

## پروفایل ژنتیکی IS1004 در سویه های محیطی و بیبرو کلرا جدا شده از آب های سطحی در ایران

بیبا بخشی<sup>1\*</sup>، افسون شریف نیا<sup>2</sup>، محمدرضا پور شفیق<sup>2</sup>

1. باکتری شناس، استادیار دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه باکتری شناسی
2. کارشناس ارشد میکروب شناسی، انستیتو پاستور ایران، گروه میکروب شناسی
3. باکتری شناس، استاد انستیتو پاستور ایران، گروه میکروب شناسی

\* نشانی برای مکاتبه: تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه باکتری شناسی، تلفن و نمابر 82884558، b.bakhshi@modares.ac.ir  
دریافت مقاله: آذر نود و یک پذیرش برای چاپ: بهمن نود و یک

### چکیده

**سابقه و هدف:** ویبرو کلرا دارای سروتیپ های مختلف توکسیژنیک و غیر توکسیژنیک می باشد. سروتیپ های غیر O1 و O139 توکسیژنیک نبوده و در ایجاد اپیدمی و پاندمی های بزرگ و با در جهان نقشی ندارند. روش های تایپینگ مختلفی برای بررسی مولکولار اپیدمیولوژی سویه های بالینی و محیطی ویبرو کلرا مورد استفاده قرار می گیرند. هدف این مطالعه تعیین قرابت ژنتیکی میان سویه های محیطی این باکتری با استفاده از تعیین الگوی ژنتیکی IS1004 به عنوان یک نشان گر اپیدمیولوژیک می باشد. روش کار: نمونه های محیطی جمع آوری شده از آب های سطحی نهر های شهر تهران پس از فیلتراسیون در محیط TCBS کشت داده شدند و پس از رشد کلنی ها روی TCBS یک کلنی انتخاب شده و بر روی محیط BHI کشت مجدد داده شد. از کشت باکتری بر روی این محیط برای انجام تست های بیوشیمیایی تشخیصی و تعیین سروگروپینگ سویه ها استفاده شد. DNA ایزوله ها به منظور آزمون PCR جهت شناسایی گونه اختصاصی کلرا و نیز شناسایی ژن *wbeT* به منظور تایید غیر O1 بودن سویه ها، استخراج گردید. قرابت ژنتیکی سویه ها با استفاده از تکنیک ساترن بلات ارزیابی شد.

**یافته ها:** از مجموع 20 سویه ویبرو کلرا محیطی شناسایی شده، در آزمون PCR ژن *wbeT* هیچ یک از سویه ها باند اختصاصی این ژن را نشان ندادند. از میان ایزوله های محیطی که از نظر الگوی باندی در ساترن بلات الگوهای قابل آنالیز ایجاد کردند، 7 الگوی باندی مختلف بدست آمد در حالیکه تعداد 13 ایزوله با این روش غیر قابل تیپ بندی (*non-typeable*) بودند. در مقایسه با مطالعات قبلی صورت گرفته بر روی سویه های بالینی، هیچ الگوی یکسانی با سویه های بالینی این باکتری در ایران بدست نیامد. نتیجه گیری: تفاوت الگوی باندی در IS1004 ایزوله های ویبرو کلرا محیطی در تکنیک ساترن بلات، هتروژنیستی بالایی را در میان سویه های محیطی جدا شده از آب های سطحی در ایران نشان داد که این سویه های هتروژن هیچ تشابه ژنتیکی با سویه های بالینی این باکتری ندارند.

**واژگان کلیدی:** ویبرو کلرا، IS1004، آبهای سطحی

### مقدمه

بندی می شوند. اگرچه این دو سروگروه به عنوان سروگروه های محیطی شناسایی شده اند اما گزارشاتی مبنی بر حضور این سروگروه ها در بیماران مبتلا به اسهال در کشورهای مختلف جهان از جمله هند و تایلند موجود می باشد (8-3). سویه های غیر O1 و غیر O139، غیر توکسیژنیک بوده و عامل بیماری های اپیدمیک نیستند اما به صورت همه گیری های کوچک با موارد پراکنده در گذشته گزارش شده اند (9) و اغلب شامل ژن های ایجاد کننده گاستروانتریت ملایم تا حاد هستند (10 و 8-6).

