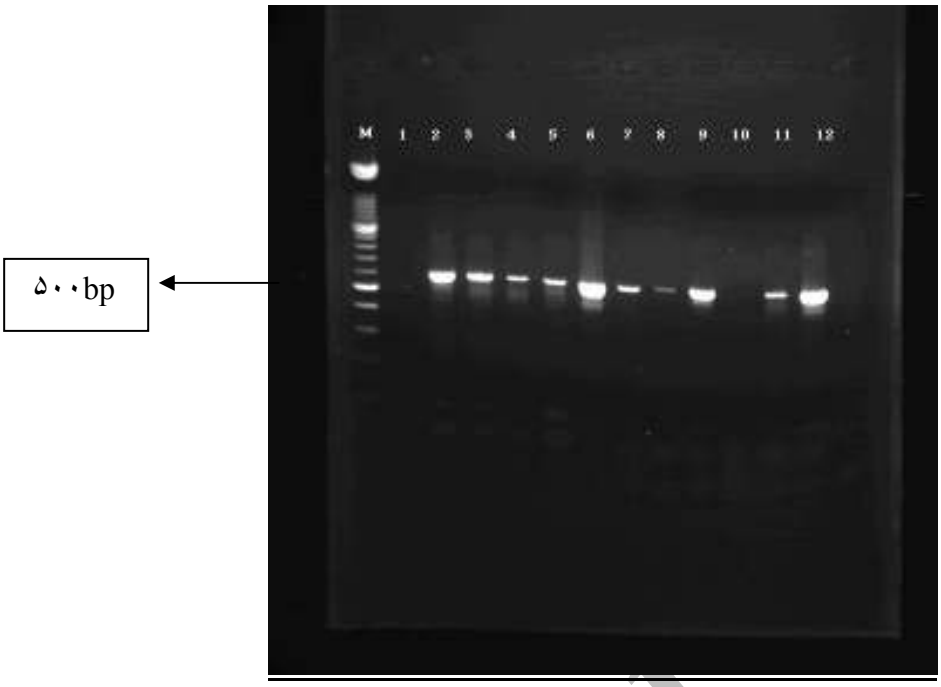
جدول شماره ۱: مقایسه نتایج حاصل از تعیین هویت ویبریو کلرا توسط کشت و روش مولکولی

نوع نمونه	کشت و تست های بیوشیمیایی	PCR
بالینی	۹۰	۸۲ (۹۱/۱)
محیطی	۶۶	۵۴ (۸۱/۸)

Archive of SID

www.SID.ir

تصویر ۱: نتایج امپلی فیکاسیون PCR سویه های ویبریو کلرا با استفاده از پرایمرهای اختصاصی *ompW*



کلید: ستون اول: DNA سایز مارکر

ستون ۱: کنترل منفی

ستون ۲: کنترل مثبت

ستونهای ۳ الی ۹ : ایزوله های کلینیکی

ستون ۱۰ : نمونه منفی

ستونهای ۱۱ و ۱۲ : ایزوله های محیطی

بحث :

