Downloaded from sjsph.tums.ac.ir at 19:19 IRDT on Wednesday September 20th 2017

مجله دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی
دوره ۴ شماره ۳ پاییز ۱۳۸۵ ، صفحات : ۶۰-۵۳

ژن بیماریزای *hly* A و تعیین مقاومت آنتی بیوتیکی در ۱۰۰ نمونه بیمار مبتلا به وبا

منیژه صداقت : کارشناس ارشد باکتری شناسی دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس- نویسنده رابط :sed2020@yahoo.com
دکتر سلمه سلطان درانی : دانشیار دانشکده پزشکی ، دانشگاه تربیت مدرس
دکتر محمدرضا پورشفیع : دانشیار بخش میکروب شناسی انستیتو پاستور ایران
دکترمهناز سیفی : محقق بخش میکرب شناسی ، انستیتو پاستور ایران
دکتر رضا رنجبر : استادیار، مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله الاعظم
دریافت : ۸۴/۳/۲ **پذیرش** : ۸۴/۱۲/۳

چکیده :

زمینه و هدف : ویبریوکلرا التور، عامل بیماری وبا همواره باعث مشکلات متعدد اجتماعی واقتصادی است، لذا بررسی مقاومت در این باکتری نسبت به آنتی بیوتیک های متعدد، همچنین بررسی ژنتیکی عوامل بیماریزای آن در جهت بهبود و سلامت جامعه، موثر و لازم می باشد.

روش کار : ژن *hly* A بعنوان عامل ایجاد همولیز و سیتولیزسلولی شناخته شده و نقش مهمی در گاستروآنتریت های وبایی دارد. ۱۰۰ سویه جمع آوری شده از بیماران مبتلا به وبا که از چند شهر مختلف ایران ، شامل : تهران ، کاشان ، کرمانشاه و اهواز بودند، مورد بررسی قرار گرفت. با استفاده از آزمون های بیوشیمیایی و سرولوژیک استاندارد، ایزوله ها تعیین هویت گردیدند و باتکنیک واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) ، ژن بیماریزای *hly* A در سویه های جدا شده مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج : ۷۴٪ از سویه ها ، سروتیپ اوگاوا و ۱۳٪ NON Agglutination (NAG) و ۳٪ اینابا بودند. از نظر الگویی مقاومت آنتی بیوتیکی، تمامی سویه ها به سیپروفلوکسازین، جنتامایسین و داکسی سیکلین حساسیت نشان دادند، درحالی که ۷۴٪ سویه ها به کوتریموکسازول، ۶۴٪ به اریترومایسین و ۵۳٪ به تتراسیکلین مقاوم بودند. همچنین ۱۰۰٪ سویه ها از نظر وجود ژن *hly* A ، مثبت بودند درحالی که ۹۵٪ سویه ها، فنوتیپ همولیز بتا را بر روی بلاد آگار نشان داده و ۵٪ آنها فاقد همولیز بودند.

نتیجه گیری : در این مطالعه توصیفی، با الگوی مقاومتی بالایی از باکتری مواجه شدیم و براین اساس، تتراسیکلین که تاکنون به عنوان داروی انتخابی جهت درمان وبا پیشنهاد می شد از رده خارج می گردد و با بررسی مولکولی ژن *hly* A ، می توان به شناخت بهتر موارد مشکوک به وبا، دست یافت.

واژگان کلیدی : وبا ، مقاومت آنتی بیوتیکی ، ژن *hly* A

مقدمه :

باکتری ویبریوکلرا، در جنس ویبریو و متعلق به خانواده ویبریوناسه می باشد که تاکنون ۲۸ گونه از آن شناسایی شده است.

این باکتری ، عامل بیماری مهلک وبا (Cholera) در انسان است و به صورت تک گیر، همه گیر و عالم گیر دیده می شود. گرم منفی ، بدون اسپور و متحرک بوده و واجد یک فلاژل قطبی است. این باکتری ، بی هوازی اختیاری است و در $۷ \leq pH \leq ۹$ بخوبی رشد می کند. این

Downloaded from sjsph.tums.ac.ir at 19:19 IRDT on Wednesday September 20th 2017

میکروارگانیسم ، به دو بیوتیپ التور و کلاسیک تقسیم شده و از نظر ساختمان آنتی ژنیکی نیز به ۳ سروتیپ اوگاوا، اینابا و هیکوجیما نامگذاری گردیده است.

