مجله علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی
دوره ۲۰، شماره ۴، زمستان ۸۹، صفحات ۲۵۲ تا ۲۵۷

Original Article

بررسی مولکولی سرواپیدمیولوژی وبا طی یک مطالعه ۵ ساله در ایران

افسون شریف‌نیا[۱]، بی‌تا بخشی[۲]، مهرداد هاشمی[۳]، محمدرضا پورشفیع[۴]

[۱] کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران
[۲] استادیار، دکترای باکتری‌شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس
[۳] استادیار، دکترای ژنتیک مولکولی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد پزشکی تهران
[۴] دانشیار، دکترای باکتری‌شناسی پزشکی، بخش میکروب‌شناسی، انستیتو پاستور ایران

چکیده

سابقه و هدف: *وبا نوعی بیماری اسهالی حاد است که توسط سروتیپ‌های مختلف ویبریو کلرا ایجاد می‌شود. از میان بیش از ۲۰۰ سروتیپ O آنتی‌ژنی شناسایی شده در این باکتری، تنها دو سروتیپ O_1 و O_{139} عامل اکثر اپیدمی‌ها وپاندمی‌های بزرگ در سراسر جهان هستند. موارد متعددی از سروگروه‌های اینابا واوگاوا طی سال‌های گذشته در ایران دیده شده است. در این مطالعه، سرواپیدمیولوژی وبا در ایران طی یک مطالعه ۵ ساله بین سال‌های ۱۳۸۳ تا ۱۳۸۷بررسی شد.*

روش بررسی: *در این مطالعه توصیفی، از مجموع نمونه‌های مدفوعی مشکوک به آلودگی با میکروب وبا، کشت در محیط TCBS انجام شد. پس از رشد کلنی‌ها برروی TCBS یک کلنی انتخاب شده و برروی محیط BHI کشت داده شد. از کشت باکتری برروی این محیط برای انجام تست های بیوشیمیایی تشخیصی و تعیین سروگروپینگ و بیوتایپینگ سویه‌ها استفاده شد.*

یافته‌ها: *از مجموع ۹۳ سویه بالینی به دست آمده طی ۵ سال (۱۳۸۷-۱۳۸۳) که در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفتند، انواع سروتیپ های اوگاوا، اینابا وهیکوجیما از بیوتیپ التور به دست آمد.*

نتیجه‌گیری: *این مطالعه نشان دهنده کاهش قابل ملاحظه تعداد سویه‌های اوگاوا در مقایسه با سویه‌های اینابا در طی سال‌های اخیر در ایران است. اگرچه موارد بسیار اندکی از سویه‌های هیکوجیما در سال‌های ۱۳۸۶و۱۳۸۷ در ایران مشاهده شده است.*

واژگان کلیدی: *ویبریو کلرا، اوگاوا، اینابا، هیکوجیما.*

مقدمه

وبا نوعی بیماری اسهالی است که توسط نوعی باکتری گرم منفی به نام ویبریو کلرا ایجاد می‌شود. تاکنون بیش از ۲۰۰ سروتیپ مختلف O- آنتی‌ژنی از این باکتری شناسایی شده است. اما تنها دو سروتیپ O_1 و O_{139} عامل اپیدمی‌ها وپاندمی‌های بزرگ در جهان هستند (۱،۲). بیماری حاصل از این دو سروتیپ می‌تواند به سرعت به دهیدراتاسیون و مرگ منجر شود (۳). پیش‌بینی می شود سالانه بیش از ۱۲۰۰۰۰ مرگ و میر ناشی از وبا در جهان رخ دهد (۴). این بیماری مشکل بزرگ کشورهای در حال توسعه از جمله ایران است. هفت پاندمی وبا گزارش شده که در طی آن ویبریو کلرا O_1 بیوتیپ التور به بسیاری از کشورهای آسیایی گسترش یافته است (۵). سروتیپ O_{139}، اول بار در سال ۱۹۹۲ مشاهده شد و به عنوان عامل وبای اپیدمیک در بنگلادش معرفی شد (۶). تاکنون سروتیپ O_{139} در ایران مشاهده نشده است (۸،۷). مطالعات ریبوتایپینگ سویه‌ها منشا سویه‌های توکسیژنیک O_{139} را سویه‌های O_1 التور معرفی می‌کند (9). ویبریو کلرا O_1 دارای دو بیوتیپ کلاسیک و التور است که هر یک بر حسب نوع آنتی‌ژن‌های موجود در ساختار آنتی‌ژن O دیواره سلولی خود به سه