ویبرو کلرا باکتری گرم منفی است که سالانه باعث بیش از 120000 مرگ و میر در جهان می شود (1). ویبرو کلرا را می توان بر اساس تنوع در ساختار آنتی ژن O لیپوپلی ساکارید دیواره سلولی اش به بیش از 200 سروتیپ مختلف تقسیم بندی کرد (2). سروتیپ O1 و O139 عامل ایجاد اپیدمی ها و پاندمی های بزرگ در سراسر جهان هستند (2). سویه های متعلق به سروگروه های دیگر تحت عنوان غیر O1 و غیر O139 دسته

500ml از آب از محل گرفته شد و در شیشه های استریل به آزمایشگاه آورده و توسط کاغذ Whatman No.1 فیلتر گردید. سپس توسط سیستم خلا از خلال ممبران های  $0/45 \mu\text{m}$  عبور داده شد. سپس ممبران ها به 8 قطعه بریده شده و در 2ml از Phosphate- buffered- 10 mM saline (PBS pH: 7.4) برای مدت 3 دقیقه ورتکس شد. یک میلی لیتر از سوسپانسیون به 10 میلی لیتر از آب پپتونه قلیایی (APW) Alkaline- peptone- water (1v/w) پپتون با pH برابر 8 افزوده شده و جهت غنی سازی به مدت 16-18 ساعت در انکوباتور شیکر دار  $37^\circ\text{C}$  قرار داده شد. حدود نیم میلی لیتر از این سوسپانسیون روی پلیت های حاوی محیط Thiosulfate- Citrate- Bile- Salt-Sucrose agar (TCBS) کشت داده شد. بعد از 18-24 ساعت انکوباسیون در  $37^\circ\text{C}$  ، تک کلنی های زرد رنگ (ساکارز +) در صورتی که شباهت مورفولوژیک با کلنی های ویبریو کلرا داشتند بر روی محیط ، بر روی محیط (Brain Heart Infusion) BHI کشت داده شد.

از کشت باکتری بر روی این محیط برای انجام تست های بیوشیمیایی تشخیصی و سروگروپینگ سویه ها استفاده شد (20). تست های بیوشیمیایی مورد استفاده برای تشخیص ویبریو کلرا شامل تست اکسیداز- حرکت- اورنیتین دکربوکسیلاز- آرژنین دهیدرولاز- اندول - TSI - استرینگ تست و تست نیاز به غلظت های مختلف نمک (16% و 8% و 4% و 2%) برای رشد می باشند که طبق پروتوکول های استاندارد جهت تعیین هویت سویه های ویبریو کلرا به کار گرفته شدند (21 و 8). سویه هایی که نتایج تست های بیوشیمیایی آن ها با ویبریو کلرا مطابقت داشت، جهت انجام بیوتاایپینگ و سروتاایپینگ انتخاب شدند. سویه استاندارد ویبریو کلرا ATCC 14035 به عنوان کنترل مثبت در تمامی تستها بکار گرفته شد. تایید ژنتیکی سویه ها با استفاده از PCR ناحیه 16s-23s intergenic space اختصاصی برای گونه ویبریو کلرا انجام شد. توالی پرایمرهای VC- F و VCM-R در جدول 1 آمده است (22).

جدول 1. توالی پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه

نام پرایمر	توالی پرایمر	رفرنس
VC-F	5' AGTCACTTAACCACTTCAACCCG 3'	22
VCM-R	5' TTAAGCGTTTTCGCTGAGAATG 3'	22
WbeT-F	5'GGTATGCGTCACTGGATTGTT3'	23
WbeT-R	5'CAGGAATTCACAGCACATCG3'	23

سروتاایپینگ سویه ها با استفاده از آنتی سرم های پلی والان O1 و O139 انجام شد. در این روش که بر اساس رویت یک رسوب قابل مشاهده در واکنش مثبت در نتیجه آگلوتیناسیون بین آنتی ژن های موجود در سطح باکتری و آنتی سرم های اضافه شده بر روی لام می باشد، سروتیپ های سویه های مختلف ویبریو کلرا شناسایی شدند (اساس واکنش پرسی پیتاسیون است). به منظور تایید نتایج حاصل از سروتاایپینگ سویه ها، PCR این ژن با استفاده از جفت پرایمر های طراحی شده در این مطالعه با توالی های مشخص شده در جدول 2 انجام شد.