وبا ، بیماری مختص انسان است و تاکنون باعث ۷ پاندمی شده که نتیجه آن هزاران مرگ و میر و تغییرات بزرگ اجتماعی واقتصادی بوده است (Ansaruzzaman M. and Bhuiyan NA. 2004). شروع بیماری ، ناگهانی و با اسهال و استفراغ شدید همراه است که گاه حتی طی مدت زمان ۳ تا ۴ ساعت ، باعث مرگ بیمار می شود. به علت مجاور بودن ایران با کشورهای آسیایی مانند پاکستان و افغانستان که بیماری در آنجا آندمیک است، در کشور ما نیز همواره مواردی از این بیماری گزارش می گردد (Pourshafie M.R. and Grimont F. 2002). ژن *hly* A در هر دو بیوتیپ التور و کلاسیک وجود دارد ؛ با این تفاوت که در نوع کلاسیک ۱ ، افتادگی llbp در ساختمان ژنی *hly* A مشاهده می شود که این امر موجب افتراق این دوتیپ از نظر فنوتیپی (ایجادهمولیز بتا بر روی بلاد آگار ۵٪ خون گوسفندی) می شود (Murray P.R. 2003).

دراین تحقیق ، علاوه بر بررسی خصوصیات بیوشیمیایـــــی، سرولوژیکی و مقاومت آنتی بیوتیکی ، سویه های جداشده از نظر وجود ژن توکسین بیماریزای *hly* A ، به روشPCR مورد مطالعه قرار گرفتند.

روش کار :

– جداسازی باکتری و سروتایپینگ : مطالعه بر روی ۱۰۰ نمونه مبتلا به وبای ارسالی از مراکز بهداشت چهار شهر مختلف ایران (تهران ، کرمانشاه ، کاشان و اهواز) ، صورت گرفت. چگونگی انتخاب نمونه ها براساس ارسال نمونه ها از شهرستان های ذکر شده بوده است و انتخابی در کار نبوده، چون بیماری وبا در تمام مناطق کشور در زمان مطالعه بطور یکسان شیوع نداشته، در مقطع زمان مطالعه هر نمونه ای که ارسال شده است، مورد بررسی قرار گرفته است.

نمونه های مدفوع و سواپ رکتال بیماران، بلافاصله به محیط آب پپتونه قلیایی با pH = ۸/۶ انتقال داده شد و پس از طی شدن زمان انکوباسیون به مدت ۶ ساعت در دمای $37^{o}c$، بر روی محیط اختصاصی TCBS، جهت شناسایی اولیه کشت گردیدند (Robert M. and Joseph M. 2004). پس از رشد باکتری در مدت زمان ۲۴ ساعت در دمای $37^{o}c$، با استفاده از آزمونهای بیوشیمیایی اندول، سیمون سیترات، متیل رد و وژپروسکوئر، همولیز بر روی بلاد آگار، حرکت، اکسیداز، اوره و مقاومت به پلی میکسین B و همچنین بررسی سرولوژیکی با استفاده از آنتی سرم های اینابا و اوگاوا تولیدی انستیتو پاستور ایران که به روش آگلوتیناسیون بر روی لام انجام گرفت، ویبریوکلرا التور شناسایی شد (Bidinost C. and Saka H.A. 2004).

– بررسی حساسیت آنتی بیوتیکی : بررسی حساسیت آنتی بیوتیکی ، با استفاده از روش استاندارد Disk diffusion method توصیه شده توسط کمیته بین المللی استاندارد آزمایشگاهها ، بر روی محیط مولرهینتون آگار و با استفاده از غلظت نیم مک فارلند انجام گرفت (Arakawa E. and Murase T. 2000). در این بررسی ، دیسک های آنتی بیوتیکی مورد استفاده شامل : کلرامفنیکل(C: ۳۰ mg)، اریترومایسین (E : ۱۵ mg)، تتراسیکلین (Te: ۳۰ mg) و اکسی تتراسیکلین (OXY: ۳۰ mg)، کوتریموکسازول (SXT:۲۵ mg) از شرکت سازنده BBL و آنتی بیوتیکهای جنتامایسین (GM : ۱۰ mg) ، سیپروفلوکسازین (Cip :۱۵mg) و داکسی سیکلین (Dox: ۳۰ mg) از شرکت سازنده Difco می باشند.