آدرس نویسنده مسئول: تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، بی‌تا بخشی
(**email**: b.bakhshi@modares.ac.ir)

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۸/۷/۱۹
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۸۸/۱۲/۱۱

سروگروپ اوگاوا، اینابا و هیکوجیما طبقه‌بندی می‌شوند. سروگروپ اینابا آنتی‌ژن‌های A و C را بیان می‌کند، در حالی که سویه‌های اوگاوا آنتی‌ژن‌های A و B را بیان می‌کنند. سروگروپ هیکوجیما که نسبت به دو سروتیپ قبل نادرتر و ناپایدارتر است، هر سه آنتی‌ژن A، B و C را بیان می‌کند (۱۰). اساس تقسیم‌بندی بیوتیپ‌ها، تفاوت‌های بیوشیمیایی از قبیل حساسیت به پلی میکسین B، هماگلوتیناسیون گلبول‌های قرمز جوجه، همولیز گلبول های قرمز گوسفند، حساسیت به فاژ IV و تست Voges Proskauer (VP) می‌باشد (۱۱). از آنجا که وقوع پدیده serotype conversion دربین سویه‌های اوگاوا واینابا به اثبات رسیده است، چنین به نظر می‌رسد که سویه‌های هیکوجیما، سویه‌هایی حدواسط بین سویه‌های اوگاوا واینابا در حین وقوع پدیده serotype conversion می‌باشند (۱۲). فرکانس تبدیل سویه‌های اوگاوا به اینابا 10^{-5} است، در حالی که تبدیل اینابا به اوگاوا بسیار نادر و تا حد زیادی وابسته به سویه است (۱۳).

هدف اصلی این مطالعه تجربی، بررسی اپیدمیولوژی سروگروه‌های مختلف ویبریو کلرا O1 در طی یک مطالعه پنج ساله در ایران بین سال‌های ۱۳۸۳ تا ۱۳۸۷است.

مواد و روشها

در این مطالعه توصیفی، جهت جمع‌آوری نمونه، سواب‌های رکتال با استفاده از سواب‌های استریل که به مدفوع بیمار آغشته بود و در محیط کشت انتقالی Cary-Blair Semisolid Transport medium قرار گرفته بود، تهیه گردید و از مراکز بهداشتی- درمانی و بیمارستان‌های استان‌های مختلف کشور به انستیتو پاستور ایران فرستاده شد.

سواب‌های رکتال بلافاصله در محیط Alkaline Pepton Water (APW) که دارای PH برابر ۸ می‌باشد و برای ویبریوها غنی کننده است، کشت داده شد و به مدت ۱۸-۱۶ ساعت (overnight) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. از این محیط برروی محیط TCBS کشت داده شد.

سپس به منظور انجام آزمون‌های بیوشیمیایی، بعد از ۲۴-۱۸ ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی‌گراد، تک کلنی‌های زرد رنگ (ساکارز+) برروی محیط BHI (Brain Heart Infusion) کشت داده شد. از کشت باکتری برروی این محیط برای انجام تست‌های بیوشیمیایی تشخیصی و سروگروپینگ سویه‌ها استفاده شد. تست های بیوشیمیایی مورد استفاده برای تشخیص ویبریو کلرا شامل تست‌های اکسیداز، حرکت، اورنیتین دکربوکسیلاز، آرژنین دهیدرولاز، اندول، TSI، استرینگ تست و تست نیاز به نمک برای رشد است که طبق پروتکل‌های استاندارد جهت تعیین هویت سویه‌های ویبریوکلرا انجام شد (۱۵،۱۴).

تست نیاز به نمک برای رشد، بخش مهمی از تشخیص ویبریوکلرا می‌باشد، زیرا بسیاری از گونه‌های ویبریو هالوفیل هستند و برای رشد به افزودن NaCl نیاز دارند. دو گونه استثنا در این مورد ویبریو کلرا و ویبریو میمیکوس هستند. جهت انجام این تست مقدار بسیار کمی از باکتری در محیط‌های نوترینت براث بدون NaCl و نوترینت براث‌های حاوی غلظت‌های مختلف نمک (۲، ۴، ۸ و۱۶ درصد) تلقیح شدند و سپس لوله‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. در صورت عدم مشاهده رشد در این مدت، محیط‌ها به مدت ۷ روز نگهداری می‌شدند (۱۶).