ژن کد کننده پروتئین غشاء خارجی ویبریو کلرا به نام ژن *ompW* در سال ۱۹۹۰ توسط Jalajakumari و همکاران تعیین ترادف شد و مشخص گردید که این ژن دارای توالی ثابت در بین تمام سویه های ویبریو کلرا می باشد (۱۴). در سال ۲۰۰۰، Nandi وهمکاران در ژاپن روش PCR را بر اساس ژن *ompW* برای جستجوی ویبریو کلرا در نمونه های کلینیکی مورد استفاده قرار داده و حساسیت روش را برای شناسایی اولیه ویبریو کلرا ۱۰۰٪ گزارش نمودند (۹). در مطالعه دیگری که اخیراً با استفاده از پرایمرهای مشابه توسط Gubala و Proll انجام گرفت اختصاصیت روش برای جداسازی ویبریو کلرا از ۵۱ نمونه ۱۰۰٪ گزارش گردید (۱۵). نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که PCR در قسمت اول که مربوط به شناسایی ویبریو کلرا است مزیتی بر کشت ندارد. پرایمرهای مورد استفاده ما فقط برای تشخیص مولکولی ویبریو کلرا بکار رفته و قادر به تفکیک انواع بیماریزا و غیر بیماریزا نبود و متاسفانه در این تحقیق بدلیل برخی محدویت ها از جمله پایان یافتن مدت زمان انجام تحقیق و نیز بودجه لازم موفق به استفاده از پروب اختصاصی نگردیدیم. لذا در این مقاله در قسمت اول صرفاً بررسی مقایسه ای بین این روش و کشت بوده است. بر اساس نتایج PCR ، مشخص گردید که ۱۲/۹ ٪ از سویه هائی که توسط روش های استاندارد کشت و تست های بیوشیمیائی و نیز سرولوژی به عنوان ویبریو کلرای NAG مشخص شده بودند، احتمالاً به سایر گونه های ویبریوئی و یا جنس های نزدیک تعلق داشتند. مطالعات نیز نشان می دهد که سوش های ویبریو کلرا از لحاظ کشت و خصوصیات بیوشیمیایی با سایر گونه های جنس ویبریو و همچنین گونه های آئروموناس خصوصیات مشابهی را نشان می دهند. آئروموناس همانند ویبریو، اکسیداز مثبت بوده و تعدادی از آنها نیز سوکروز مثبت هستند و احتمال می رود که در

Archive of SID

www.SID.ir

تشخیص متداول آزمایشگاهی با ویبریو اشتباه شوند (۱۶). استفاده از PCR به عنوان یک روش سریع توسط محققین متعددی با استفاده از پرایمرهای دیگری که بر اساس ژن توکسین ویبریو کلرا طراحی شده اند وبالطبع دارای حساسیت و اختصاصیت بالاتری هستند گزارش گردیده است (۱۷-۱۹). لذا با توجه به مطالعات ذکر شده چنانچه بتوان از پرایمرها و پروبهای اختصاصی که گونه های بیماریزا را تفکیک می نماید استفاده نمود، تکنیک PCR با اختصاصیت بالا، در جدا سازی سویه های ویبریو کلرا می تواند بعنوان تست تائیدی در کنار روش های متداول کشت و سرولوژی کمک کننده واقع شود. بر اساس نتایج حاصل از PCR برای ردیابی سروتیپ O139 در سویه های NAG، هیچ موردی از این سروتیپ در نمونه های مورد بررسی بدست نیامد. لذا بر اساس یافته های این تحقیق، در زمان انجام طرح، سویه غالب ویبریو کلرا در منطقه مورد مطالعه NAG گزارش گردید. نوع بیماریزای ویبریو کلرا نیز O1 از نوع اوگاوا بوده است. بنظر می رسد که لزوم تحقیق مشابهی با استفاده از پرایمرهای اختصاصی برای تعیین انواع بیماریزا از نظر بررسی اپیدمیولوژی مولکولی باکتری در این منطقه احساس می گردد که در برنامه کاری محققین این مقاله قرار گرفته است.

نتیجه گیری:

در تحقیق حاضر تکنیک PCR مزیت قابل توجهی نسبت به روش های تشخیصی غیر مولکولی نشان نداد. گونه غالب ویبریو کلرا در منطقه مورد بررسی NAG تشخیص داده شد. تعداد موارد معدود بیماریزای جدا شده سروتیپ O1 اوگاوا بود و هیچ موردی از O139 در منطقه شناسایی نگردید.

تقدیر و تشکر:

این تحقیق با استفاده از بودجه طرح های مصوب معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز انجام گرفته است که بدینوسیله مراتب سپاسگزاری خود را اعلام می داریم.