– بررسی ملکولی ژن *hly* A : الف) استخراج ژنوم : استخراج DNA کروموزومی توسط روش جوشاندن (Boiling) صورت گرفت. ب) پرایمر با توالی زیر ، از

Downloaded from sjsph.tums.ac.ir at 19:19 IRDT on Wednesday September 20th 2017

شرکت Tib Molbiol Synthesyntheselabor (Singh D.V. and Matte G.R. 2001) سفارش و تهیه گردید :

5´-GAG CCG GCA TTC ATC ATC TGA AT
5´- CTC AGC GGG CTA ATA CGG TTT A

PCR : شرایط واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) با مراحل زیر انجام گردید :

جهت انجام واکنش PCR مخلوط واکنش باحجم نهایی ۵۰ میکرولیتر درون لوله های اپندرف ۰/۵ ml مطابق مقادیر ذیل ریخته شد.

حجم های مورد نیاز از اجزاء PCR جهت انجام واکنش :

اجزاء ترکیبی	حجم (میکرولیتر)	غلظت نهایی
۱۰ ×بافر واکنش	۵	۱ X
مخلوط dNTP	۱	۰/۲ mM each
Taq Polymerase	۰/۵	۱/۲۵ U/50 µl
پرایمرI	۱	۵۰ pM
پرایمر II	۱	۵۰ pM
MgC12	۱/۳	۱/۵ pM
D.D.W	۳۹/۲	–
DNA الگو	۱	–

پس از مخلوط کردن جهت انجام واکنش PCR لوله ها سریعا به داخل ترموسایکلر با برنامه ریزی مشخص که ذکر گردیده است جهت ۲۵ سیکل قرار داده شد. اندازه محصول PCR ، ۴۸۰ bp می باشد.

Initial Denaturation	۹۴ °c	۲ دقیقه
Denaturation	۹۴ °c	۱ دقیقه
Annealing	۶۰ °c	۱ دقیقه
Extention	۷۲ °c	۱ دقیقه
Final Extention	۷۲ °c	۱۰دقیقه(۲۵ سیکل)

– شناسایی محصول PCR : بررسی محصولات ، با استفاده از ژل الکتروفورز بر روی ژل آگارز (Gibco) ۱/۵٪ انجام گرفت. رنگ آمیزی به کمک اتیدیوم بروماید ۱۰ µg/ml و عکسبرداری با استفاده از دستگاه Gel Duccumentation انجام گردید جهت تخمین اندازه قطعات DNA الکتروفورز شده ، از یک مارکر با وزن مولکولی ۱۰۰ bp (Gene Ruler Plus) استفاده شد و همچنین در تمامی مراحل آزمایشات فنوتیپی و PCR از یک کنترل مثبت (شاهد مثبت) V.cholerae O_1 ElTOR ATCC 14033 استفاده گردید (شکل ۱).

نتایج :

۱۰۰ سویه جمع آوری شده از چهار شهر مختلف ایران ، به ترتیب شامل : ۳۲ سویه از تهران ، ۳۰ سویه از اهواز ، ۲۶ سویه از کاشان و ۱۲ سویه از کرمانشاه بودند. از نظر بررسی های باکتریولوژیک ، ۱۰۰ ٪ سویه ها از نظر حرکت ، اندول ، سیترات و اکسیداز ، واکنش مثبت نشان دادند و از نظر آزمونهای متیل ، رد و وژپروسکوئر به ترتیب ۳٪ و ۵۴٪ نتایج مثبت داشتند و همچنین ۱۰۰٪ سویه ها نیز از نظر مقاومت به پلی میکسین B و آنزیم اوره آز ، منفی گزارش گردیدند. از نظر ایجاد فنوتیپ همولیز بتا بر روی بلاد آگار نیز ، ۹۵٪ فنوتیپ مثبت و تنها ۵٪ از سویه ها، همولیز منفی را نشان دادند. از نظر سروتایپینگ نیز ۷۴٪ سویه ها سروتیپ اوگاوا ، ۳٪ اینابا و ۲۳٪ NAG بودند. در تهران وکرمانشاه ، ۱۰۰٪ سویه ها اوگاوا ، در اهواز نیز از ۳۰ سویه ارسالی ، ۹۰٪ اوگاوا و ۱۰٪ اینابا بودند (نمودارهای ۱ و۲).