برای انجام تست استرینگ، یک لوپ از کشت باکتری برروی محیط آگار در یک قطره محلول ۵ درصد دزوکسی کولات سدیم حل شد. دزوکسی کولات سدیم، سلول‌های باکتری را لیز کرده و سبب آزادسازی DNA آن می‌شود. در نتیجه مخلوط حاصل حالت کشسانی پیدا کرده و این حالت زمانی که یک لوپ از باکتری را به آرامی از سوسپانسیون دور می‌کنیم، شکل می‌گیرد (۱۶).

تست‌های دکربوکسیلاز و دهیدرولاز اسیدهای آمینه در محیط‌های حاوی اسیدهای آمینه آرژنین، لیزین و اورنیتین که معمولا برای افزایش رشد ویبریو کلرا به همراه ۱ درصد نمک NaCl تهیه می‌شوند، انجام گرفت (۱۶).

از کلنی‌های رشد یافته برروی محیط BHI جهت انجام تست اکسیداز استفاده شد. مقداری از کلنی باکتری بر روی کاغذ صافی حاوی تترا متیل پارا فنیلین دی آمین هیدروکلراید قرار داده شد. تغییر رنگ کاغذ به رنگ بنفش تیره نشان دهنده واکنش مثبت است (۱۷). از محیط SIM جهت بررسی تولید اندول و حرکت باکتری استفاده شد. مشاهده کدورت در اطراف خط کشت باکتری نشان دهنده حرکت و واکنش مثبت است. با افزودن معرف کواکس ومشاهده رنگ قرمز، تولید اندول توسط باکتری تایید می‌شود (۱۷).

سویه‌هایی که نتایج تست‌های بیوشیمیایی آنها با ویبریو کلرا مطابقت داشت، جهت انجام بیوتایپینگ و سروتایپینگ انتخاب شدند. تایید ژنتیکی سویه‌ها با استفاده از PCR ناحیه 16s-23s intergenic space اختصاصی برای گونه ویبریو کلرا انجام شد (۱۸). توالی پرایمرهای VC-F و VCM-R در جدول ۱ آمده است.

جدول ۱- توالی پرایمرهای forward وreverse مورداستفاده جهت انجام PCR اختصاصی گونه ویبریوکلرا.

Primer designation	Sequence
VC-F	5' AGTCACTTAACCATTCAACCCG 3'
VCM-R	5' TTAAGCGTTTTCGCTGAGAATG 3'

DNA مورد استفاده جهت انجام PCR فوق، به روش جوشاندن استخراج شد. برنامه PCR در ذیل آمده است:
یک سیکل دناتوراسیون ابتدایی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، سپس ۳۰ سیکل دناتوراسیون در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، Annealing در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و Extension در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه و در نهایت یک سیکل Extension نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه.
سروتایپینگ سویه‌ها با استفاده از آنتی‌سرم‌های پلی والان O_1 و O_{139} و نیز آنتی‌سرم‌های اختصاصی اینابا و اوگاوا انجام شد. دراین روش که بر اساس دیدن رسوب قابل مشاهده (در واکنش مثبت) در نتیجه آگلوتیناسیون بین آنتی‌ژن‌های موجود در سطح باکتری و آنتی‌سرم‌های اضافه شده بر روی لام می‌باشد، سروتیپ‌ها و ساب سروتیپ‌های سویه‌های مختلف ویبریو کلرا شناسایی شدند. اساس واکنش، پرسیپیتاسیون است.
بیوتایپینگ سویه‌ها با استفاده از تست VP (Voges Proskauer) انجام شد. واکنش مثبت VP نمایانگر توانایی باکتری در تولید استیل متیل کربینول (استوئین) از گلوکز موجود در محیط کشت MRVP broth می‌باشد. حضور استیل متیل کربینول توسط معرف‌های KOH و آلفانفتل شناسایی می‌شود. ایجاد رنگ صورتی یا قرمز نشان دهنده واکنش مثبت است (۱۷).