فهرست مراجع:

1. Feachem R, Miller C, Drasar BS. Environmental aspects of cholera epidemiology. II. Occurrence and survival of *Vibrio cholerae* in the environment. *Tropical Diseases Bulletin* 1981; 78: 865-880.
2. Jiang SC, Matte M, Matte G, Huq A, and Colwell RR. Genetic diversity of clinical and environmental isolates of *Vibrio cholerae* determined by amplified length polymorphism fingerprinting. *Appl Environ Microbiol* 2000; 66:148-153.
3. Guidelines for drinking water quality: Microbiological agents in drinking water. WHO Publications, 2002; 2nd Ed. Geneve, Switzerland.
4. Cholera 2005. WHO Annual subscription SW.fr./Fr.s. 334-05 2006; Geneve, Switzerland.
5. Nair GB, Albert MJ, Shimada T, and Tekeda Y. *Vibrio cholerae* O139 Bengal: the new serogroup causing cholera. *Rev Med Microbiol* 1996; 1: 43-51.
6. Chongsa-nguan M, Chaicumpa W, Moolasart P, Vandhsingha P, Shimada T, Kurazono H, and Takeda Y. *Vibrio cholerae* O139 Bengal in Bangkok. *Lancet* 1993; 342: 430-431.
7. Son R, Rusul G, Samoel L, Yuherman G, Senthil S, Rasip A, *et al.* Characterization of *Vibrio cholerae*O139 Bengal isolated from water in Malaysia. *J Appl Microbiol* 1998; 85: 1073-1077.
8. Huq A, Colwell RR, Chowdhury MAR, Xu B, Moniruzzaman SM, Islam MS, *et al.* Co-existance of *Vibrio cholerae* O1 and O139 Bengal in plankton in Bangladesh. *Lancet* 1995; 345:1249.
9. Nandi B, Nandy RK, Mukhopadhyay S, Nair GB, Shimada T, and Ghose AC Rapid method for species-specific identification of *Vibrio cholerae* using primers targeted to the gene of outer membrane protein *ompW*. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 4145-4151.
10. Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS. Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology, 11th Ed. Mosby Inc., St. Louis, USA. 2002; pp.: 423-433.
11. Tison D. Vibrio. In: Murray RR (Ed). Manual of Clinical Microbiology. 7th Ed. Washington DC. ASM Press 1999; pp. 497-506.
12. Albert MJ, Islam D, Nahar S, Qadri F, Falklind S, and Weintraub A. Rapid detection of *Vibrio cholerae* O139 Bengal from stool

Archive of SID

www.SID.ir

specimens by PCR. . *J Clin Microbiol* 1997; 35: 1633-1635.
13. Hoshino K, Yamasaki S, Mukhopadhyay AK, Chakraborty S, Basu A, Bhattacharya SK, 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.
14. Jalajakumari MB, and Manning PA. Nucleotide sequence of the gene *ompW*, encoding a 22kDa immunogenic outer membrane protein of *Vibrio cholerae* . *Nucleic Acids Res* 1990; 18: 2180.
15. Gubala AJ, and Proll DF. Molecular-beacon multiplex real-time PCR assay for detection of *Vibrio cholerae*. *Appl Environ Microbiol* 2006; 72:6424-6428.
16. Rivera IG, Chowdhury MAR, Huq A, Jacobs D, Martins M, and Colwell RR. Enterobacterial repetitive intergenic consensus sequences and the PCR to generate fingerprints of the genomic DNAs from *Vibrio cholerae* O1, O139, and non-O1 strains. *Appl Environ Microbiol* 1995; 61: 2898-2904.
17. Poushafie MR, Grimont F, Saifi M, and Grimont PAD. Molecular epidemiological study of *Vibrio cholerae* isolates from infected patients in Tehran, Iran. *J Med Microbiol* 2000; 49:1085-1090.
18. Singh DV, Matte MH, Mate GR, Ziang S, Sabeena F, Shukla BN, *et al.* Molecular analysis of *Vibrio cholerae* O1, O139, non-O1 and non-O139 strains: clonal relationships between clinical and environmental isolates. *Appl Environ Microbiol* 2001; 67:910-921.
19. Nair GB, Qadri F, Holmgren J, Svennerholm AM, Safa A, Bhuiyan NA et al. Cholera due to altered El Tor strains of *Vibrio cholerae* O1 in Bangladesh. *J Clin Microbiol* 2006;44:4211-4213

Archive of SID

www.SID.ir