همچنین از ۲۶ سویه مورد بررسی در کاشان ، ۸۵٪ سویه ها NAG و ۲۵٪ سروتیپ اوگاوا بودند. از بین ۵٪ از موارد سویه های همولیز منفی بر روی بلادآگار ۴ سویه اوگاوا و ۱ سویه NAG گزارش گردیدند.

ازنظر بررسی مقاومت آنتی بیوتیکی ، به ترتیب : ۷۴٪ ، ۶۳٪ ، ۶۲٪ ، ۵۳٪ و ۲۷٪ از سویه ها به کوتریموکسازول، اریترومایسین، اکسی تتراسیکلین،

Downloaded from sjsph.tums.ac.ir at 19:19 IRDT on Wednesday September 20th 2017

تتراسیکلین، کلرامفنیکل مقاومت نشان دادند. در کاشان نیز ۸۴٪ سویه ها به اریترومایسین مقاوم بودند، درحالی که به آنتی بیوتیک های دیگر کاملاً حساسیت داشتند. همچنین از ۵ ایزوله ای که عدم همولیز بر روی بلادآگار نشان دادند، ۴ ایزوله ، مقاومت چندگانه به کوتریموکسازول، اکسی تتراسیکلین ، تتراسیکلین و اریترومایسین داشتند و یک ایزوله که ازکاشان جدا شده بود ، همانند دیگر نمونه های کاشان ، کاملاً به تمامی آنتی بیوتیک های استفاده شده غیراز اریترومایسین حساس بود (نمودار ۳).

در بررسی مولکولی ژن *hly* A با روش مولکولی PCR، همگی وجود ژن بیماریزای *hly* A رانشان دادند، درحالی که ۹۵٪ سویه ها فنوتیپ همولیزین بتا را بر روی محیط بلاد آگار نشان دادند و ۵٪ آنها فنوتیپ منفی داشتند (شکل ۱).

بحث :

در این مطالعه که برای اولین بار در ایران انجام شد، بررسی اپیدمیولوژیکی ویبریوکلرا التور بر روی ۱۰۰ سویه از شهرهای مختلف : تهران، کاشان ، کرمانشاه و اهواز انجام گرفت که علاوه بر بررسی سرولوژیکی و مقاومت آنتی بیوتیکی ، مطالعه ژنتیکی آنها نیز انجام شد. در این مطالعه ، مشخص شد که باتوجه به داشتن فنوتیپ همولیز در ۹۵٪ سویه ها بر روی محیط بلادآگار ، ۱۰۰٪ سویه ها واجد ژن *hly* A هستند و همگی نیز از نظر ایجاد اسهال وبایی مثبت می باشند و این مسئله می تواند بیانگر ارتباط ایجاد گاستروآنتریت و وجود این ژن باشد (Robert M. and Joseph M. 2004). در تحقیقی که در سال ۱۹۹۸ بر روی۲۶ نمونه ویبریوکلراالتور انجام گرفت، در هر ۲۶ نمونه مورد بررسی ، وجود ژن *hly* A مثبت گزارش شد، در حالی که ۴ نمونه آن فنوتیپ همولیز بتا را بر روی بلادآگار نشان ندادند (Singh D.V. and Matte G.R. 2001).

همچنین درشهرستانهای مختلف تفاوتی در الگوی سرولوژیکی و ژن *hly* A دیده نشد. همچنان که در مراجع مختلف نیز ذکر گردیده است ، *hly* A به عنوان عامل همولیز و سیتولیز سلولی در ایجاد گاستروآنتریت وبایی دخالت دارد ، بویژه در مواقعی که اثری از وجود ژن کلراتوکسین نباشد ، این توکسین می تواند عامل اصلی ایجاد اسهال وبایی باشد (Nagamune K. and Yamamoto K. 1995) لذا با تشخیص سریع آن توسط بررسی مولکولی، می توان به عامل بیماری پی برد و این بررسی از جهت تحقیقات اپیدمیولوژیک و تحقیقات ژنتیکی دیگر مرتبط با این بیماری ، با ارزش می باشد.