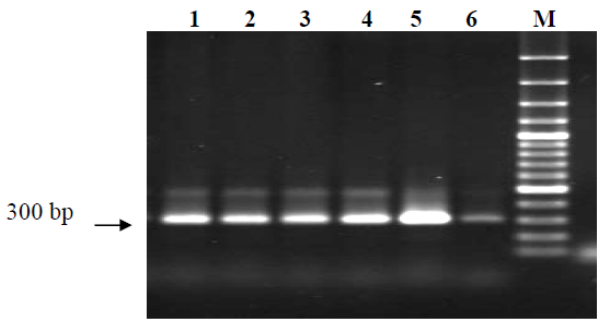
یافته‌ها

کشت‌های TCBS پس از ۲۴-۱۸ ساعت مورد بررسی قرار گرفتند. از کلنی‌های زرد رنگ، نسبتا مسطح باقطر تقریبی ۴-۲ میلی‌متر که پس از برداشته شدن از روی محیط کشت جای آن‌ها روی محیط باقی می‌ماند، جهت کشت برروی محیط BHI استفاده شد. اگر از محیط TCBS استفاده نشود، کلنی‌های همولیتیک که پس از انکوباسیون overnight در سطح SBA (Sheep Blood Agar) رشد می‌کنند، باید برای فعالیت سیتوکروم اکسیداز بررسی شوند. ارگانیسم‌های متعلق به جنس ویبریو اکسیداز مثبت هستند (۱۶،۱۷).از کلنی‌های رشد یافته برروی محیط BHI برای انجام تست‌های بیوشیمیایی و سروتایپینگ استفاده شد. نتیجه تست‌های بیوشیمیایی جهت شناسایی ویبریوکلرا در جدول ۲ آمده است.

جدول ۲- مشخصات تست‌های بیوشیمیایی ویبریوکلرا.

نوع آزمایش	واکنش
اکسیداز	+
اندول	+
رشد در صفر درصد نمک	+
اورنیتین دکربوکسیلاز	+
آرژینین دهیدرولاز	-
حرکت	+
استرینگ تست	+
TSI	A/A بدون تولید گاز و H_2S

سویه‌هایی با مشخصات بیوشیمیایی فوق، به عنوان سویه محتمل ویبریو کلرا، جهت انجام سروتایپینگ انتخاب شدند. البته پیش از انجام سروتایپینگ، هویت سویه‌های محتمل ویبریو کلرا توسط PCR اختصاصی گونه ویبریو کلرا در ناحیه 16srRNA-23srRNA intergenic space تایید شد. از بین تمام سویه‌های مورد بررسی، ۹۳ سویه تست‌های بیوشیمیایی کاملا منطبق با الگوی فوق را نشان دادند و نتایج بدست آمده از PCR اختصاصی گونه، آنها را به عنوان سویه‌ای از ویبریو کلرا معرفی کرد. شکل ۱ نمایی از نتایج حاصل از PCR سویه‌ها را نشان می‌دهد. سروتایپینگ سویه‌ها با استفاده از آنتی‌سرم‌های پلی‌والان O_1 و O_{139} و نیز با آنتی‌سرم‌های اختصاصی اینابا و اوگاوا صورت گرفت. ۱۰۰ درصد سویه‌ها متعلق به سروتایپ O_1 بودند. وضعیت سروگروپی سویه‌ها (اینابا، اوگاوا و هیکوجیما) در سال‌های مختلف، نتایج متفاوتی را نشان داد. نتایج حاصل از سروگروپینگ سویه‌ها با استفاده از آنتی‌سرم‌های اختصاصی در جدول ۴ نشان داده شده است.



شکل ۱- PCR اختصاصی گونه ویبریو کلرا در ناحیه intergenic 16srRNA-23srRNA space. شماره های ۵-۱ نتایج PCR سویه های بالینی وشماره ۶ سویه ATCC۱۴۰۳۵ را نشان می دهند. M مارکر 3 kb است.

از مجموع ۹ سویه ویبریو کلرا O_1 به دست آمده از سال ۱۳۸۳، ۱۰۰ درصد سویه‌ها سروگروپ اوگاوا را نشان دادند. در حالی که تمامی ۴۳ سویه ویبریو کلرا O1 به دست آمده از سال ۱۳۸۴ (۱۰۰ درصد سویه ها)، از سروگروپ اینابا بودند. سویه‌های به دست آمده از سال ۱۳۸۵، تنوع سروگروپی بیشتری را نشان دادند، به گونه‌ای که از مجموع ۱۱ سویه به دست آمده در این سال، یک مورد سروگروپ اوگاوا، یک مورد سویه non-O_1 و ۹ مورد سروگروپ اینابا شناسایی شد.