ویبریو کلرا O1 به دو بیوتیپ کلاسیک و التور و 3 سروگروه اینابا ، اوگاوا و هیکوچیمبا طبقه بندی می شود (11). دسته ژنی به نام wbe با وزن kb 22 بر روی کروموزوم شماره یک بین دو ژن gmhD و rig قرار دارد و ژن های سنتز کننده آنتی ژن O در ویبریو کلرا O1 در این ناحیه قرار می گیرند (12). این اپرن دارای 13 ژن است که ژن wbeT در آن جهت تبدیل (serotype conversion) سروگروه اوگاوا به اینابا و بالعکس ضروری است (13). ژن های سنتز کننده آنتی ژن O در ویبریو کلرای غیر O1 و غیر O139 نیز بر روی یک دسته ژنی مشابه به نام wbe\* قرار دارند که مانند سروتیپ O1، این دسته ژنی نیز بین ژن های gmhD و rig قرار دارد ولی وزن این دسته در بین سروتیپ های مختلف ویبریو های غیر O1 از 18-28 kb متغیر است (2). به رغم وجود برخی شباهت ها میان دو کلاستر wbe\* و wbe\* ، تفاوت هایی نیز بین این دو دیده می شود که از آن جمله می توان به عدم حضور ژن wbeT در کلاستر wbe\* در سویه های غیر O1 اشاره کرد (14).

IS1004 یک عنصر ژنتیکی متحرک در ویبریو کلرا می باشد که انحصاراً به عنوان یک مارکر اپیدمیولوژیک در تایپینگ های مولکولی در ویبریو کلرا استفاده می شود (15 و 16). این عنصر ژنتیکی متحرک قادر است در میان سروتیپ های مختلف ویبریو کلرا از جمله non-O1 و non-O139 (سویه های محیطی) نیز جا به جا شود. تعداد نسخه های IS1004 موجود در سروتیپ های مختلف ویبریو کلرا، به عنوان یک روش جهت بررسی قرابت ژنتیکی میان سویه های مختلف ویبریو کلرا مورد استفاده قرار می گیرد (16).

مطالعات اخیر نشان داده اند که ژن های ویروالانس و همولوگ های آنها علاوه بر سویه های بالینی در سویه های محیطی ویبریوکلرا نیز منتشر شده اند که این ژن ها در واقع به سروگروه های متنوعی که بنظر می رسد مخزن ویبریوکلرا های محیطی هستند تعلق دارند (17 و 18). اگر چه نقش ژن های ویروالانس در ویبریوکلرا های محیطی و علت بقای بیشتر ویبریو های محیطی حاوی ژن های ویروالانس نسبت به سایر سویه های محیطی شناخته نشده است اما این احتمال می رود که این سویه های محیطی حاوی ژن های ویروالانس، منشاء سویه های پاتوژنیک باشند یا در فرآیند انتقال ژن که منجر به ایجاد سویه های پاتوژنیک می شود نقش داشته باشند (19). به منظور تشخیص و ردیابی نحوه ایجاد ویبریوکلرا های پاتوژنیک از انواع غیر پاتوژنیک لازم است سویه های حدواسط که دارای قدرت پاتوژنیک کمتری نسبت به سویه های اپیدمیک هستند شناسایی گردند. از آنجایی که کلرا یک بیماری منتقله از آب است، شناسایی سویه های محیطی و بررسی ژنتیکی آنها به منظور شناسایی منبع سویه های ایجاد کننده اپیدمی های کلرا و یا گاستروانتریت های پراکنده حائز اهمیت است.

در این مطالعه الگوهای بانندی IS1004 با استفاده از تکنیک ساترن بلات در میان سویه های مختلف محیطی ویبریو کلرا جدا شده از نهر های گوناگون شهر تهران و اطراف آن ، بررسی شد.