درسال ۱۹۹۹ ، در بررسی نمونه های بدست آمده از اپیدمی وبا در آمریکای لاتین که بین سالهای ۱۹۹۱ تا ۱۹۹۳ بود مشخص گردید عامل بیماری کاملاً جدا از بقیه زیرگروههای قبلی (کلاسیک – التور) می باشد که هیچکدام از فاکتورهای ویرولانس شناخته شده CT ، tcp ، tdh و zot را ترشح نمی کند ؛ در حالی که ژن همولیزین – سیتولیزینی که باعث واکوئله شدن سلولی می شد را ترشح می کرد (Colombo M. and Mastrandrea S. 1997).

همچنین در تحقیقی که در سال ۱۹۹۹ بر روی ۱۰۰ نمونه محیطی وانسانی آلوده به ویبریوکلرا در کلکته هند انجام شد، ۱۶ مورد آن ، سیتولیز سلولی را بروز ندادند، درصورتی که همگی آنها وجود ژن hly A را بوضوح نشان دادند (John Albert M. and Nurul A. 1997).

در رابطه با بررسی سرولوژیکی ، قابل ذکر است که از ۱۰۰ سویه مورد بررسی ، ۷۴٪ از سویه ها اوگاوا، ۲۳٪ NAG و ۳٪ از سویه ها سروتایپ اینابا بودند. در بررسی سرولوژیکی که در سال ۱۹۹۳ در تایلند بعمل آمد، از ۲۶ سویه بدست آمده ، ۲۴ سویه آن اوگاوا بوده است. در سال ۱۹۹۴ نیز در بررسی دیگری که در تایلند بعمل آمد از ۵۰

Downloaded from sjsph.tums.ac.ir at 19:19 IRDT on Wednesday September 20th 2017

سویه التور، تمامی آنها اوگاوا گزارش گردید (Dalasgarad A. and Forslund A. 1999).

همچنین در بررسی که در سال ۱۹۹۹ در ژاپن صورت گرفت، از ۶۷ مورد ویبریوکلراالتور ، ۶۶ مورد سروتایپ اوگاوا و تنها یک مورد اینابا گزارش گردیده است (Mitra R. and Figuerua P. 2000).

دراین مطالعه، مقاومت چندگانه ای به آنتی بیوتیکهای کلرامفنیکل، تتراسیکلین، اکسی تتراسیکلین، کوتریموکسازول واریترومایسین مشاهده می شود که قابل بحث و ارزیابی است. در تحقیقات مختلف نیز ، گزارشاتی مبنی بر ایجاد مقاومت چندگانه آنتی بیوتیکی ویبریوکلرا به کلرامفنیکل ، اریترومایسین، کانامایسین، تتراسیکلین و کوتریموکسازول ارائه شده است (Nagamune K. and Yamamoto K. 1997).

در مطالعه ای که بین سالهای ۱۹۹۱ تا ۱۹۹۴ در آنگولا انجام شد، مقاومت آنتی بیوتیکی چندگانه ویبریوالتور به کلرامفنیکل ، تتراسیکلین، کوتریموکسازول و اریترومایسین مشاهده شد که چه بسا یکی از عوامل مهم پایداری و ثبات اپیدمی در طی ۴ سال ، همین وجود مقاومت چندگانه آنتی بیوتیکی باشد(Alm R. and Manning P. 1988).