در سال ۱۳۸۶، ۲۰ سویه ویبریو کلرا O_1 شناسایی شد که از این تعداد، ۱۸ سویه اینابا، یک سویه اوگاوا و یک سویه با سروگروپ هیکوجیما به دست آمد.

در سال ۱۳۸۷، در کل ۱۰ سویه ویبریو کلرا O_1 شناسایی شد که از این تعداد، به جز یک مورد سویه هیکوجیما، سایر سویه‌ها سروگروپ اینابا را نشان دادند.

بیوتایپینگ سویه‌ها با استفاده از تست‌های اختصاصی نشان داد که ۱۰۰ درصد سویه‌های مورد استفاده در این مطالعه متعلق به بیوتایپ التور بودند. جدول ۳ توزیع فراوانی سویه‌های مورد مطالعه را برحسب استان و سال جداسازی نشان می‌دهد.

جدول ۳- توزیع فراوانی سویه‌های مورد مطالعه بر حسب استان و سال جداسازی.

سال	تهران	قم	گلستان	سیستان وبلوچستان	کردستان
۱۳۸۳	۰	۰	۰	۹(۱۰۰)*	۰
۱۳۸۴	۱۴(۳۲/۵)	۹(۲۱)	۱۳(۳۰/۲)	۷(۱۶/۳)	۰
۱۳۸۵	۱۱(۱۰۰)	۰	۰	۰	۰
۱۳۸۶	۰	۰	۰	۰	۲۰(۱۰۰)
۱۳۸۷†	-	-	-	-	-

* اعداد داخل پرانتز معرف درصد هستند.

† در مورد استان و یا استان‌هایی که نمونه‌های سال ۱۳۸۷ از آنجا جمع‌آوری شده‌اند، اطلاعی در دست نیست.

توزیع فراوانی نمونه‌های بالینی مورد بررسی در این مطالعه بر حسب سال جداسازی و سروگروپینگ سویه‌ها در جدول ۴ آمده است.

سروگروپینگ سویه‌های هیکوجیما مدتی بعد مجددا تکرار شد. نتایج جالبی در این مرحله بدست آمد که نشان داد سویه‌هایی که نتایج سروگروپینگ آنها تا مدتی پیش آنها را به عنوان سویه هیکوجیما درسال‌های ۱۳۸۶و۱۳۸۷ معرفی می‌کرد (به ترتیب اسفند ۱۳۸۶ و آبان ۱۳۸۷)، در سروگروپینگ جدید به ترتیب به عنوان یک سویه اینابا (خرداد ۱۳۸۷) و اوگاوا (بهمن ۱۳۸۷) شناخته شدند (۱ سویه در سال ۱۳۸۶ معادل ۵ درصد کل سویه‌ها در این سال و ۱ سویه در سال ۱۳۸۷ معادل ۱۰ درصد کل سویه‌ها در این سال).

جدول ۴- توزیع فراوانی نمونه‌های بالینی مورد بررسی در این مطالعه بر حسب سال جداسازی و سروگروپینگ سویه‌ها.

سال	تعداد کل سویه های O_1	اینابا	اوگاوا	هیکوجیما
۱۳۸۳	۹	۰	۹	۰
۱۳۸۴	۴۳	۴۳	۰	۰
۱۳۸۵	۱۰	۹	۱	۰
۱۳۸۶	۲۰	۱۸	۱	۱
۱۳۸۷	۱۰	۹	۰	۱

بحث

این مطالعه نشان داد که در سال‌های اخیر، سویه‌های اینابا در حال غالب شدن نسبت به سویه های اوگاوا هستند وتقریبا بعد ازسال ۱۳۸۳ که تمامی سویه های مورد بررسی در این مطالعه در این سال از سروگروپ اوگاوا بودند، اکثر سویه‌های ویبریو کلرا به دست آمده از سال‌های بعد (۱۳۸۷-۱۳۸۴)، سروگروپ اینابا را نشان دادند. این یافته‌ها را می توان با استفاده از نظریه serogroup conversion توجیه کرد. در واقع نوعی serogroup conversion در سویه های اوگاوا رخ داده است که منجر به تولید سروگروپ‌های اینابا شده است. مطالعات نشان داده که این امر نوعی عکس‌العمل دفاعی میکروارگانیسم در مقابل پاسخ سیستم ایمنی میزبان در طی عفونت می‌باشد. در واقع پاسخ سیستم ایمنی میزبان در طی عفونت، وقوع چنین تغییری (serotype conversion) را در میکروب عامل وبا القا می‌کند (۱۹).