### روش کار

نمونه های محیطی با هم اهنگی سازمان آب و فاضلاب استان به طور متناوب و در فواصل زمانی یک هفته ای از محل 6 نهر بزرگ داخل و اطراف شهر تهران شامل نهر فیروزآباد، یاخچی آباد، 17 شهریور، بهشتی، افسریه، و نهر امین آباد گرفته شد. در هر مرحله نمونه گیری حدود

ویبریو کلرا معرفی کرد (تصویر 1 نمایی از نتایج حاصل از PCR سویه ها را نشان می دهد). سروتایپینگ سویه ها با استفاده از آنتی سرم های پلی والان O1 و O139 صورت گرفت و نشان داده شد که تمام سویه ها متعلق به سروتایپ های non-O1 و non-O139 می باشند. تمام نمونه های شناسایی با استفاده از آزمون PCR برای ژن wbeT مورد بررسی قرار گرفتند که باند حاصل از تکثیر wbeT بجز در سویه بالینی کنترل مثبت در هیچ یک از نمونه های محیطی (0/48) ، مشاهده نشد (تصویر 2). DNA همه سویه های ویبریو کلرا محیطی با استفاده از آنزیم HpaII هضم شدند و با پروب IS1004 هیبرید گردیدند. تعداد هفت سویه مجموعاً 9 قطعه در اندازه های 1500-1000 bp ، 1500 bp ، 2000 bp ، 3000 bp ، 4500bp و 6000bp و شش باند با بیش از وزن 10 ایجاد کردند. شش باندی که وزنی بالاتر از 10 kb داشتند، متعلق به 3 سویه محیطی مختلف بودند که از میان آنها 2 سویه از لحاظ الگوی باندی شبیه یکدیگر بودند و یک سویه تفاوت الگوی باندی را نشان داد. (لازم به یادآوری است، مارکر مورد استفاده در این مطالعه، مارکر 10 kb بوده لذا باندهای با وزن بیش از آن به صورت > 10 kb گزارش می شوند). سایر سویه ها هیچ الگوی واضحی را در ساترن بلات ایجاد نکردند و به عنوان سویه های غیر قابل تیپ بندی (Non-typable) طبقه بندی می شوند. نتایج حاصل از ساترن بلات نشان دهنده تفاوت کلی در الگوی باندی IS1004 در میان اغلب سویه های مختلف non-O1 بود

با استفاده از تکنیک ساترن بلات DNA ایزوله های رشد یافته در محیط BHI پس از 24 ساعت با استفاده از روش فنل کلروفورم-ایزو آمیل الکل استخراج شد. DNA های استخراجی با استفاده از آنزیم HpaII هضم گردید. پس از هضم آنزیمی، قطعات ایجاد شده توسط الکتروفورز نمونه ها، روی ژل آگارز جداسازی شدند. سپس نمونه ها از روی ژل بر روی گشای کاغذ نایلون با شارژ مثبت انتقال یافت. با استفاده از کیت DIG DNA labelling and detection kit (Roche Diagnostic GmbH) پروب ژن IS1004 که با Digoxigenin نشان دار شده بودند ، تهیه شد. در مرحله پیش هیبریداسیون ، کاغذ به مدت 30 دقیقه در بافر هیبریداسیون که شامل SSC 5X (سالین سدیم سترات)، محلول متوقف کننده (Blocking Reagent) 2% w/v ، N- لوریل سارکوزین ( % 0.02 SDS و 0.1 (wv<sup>-1</sup>) می باشد، قرار گرفت. سپس کاغذ به مدت 24 ساعت با پروب نشان دار و دناتوره شده تازه ، هیبرید شد و سپس دو مرتبه با SSC2X و SDS (wv<sup>-1</sup>) 0.01% به مدت 5 دقیقه در دمای اتاق شستشو داده شد. سپس شستشو با SSC 0/5X و 0.01% SDS (wv<sup>-1</sup>) به مدت 15 دقیقه در دمای 68 درجه سانتیگراد دوبار انجام گرفت. آشکار سازی قطعات DNA هیبرید شده با پروب نشان دار با استفاده از آنتی بادی ضد Digoxigenin بر اساس دستور العمل شرکت سازنده صورت گرفت.