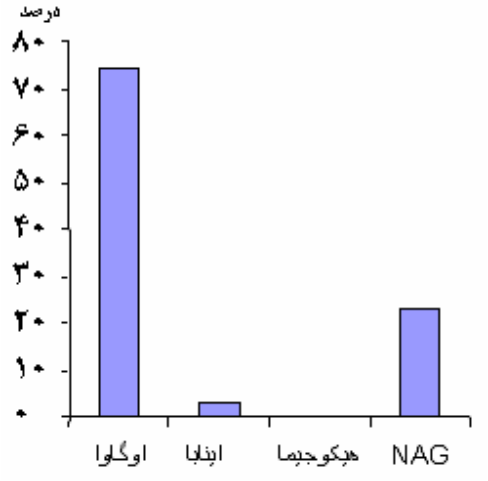
درسال ۱۹۹۴ نیز در تحقیقی که در ایتالیا بر روی ۱۲ مورد بیمار وبایی انجام گرفت، همگی آنها به تتراسیکلین و کوتریموکسازول مقاوم، درحالی که به سیپروفلوکسازین حساس بودند (Irma N. and Chung J.1988). از نظر الگوی مقاومت در بررسی انجام شده، داروی انتخابی جهت درمان در مرحله اول سیپروفلوکسازین، و پس از آن جنتامایسین وداکسی سیکلین می باشد. این درحالی است که طی ۳۰ سال گذشته، تتراسیکلین به عنوان داروی انتخابی جهت درمان ویبریوکلرا بکار می رفته است و به مرور زمان مقاومت به این دارو گسترش جهانی پیدا کرده است. این مقاومت، کاملاً نوسان پذیر است. مقاومت چندگانه ای به کوتریموکسازول، اکسی تتراسیکلین، تتراسیکلین، اریترومایسین و کلرامفنیکل در شهرهای تهران، کرمانشاه و اهواز مشاهده می شود؛ درحالی که در کاشان، همگی نمونه های موردبررسی ، بجز اریترومایسین به بقیه آنتی بیوتیکها کاملاً حساس بودند.

نتیجه گیری :

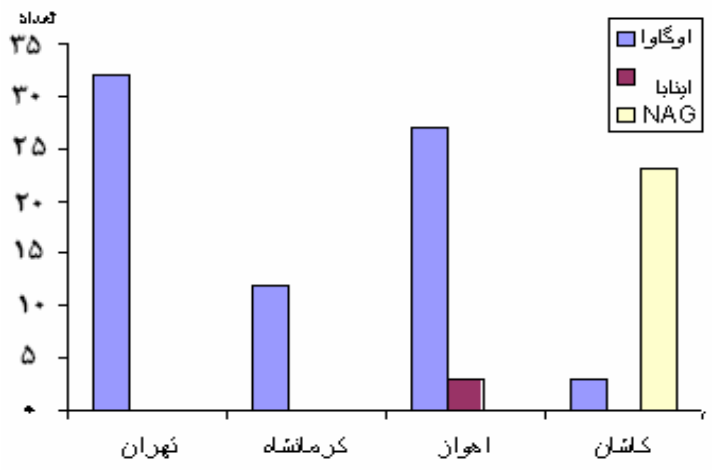
همانطور که در این تحقیق مشاهده شد و در منابع مختلف نیز بیان گردیده است. توالی ژنی *hly* A در هر دوسویه ویبریوالتور همولیتیک و غیرهمولیتیک وجود دارد. *hly* A در هر دو سویه همولیتیک وغیرهمولیتیک ویبریوالتور O_1 باعث ایجاد اسهال و تجمع مایعات می شود. شناسایی سریع آن می تواند در تشخیص بیماری وبا، بخصوص زمانی که ژن کلراتوکسین در باکتری وجود نداشته باشد، کمک مؤثری نماید (Kurazono H. and Pal A. 1995). ژن *hly* A در سویه های مورد بررسی مربوط به بیمارانی که با اسهال وبایی مراجعه کرده بودند، مشاهده شد و یکی از عوامل پاتوژنیسیته میکروب محسوب می شود.

درتحقیق انجام شده، سویه غالب از نظر سروتایپ اوگاوا مشخص شده است، همچنانکه در اکثرکشورهای آسیایی نیز سروتایپ غالب، تاکنون اوگاوا گزارش گردیده است. تفاوت بارز الگوی مقاومت شهر کاشان ، قابل بحث و ارزیابی است.