بررسی‌ها نشان داده که انجام این تغییرات، یعنی تبدیل سویه‌های اوگاوا به اینابا، هرگز به یک باره و مستقیما رخ نمی‌دهد، بلکه در طی این تغییر یک مرحله حد واسط و ناپایدار وجود دارد که همان سویه‌های هیکوجیما هستند که از لحاظ نتایج سروگروپینگ، نتایج ناپایداری را نشان می‌دهند (۱۲). همان طور که در این مطالعه مشاهده شد، سروگروپینگ مجدد سویه هیکوجیما متعلق به سال ۱۳۸۶ آن را به عنوان یک سویه اینابا و سروگروپینگ مجدد سویه

هیکوجیما متعلق به سال ۱۳۸۷ آن را به عنوان یک سویه اوگاوا معرفی کرد که این امر خود تاییدی بر ناپایداری و حدواسط بودن سویه‌های هیکوجیما است.

در مطالعه‌ای که توسط کرامت و همکاران در سال ۱۳۷۷ در استان همدان انجام شد و نیز مطالعه‌ای دیگر که توسط خاضعی و همکاران در سال ۲۰۰۵ دردانشگاه علوم پزشکی زابل صورت گرفت، تمامی سویه‌های شناسایی شده و تحت مطالعه (جدا شده طی سال‌های ۲۰۰۰-۱۹۹۷) دارای بیوتیپ التور و سروتیپ اوگاوا گزارش شده‌اند (۲۰،۲۱). تمامی سویه‌های تحت مطالعه ایزدی و همکاران در سال ۱۳۸۲ در شهرستان زاهدان نیز همگی ویبریو کلرا O_1 بیوتیپ التور و سروگروه اوگاوا بودند (۲). ایشان همچنین در مطالعه‌ای دیگر در سال ۲۰۰۶ که به بررسی تعدادی از سویه‌های جدا شده از بیماران در سال ۲۰۰۴ از جنوب استان سیستان و بلوچستان پرداخت، نشان داد که تمامی سویه‌های جدا شده ویبریو کلرا O_1 بیوتیپ التور و سروتیپ اوگاوا بودند (۲۲).

البته چنین به نظر می‌رسد که نه تنها در ایران بلکه در بسیاری از نقاط جهان از جمله هندوستان، سویه‌های اینابا در حال غالب شدن نسبت به سویه های اوگاوا هستند. در مطالعه‌ای که توسط Garg و همکاران در سال ۲۰۰۰ و Taneja و همکاران در سال ۲۰۰۵ به طور جداگانه بر روی سویه‌های ویبریو کلرا O_1 بیوتیپ التور و سرو گروه اینابا در هندوستان انجام شد، مشخص شد که در سال‌های اخیر، این سویه‌ها سویه‌های غالب را در این منطقه در مقایسه با سال‌های پیش از آن، به خود اختصاص داده‌اند (۱۰،۲۳).

نتایج به دست آمده از این مطالعه و مطالعاتی مشابه که به تعیین سروگروه‌های مختلف ویبریو کلرا O_1 پرداخته‌اند، موید این مطلب است که تا پیش از سال ۱۳۸۴ اغلب اپیدمی‌های وبا در ایران توسط سروگروه اوگاوا رخ داده است و پس از این سال فراوانی این سویه‌ها رو به کاهش نهاده و غالبا سویه‌های اینابا مسئول ایجاد اپیدمی در ایران بوده‌اند.