#### یافته ها

کشت های TCBS پس از 18-24 ساعت مورد بررسی قرار گرفتند. از کلنی های زرد رنگ، نسبتاً مسطح با قطر تقریبی 2-4 میلی متر جهت کشت بر روی محیط BHI استفاده شد. از کلنی های رشد یافته بر روی محیط BHI برای انجام تست های بیوشیمیایی و سروتایپینگ استفاده شد. نتیجه تست های بیوشیمیایی جهت شناسایی ویبریو کلرا در جدول 2 آمده است.

سویه هایی با مشخصات بیوشیمیایی ذکر شده در جدول 3 که توسط PCR اختصاصی گونه ویبریو کلرا در ناحیه intergenic space 16srRNA-23srRNA تایید شدند، جهت انجام سروتایپینگ انتخاب شدند. تعداد 20 سویه از ایزوله های جدا شده که تست های بیوشیمیایی کاملاً منطبق با الگوی فوق را نشان دادند مورد آنالیزهای بعدی قرار گرفتند و نتایج بدست آمده از PCR اختصاصی گونه، آن ها را بعنوان

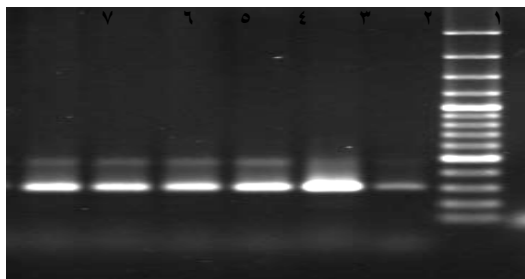
#### تصویر 1:

جدول 2. مشخصات تست های بیوشیمیایی مورد استفاده جهت

#### تعیین هویت ویبریو کلرا

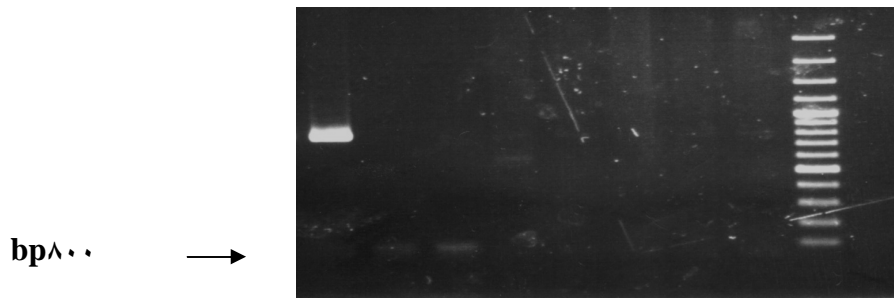
واکنش	نوع آزمایش
+	اکسیداز
+	اندول
+	رشد در 0% نمک
+	اورنیتین دکربوکسیلاز
-	آرژینین دهیدرولاز
+	حرکت
+	استرینگ تست
A/A بدون تولید گاز و H <sub>2</sub> S	TSI

bp 3000



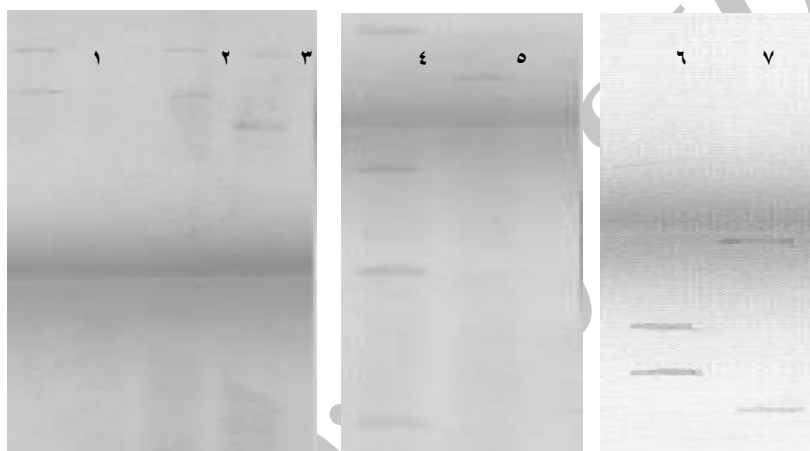
PCR اختصاصی گونه ویبریو کلرا در ناحیه intergenic space 16srRNA-23srRNA شماره های 1-5 نتایج PCR سویه های محیطی و شماره 6 سویه کنترل مثبت ATCC14035 را نشان می دهد. 7 مارکر 1 kb می باشد.