Downloaded from sjsph.tums.ac.ir at 19:19 IRDT on Wednesday September 20th 2017

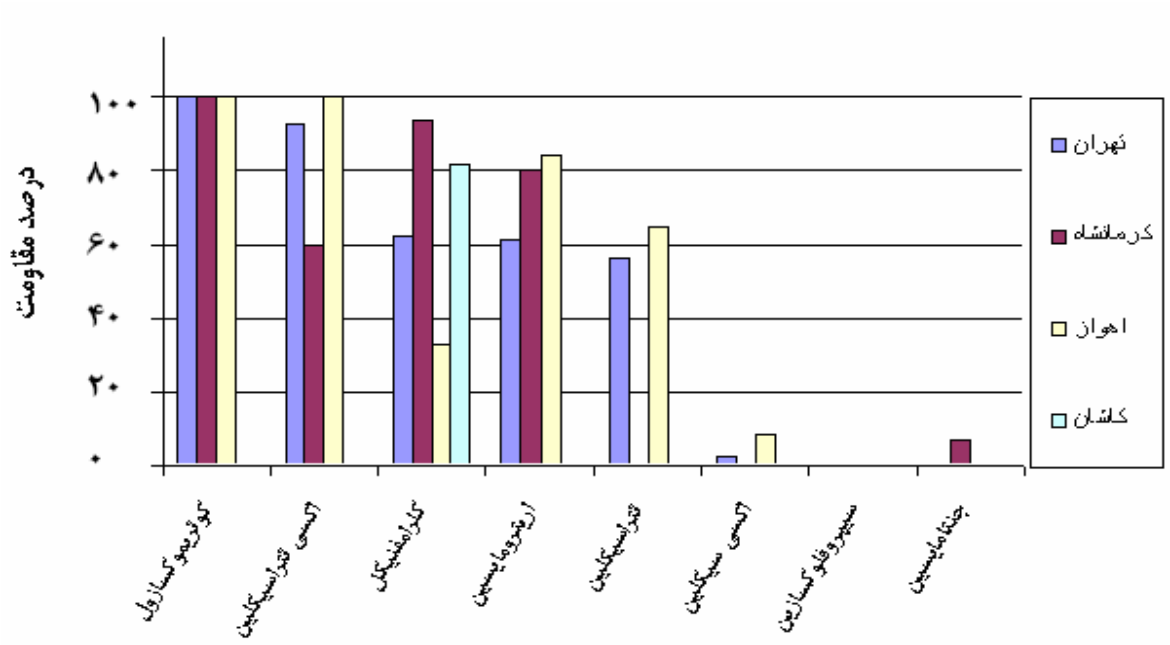


نمودار ۱- بررسی سرولوژیکی ویبریو کلراالتور

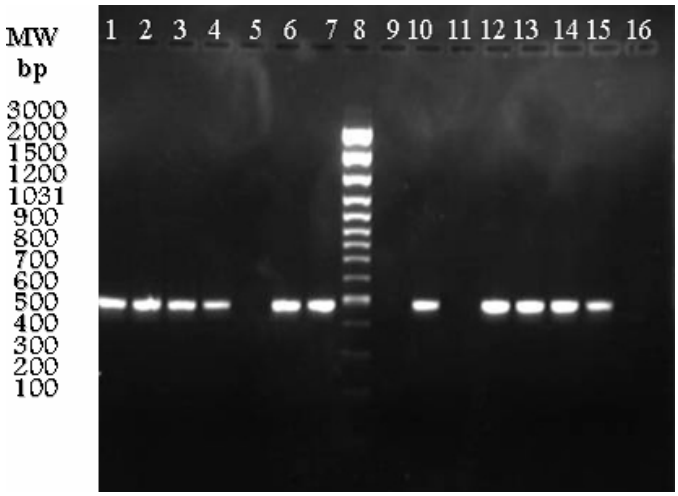


نمودار ۲- بررسی سرولوژیکی ویبریوکلراالتور در شهرهای مختلف ایران

Downloaded from sjsph.tums.ac.ir at 19:19 IRDT on Wednesday September 20th 2017



نمودار ۳- درصد مقاومت آنتی بیوتیکی ویبریو کلرا التور درشهرهای مختلف ایران



شکل ۱- تست تشخیص اختصاصی بودن پرایمرها با تکثیر قطعه ۴۸۰ جفت بازی. ژن ***hly* A** سویه های متعلق به ویبریوکلراالتور بوسیله واکنش زنجیره ای پلیمراز و استفاده همزمان از ژنوم باکتریهای استافیلوکوک اورئوس ، اشریشیاکلی و آئروموناس هیدروفیلا، کنترل منفی (فاقد **DNA** الگو) و کنترل مثبت (***V. cholerae O1 ElTor*, ATCC: 14033**) .ردیف ها به ترتیب ۱،۲،۳،۴،۶،۷،۱۰،۱۲،۱۳،۱۴مربوط به ژنوم ویبریو کلرا التور، ردیف ۵ مربوط به ژنوم استافیلوکوک اورئوس، ردیف ۹ مربوط به ژنوم اشریشیا کولی، ردیف ۱۱ مربوط به ژنوم آئروموناس هیدروفیلا، ردیف ۱۵ مربوط به ژنوم کنترل مثبت، ردیف ۱۶ مربوط به کنترل منفی، ردیف ۸ مارکر مولکولی**100-3000bp**

Downloaded from sjsph.tums.ac.ir at 19:19 IRDT on Wednesday September 20th 2017

References:

Alm R. and Manning P. (1988) Extracellular protein of V.cholerae, *Mol. Microbiol.* **2**(4): 481- 8.

Ansaruzzaman M. and Bhuiyan N.A. (2004) Cholera in Mozambique, Variant of Vibrio cholerae, *Emerging Infectious Diseases.* **10**(11).

Arakawa E. and Murase T. (2000) Pulsed – Field Gel Electrophoresis Based Molecular Comparison of V.cholerae O1 Isolated from Domestic and Imported Cases of Cholera in Japan, *Journal of Clinical Microbiology.* **38**(1): 424- 246.

Bidinost C. and Saka H.A. (2004) Virulence factors of non-O1 non-O139 V.Cholerae isolated in Cordoba, Argentina, *Revista Argentina de Microbiologia.* **36:** 158- 163.