REFERENCES

1. Shimeda T, Arakawa E. Extended serotyping scheme for *Vibrio cholerae.* Curr Microbiol 1994; 28: 175-78.
2. Izadi Sh, Tabatabaei M, Miradi MR, Sheikhzadeh Kh, Amirabadi A. Cholera transmission ways in an epidemics in the summer of 2003 in Zahedan. Tabibe Shargh 2004; 3: 173-81. [In Persian]
3. Jiang SC, Matte M. Genetic diversity of clinical and environmental isolates of *Vibrio cholerae* determined by amplified fragment length polymorphism fingerprinting. Appl Environ Microbiol 2000; 66: 148-53.
4. World Health Organization. Cholerae vaccines. Wkly Epidemiol Rec W.H.O. 2001; 76: 117-24.
5. Yamamato T, Nair GB. Survey of in vitro susceptibilities of *Vibrio cholerae* O1 and O139 to antimicrobial agents.Antimicrob. Agents Chemother 1995; 39: 241-44.
6. Albert MJ. *Vibrio cholerae* O139 Bengal. J Clin Microbiol 1994; 32: 2345-49.
7. Bakhshi B, Pourshafie MR. Genomic organization of the CTX element among toxigenic *Vibrio cholerae* isolates. Clin Microbiol Infect 2008; 14: 562-68.
8. Pourshafie MR, Bakhshi B, Ranjbar R, Sedaghat M, Sadeghifard N, ZaemiYazdi J, *et al.* Dissemination of a single *Vibrio cholerae* clone in cholera outbreaks during 2005 in Iran. J Med Microbiol 2007; 56: 1609-15.
9. Waldor MK, Mekalanos JJ. *Vibrio cholerae* O_{139} specific gene sequences. Lancet 1994; 343: 1366-69.
10. Taneja N, Biswal M, Tarai B, Sharma M. Emergence of *Vibrio cholera* O1 biotype El Tor serotype Inaba in North India. Jpn J Infect Dis 2005; 58: 238-40.
11. Kaper JB, Morris JGJr, Levine MM. Cholera. Clin Microbiol Rev 1995; 8: 48-86.
12. Sakazaki R, Tamura K. Somatic antigen variation in *Vibrio cholerae.* Jpn J Med Sci Biol 1971; 24: 93-100.
13. Bhaskaran K, Gorrill RH. A study of antigenic variation in *Vibrio cholerae.* J Gen Microbiol 1957; 16: 721-29.
14. Ramamurthy T, Bag PK, Pal A, Bhattacharya SK, Bhattacharya MK, Sen D, et al. Virulence patterns of *Vibrio cholerae* non-O1 strains isolated from hospitalized patients with acute in Calcutta, India. J Med Microbiol 1993; 39: 310-17.
15. Choopun N, Louis V, Hug A, Colwell RR. Simple procedures for rapid identification of *Vibrio cholerae* from the aquatic environment. Appl Environ Microbiol 2002; 68: 995-98.
16. Stavric S, Buchanan B. The isolation and identification of *V.cholerae* O_1 and non-O_1 from foods. Ottawa: Government of Canada, Health Protection Branch; 1995. MFLP-72.

17. Kay BA, Bopp CA. Isolation and identification of *Vibrio cholerae* $_{O1}$ from fecal Specimens. In: Wachsmuth IK, Blake PA, Olsvic O, Editors. Vibrio cholerae and cholera: molecular to global perspectives. Washington, DC: ASM press; 1994. p.3-15.

18. Chun J, Huq A. Analysis of 16s-23s rRNA intergenic spaces region of *Vibrio cholerae* and *Vibrio mimicus*. Appl Environ Microbiol 1999; 65: 2202-208.

19. Stroeher UH, Karageorgos LE. Serotype conversion in *Vibrio cholerae* O_1. Microbiology 1992; 89: 2566-70.

20. Keramat F, Ranjbar M, Mahjoob H. Determining of reasons, clinical and laboratorial symptoms in choleraic patients in the epidemics of 1998 in Hamedan province. Journal of Medical science of Hamedan 2003; 29: 43-50. [In Persian]

21. Khazaei HA, Rezaei N, Bagheri GR, Mahmoudi M, Moin AA, Dankoub MA, et al. The epidemiology of *Vibrio cholerae* in Zabol city, southeast of Iran. Arch Iranian Med 2005; 8: 197-201.

22. Izadi Sh, Shakeri H, Roham P, Sheikhzadeh Kh. Cholera outbreak in southeast of Iran: routes of transmission in the situation of good primary health care services and poor individual hygienic practices. Jpn Infect Dis 2006; 59: 174-78.

23. Garg P, Nandy RK. Emergence of *Vibrio cholerae* O1 biotype El Tor serotype Inaba from the prevailing O1 Ogawa serotype strains in India. J Clin Microbiol 2000; 38: 4249-53.