## تصویر 2:



PCR ژن *wbeT* سویه های محیطی. شماره 1 سویه کنترل مثبت ATCC14035. شماره های 2-8 سویه های محیطی مورد بررسی در این مطالعه. 9 مارکر 3kb. شماره 10 سویه کنترل منفی سودوموناس آئروژینوزا

## تصویر 3:



پروفایلینگ IS1004 در میان ایزوله های محیطی ویبریو کلرا در روش ساترن بلات.

ساترن بلات تکنیکی برای بررسی تعداد نسخه های یک توالی DNA ای خاص و یا یک ژن خاص می باشد (24). در این مطالعه با استفاده از این ساترن بلات، تنوع الگوهای باندهای IS1004 در ایزوله های ایرانی بدست آمده از نهرهای شهر تهران و حومه، شناسایی شد. در مطالعه انجام شده توسط Bik و همکاران در سال 1996، نتایجی مشابه مبنی بر وجود تنوع در الگوهای باندهای IS1004 در ایزوله های غیر بالینی، بدست آمد (16). مطالعات گوناگونی در ارتباط با بررسی الگوهای باندهای IS1004 بر روی سویه های بالینی انجام گرفته است که در تمام این مطالعات، الگوهای باندهای مشابه از نظر تعداد و وزن باند ها در همه ایزوله های بالینی مشاهده شده است که این نتایج تفاوت آشکاری را با نتایج بدست آمده از الگوهای باندهای IS1004 در ایزوله های محیطی نشان می دهد. در مطالعه پیشین که بر روی ویبریوکلرا های بالینی جدا شده از بیماران طی اپیدمی های مختلف در طی 4 سال متوالی در ایران انجام شد مشخص گردید که تعداد کپی های IS1004 در ویبریوکلرا های التور O1 (تعداد 10 کپی) متفاوت از سویه ی کلاسیک 569B (تعداد 6-5 کپی) می باشد، این در حالی است که الگوی ژنتیکی IS1004 میان تمام سویه های التور O1 مورد بررسی کاملاً مشابه بوده و هیچ تفاوتی با الگوی ژنتیکی سویه استاندارد ویبریوکلرا O1 ATCC 40315 نداشت (23).

### بحث

در این مطالعه آزمون PCR به منظور شناسایی ژن *wbeT* بر روی تمام ایزوله های ویبریو کلرا محیطی (non O1-non-O139) صورت گرفت که نبود ژن *wbeT* در تمام سویه های محیطی مشاهده گردید. نتایج مطالعه حاضر پیرامون بررسی ژن *wbeT* در سویه های محیطی، تایید کننده نتایج حاصل از مطالعه Yamasaki و همکاران (14) که بر روی سویه های بالینی و محیطی جدا شده از کشورهای هند، چین، تایلند، نپال و بنگلادش انجام شد، می باشد. در هر دو مطالعه نبود ژن *wbeT* در ایزوله های محیطی مورد بررسی به اثبات رسید. ژن *wbeT* در سویه های بالینی ویبریو کلرا (O1) مسئول serotype conversion می باشد (13) که وجود این ژن در ایزوله های بالینی جدا شده از بیماران در بررسی هم زمان، در این مطالعه حاضر به اثبات رسید (23).

سویه های محیطی به منظور تعیین الگوی باندهای IS1004 از طریق تکنیک ساترن بلات (Southern blot) مورد ارزیابی قرار گرفتند و 6 الگوی باندهای متفاوت (الگوهای اول و دوم شامل 2 باند با طول های بیشتر از 10 kb، الگوی سوم شامل 4 باند مختلف با طول های 1000-1500، 2000، 3000 و 6000 جفت باز، الگوی چهارم شامل یک باند با طول 4500bp و الگوی ششم شامل 2 باند با طول های 1000-1500 و 2000 جفت باز) در ایزوله های مورد بررسی شناسایی شد.