Colombo M. and Mastrandrea S. (1997) Tracking of clinical and environmental V.cholerae O1 strains by combined analysis and ERIC PCR.FEMS., *Immunology and Medical Microbiology.* **19:**33- 45.

Dalasgaard A. and Forslund A. (1999) A high proportion of V.cholerae strains isolated from children with diarrhea in Bangkok, Thailand are multiple antibiotic resistant and belong to heterogenous non-O1, non-O139, O-Serotypes, *Epidemiol. Infec.* **122:** 217- 226.

Irma N. and Chung J. (1988) Genotypes associated with virulence inenvironmental Isolates of Vibrio cholerae, *Applex and Environ Microbiology.* **67**(6): 2421- 2429.

John Albert M. and Nurul A. (1997) Phenotypic and Genotypic changes in Vibrio cholerae O139 Bengal, *Journal of Clinical Microbiology.* **35**(10): 2588- 2592.

Kurazono H. and Pal A. (1995) Distribution of genes encoding cholera toxin, zonula occuldens toxin accessory cholera toxin, and El Tor hemolysin in Vibrio cholerae of diverse origins, *Microbial pathogenesis.* **18:** 231- 32.

Mitra R. and Figuerua P. (2000) Cell Vacuolation a Mainfestation of the El Tor hemolysin of Vibrio cholerae, *Infect and Immune.* **68**(4): 1928- 1933.

Murray P.R. (2003) Medical Microbiology Bacteriology Vol. 1, 8th Edition ASM Press, Washington DC.

Nagamune K. and Yamamoto K. (1995) Cloning and Sequencing of a novel hemolysin gene of Vibrio cholerae, *FEMS Microbiology Letters.* **128:** 265- 269.

Nagamune K. and Yamamoto K. (1997) Intramolecular chaperone activity of the pro-region of Vibrio cholerae El Tor cytolysin, *JBC.* **272**(2): 1338- 1343.

Pourshafie MR. and Grimoont F. (2002) A molecular and phenotypic study of Vibrio cholerae in Iran, *Med. Microbiol.* **51:** 392- 95.

Robert M. and Joseph M. (2004) Vibrio. Bacteriological Analytical Manual Online. Chapter9.

Singh DV. And Matte GR. (2001) Molecular Analysis of Vibrio cholerae O1, O139, non-O1 and non-O139 strains, *AEM.* **67**(2): 910- 921.