### نتیجه گیری

نتایج حاصل از مطالعه حاضر تفاوت الگوی باندی فراوانی در IS1004 ایزوله های محیطی ویبریو کلرا non-O1, non-O139 در تکنیک ساترن بلات، نشان داد که این نتیجه موید عدم قرابت ژنتیکی میان سویه های محیطی جدا شده از آب های سطحی در ایران می باشد و بیان گر تنوع ژنتیکی بالای سویه های محیطی ویبریو کلرا می باشد. چنین تنوع بالایی در پروفایل IS1004 که نسخه هایی از آن نیز در کلاسترهای ژنی بیوسنتز آنتی ژن O قرار دارند می تواند بیانگر تنوع بالای ژنتیکی در ژنهای سنتز کننده آنتی ژن O در میان سویه های محیطی ویبریو کلرا باشد.

در تحقیق انجام شده توسط Bike و همکاران در سال 1996 مشخص گردید، الگوی ژنتیکی IS1004 در میان سویه های ویبریوکلرا O1 بسیار مشابه و قطعات حاصل از برش با آنزیم HpaII در تمام سویه های مورد بررسی تقریباً مشابه و شامل 3 باند با اندازه های 2200، 1500 و 2500 جفت باز می باشد. الگوی ژنتیکی IS1004 در میان بیوتیپ های التور و کلاسیک بسیار مشابه و تنها در تعداد کپی های موجود از IS1004 دارای تفاوت بودند که تعداد این کپی ها در بیوتیپ های کلاسیک بیشتر از بیوتیپ های التور گزارش شدند. در مقابل این قرابت ژنتیکی بین سویه های پاتوژنتیک در بین سویه های محیطی (غیر O1 و غیر O139) بررسی شده پلی مورفیسم فراوانی در الگوی IS1004 نشان دادند که شباهت و ارتباطی به الگوی سویه های التور و کلاسیک نداشتند. تنوع این سویه ها به گونه ای بود که در بین 43 سویه مورد مطالعه 31 الگوی متفاوت برای IS1004 مشاهده شد (16).

## REFERENCES

1. World Health Organization. Cholera vaccines. *Wkly Epidemiol Rec.* 2001 Apr; 76(16):117-24.
2. Li M, Shimada T, Morris JG, Sulakvelidze A, Sozhamannan Sh. Evidence for the emergence of non-O1 and non-139 *Vibrio cholerae* strains with pathogenic potential by exchange of O-antigen biosynthesis regions. *Infect Immun.* 2002 May;70(5):2441-53.
3. Dalsgaard A, Albert MJ, Taylor DN, Shimada T, Meza R, Serichantalergs O, et al. Characterization of *Vibrio cholerae* non-O1 serogroups obtained from an outbreak of diarrhea in Lima, Peru. *J Clin Microbiol.* 1995 Oct; 33(10):2715-22.
4. Dalsgaard A, Forslund A, Bodhidatta L, Serichantalergs O, Pitarangsi C, Pang L, et al. A high proportion of *Vibrio cholerae* strains isolated from children with diarrhoea in Bangkok, Thailand are multiple antibiotic resistant and belong to heterogenous non-O1, non-O139 O-serotypes. *Epidemiol Infect.* 1999 Apr; 122(2):217-26.
5. Kamble TK, More SR, Chavan SS, Kulkarni ND, Lodha NS, Kamble AS. Clinical profile of non-O1 strain-O139 of *Vibrio cholerae* in the region of Ambajogai, Maharashtra. *J Assoc Physicians India.* 2000 May; 48(5):505-6.
6. Morris JG. Non-O group 1 *Vibrio cholerae* strains not associated with epidemic disease, p. 103-15. In Wachsmuth IK, Blake PA, Olsvik O. *Vibrio cholerae* and cholera: molecular to global perspectives. ASM Press, Washington, DC. 1994
7. Mukhopadhyay AK, Saha PK, Garg S, Bhattacharya SK, Shimada T, Takeda T, et al. Distribution and virulence of *Vibrio cholerae* belonging to serogroups other than O1 and O139: a nationwide survey. *Epidemiol Infect.* 1995 Feb;114(1):65-70
8. Ramamurthy T, Bag PK, Pal A, Bhattacharya SK, Bhattacharya MK, Shimada T, et al. Virulence patterns of *Vibrio cholerae* non-O1 strains isolated from hospitalized patients with acute diarrhoea in Calcutta, India. *J Med Microbiol.* 1993 Oct; 39(4):310-17.
9. Aldova E, Laznickova K, Stephankova E, Lietava J. Isolation of nonagglutinable vibrios from an enteritis outbreak in Czechoslovakia. *J Infect Dis.* 1968 Feb;118(1):25-31.
10. Janda JM, Powers CR, Bryant G, Abbott SL. Current perspectives on the epidemiology and pathogenesis of clinically significant *Vibrio* spp. *Clin Microbiol Rev.* 1988 Jul;1(3): 245-67.

11. Taneja N, Biswal M, Tarai B, Sharma M. Emergence of *Vibrio cholerae* O1 biotype El Tor serotype Inaba in north India. *Jpn J Infect Dis*. 2005 Aug;58(4):238-40.
12. Heidelberg JF, Eisen JA, Nelson WC, Clayton RA, Gwinn ML, Dodson RJ, et al. DNA sequence of both chromosomes of the Cholera pathogen *Vibrio cholerae*. *Nature*. 2000 Aug;406(6795):477-83.
13. Stroehrer UH, Karageorgos LE, Morona R, Manning PA. Serotype conversion in *Vibrio cholerae* O1. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992 Apr;89(7):2566-70.
14. Yamasaki S, Garg S, Nair GB, Takeda Y. Distribution of *Vibrio cholerae* O1 antigen biosynthesis genes among O139 and other non -O1 serogroups of *Vibrio cholerae* *FEMS Microbiol Lett*. 1999 Oct;179(1):115-21.
15. Chatterjee S, Mandal AK, Begum NA, Roychoudhury S, Das, J. Ordered cloned DNA map of the genome of *Vibrio cholerae* 569B and localization of genetic markers. *J Bacteriol*. 1998 Feb;180(4):901-8.
16. Bik EM, Gouw RD, Mooi FR. DNA fingerprinting of *Vibrio cholerae* strains with a novel insertion sequence element: a tool to identify epidemic strains. *J Clin Microbiol*. 1996 Jun; 34(6):1453-61.
17. Mukhopadhyay AK, Chakraborty S, Takeda Y, Nair GB, Berg DE. Characterization of VPI pathogenicity island and CTXphi prophage in environmental strains of *Vibrio cholerae* *J Bacteriol*. 2001 Aug;183(16):4737-46.
18. Faruque SM, Kamruzzaman M, Meraz IM, Chowdhury N, Nair GB, Sack RB, et al. Pathogenic potential of environmental *Vibrio cholerae* strains carrying genetic variants of the toxin-coregulated pilus pathogenicity island. *Infect Immun*. 2003 Feb;71(2):1020-5.
19. Faruque SM, Chowdhury N, Kamruzzaman M, Dziejman M, Rahman MH, Sack DA, et al. Genetic diversity and virulence potential of environmental *Vibrio cholerae* population in cholera-endemic area. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004 Feb;101(7):2123-8.
20. Radu S, Ho YK, Lihan S. Molecular characterization of *Vibrio cholerae* O1 and non-O1 from human and environmental sources in Malaysia. *Epidemiol Infect*. 1999 Oct;123(2):225-32.
21. Choopun N, Louis V, Hug A, Colwell RR. Simple procedures for rapid identification of *Vibrio cholerae* from the aquatic environment. *Appl Environ Microbiol*. 2002 Feb;68(2): 995-8.
22. Chun J, Huq A. Analysis of 16s-23s rRNA intergenic spaces region of *Vibrio cholerae* and *Vibrio mimicus*. *Appl Environ Microbiol*. 1999 May;65(5):2202-8.
23. Sharifnia A, Bakhshi B, Pourshafie MR. wbeT sequence typing and IS1004 profiling of *Vibrio cholerae* isolates. *Lett Appl Microbiol*. 2012 Apr;54(4):267-71.
24. Southern EM. Detection of specific sequences among fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol*. 1975 Nov;98(3):503-17.