

## بررسی فراوانی انواع ویبریوهای جدا شده از آبهای ساحلی شهر بندرعباس و تعیین مقاومت میکروبی آنها، طی سالهای ۱۳۸۹-۱۳۹۰

احمدعلی پوربابایی<sup>۱</sup>، صفورا هاشمی جوکار<sup>۲\*</sup>، عارف امیرخانی<sup>۳</sup>، اعظم حیدرپور<sup>۴</sup>، محمد خداداد مطلق<sup>۵</sup>

### چکیده

**زمینه و هدف:** ویبریوها به عنوان عامل برخی از اختلالات گوارشی و خارج گوارشی شناخته شده‌اند، که معمولاً در برخی از فصول سال به صورت اپیدمی ظاهر می‌شوند. از آنجایی که دریا به عنوان یکی از زیست‌بوم‌های مهم ویبریوها شناخته شده است، این تحقیق با هدف تعیین فراوانی انواع ویبریوها و تعیین مقاومت میکروبی آنها، در مناطق مختلف ساحلی جنوب کشور در فصول مختلف سال انجام شد.

**روش بررسی:** در این مطالعه توصیفی - مقطعی، ۶۰۰ نمونه آب برداشت شده از آبهای ساحلی شهر بندرعباس از نظر وجود سویه‌های ویبریو در دو فصل بهار و زمستان بررسی شدند. برای تشخیص اولیه، از محیط‌های آب پپتونه قلیایی و TCBS استفاده گردید و با انجام تست‌های بیوشیمیایی (اکسیداز، حرکت، اندول، KIA و سایر آزمون‌های بیوشیمیایی از جمله نمک ۰/۰٪، VP و ONPG) تشخیص نهایی انجام شد.

**یافته‌ها:** ویبریو هاروئی با ۲/۳٪، ویبریو کلرا ۱/۷٪، ویبریو پاراهمولیتیکوس ۱/۳٪، ویبریو فورنسیسی ۱/۲٪، شینگلوئید و ویبریو متسچینوکووی ۱٪، هیدروفیلا ۰/۵٪، ویبریو ولنیفیکوس و ویبریو میمیکوس ۰/۳٪ و ویبریو فلورویالیس ۰/۲٪، بیشترین فراوانی را به خود اختصاص دادند. همچنین برحسب فصول، ۷۱/۲٪ آلودگی مربوط به فصل زمستان و ۲۸/۸٪ مربوط به فصل بهار بود، که نشان می‌داد در زمستان موارد آلودگی بیشتر از فصل بهار بوده است.

**نتیجه‌گیری:** با توجه به مطالعه محققین، جداسازی این گونه‌ها بعد از بارندگی، افزایش می‌یابد. در مطالعه حاضر نیز این پارامتر در جداسازی گونه‌های ویبریو تأثیر مثبت داشته است.

**کلید واژه‌ها:** ویبریو؛ آبهای ساحلی؛ بیماری‌های روده‌ای؛ بندرعباس، ایران.

<sup>۱</sup>استادیار میکروبی‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم، قم، ایران.

<sup>۲</sup>کارشناس ارشد میکروبی‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم، قم، ایران.

<sup>۳</sup>دانشیار اپیدمیولوژی، مرکز انستیتو پاستور، تهران، ایران.

<sup>۴</sup>مربی میکروبی‌شناسی، دانشگاه علوم پزشکی قم، قم، ایران.

<sup>۵</sup>دانشجوی دکتری میکروبی‌شناسی، دانشکده دامپزشکی، علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران.

\*نویسنده مسئول مکاتبات:

صفورا هاشمی جوکار، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم، قم، ایران؛

آدرس پست الکترونیکی:

sa.jokar9@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۱/۷/۲۹

تاریخ پذیرش: ۹۲/۳/۲۷

لطفاً به این مقاله به صورت زیر استناد نمایید:

Pourbabaei AA, Hashemi Jokar S, Amirkhani A, Heydarpour A, Khodadad Motlagh M. Evaluation of the prevalence of *vibrio* species isolated from coastal waters of Bandarabbas and determination of their microbial resistance during 2010-2011, Iran. Qom Univ Med Sci J 2013;7(6):7-13. [Full Text in Persian]

## مقدمه

خلیج فارس با وسعت ۲۳۰ هزار کیلومتر مربع در حاشیه شهر بندرعباس واقع شده است. باد در خلیج فارس به صورت گسترده و به عنوان مهم ترین عنصر جغرافیایی طبیعی عمل می کند. قسمت های شمالی نسبت به نواحی جنوبی خلیج فارس به مراتب بارش بیشتری را دریافت می کند. آبهایی که به خلیج فارس وارد می شوند، اغلب شیرین و حاوی مقدار زیادی مواد غذایی برای موجودات آبرزی هستند. در واقع، از مهم ترین ویژگی های بوم شناسی خلیج فارس می توان به کم عمقی، شوری آب و ارتباط محدود به آبهای آزاد که سبب تشکیل محیط طبیعی ویژه ای شده است، اشاره نمود (۲،۱). شهر بندرعباس واقع در حاشیه خلیج فارس، دارای آب و هوای گرم و مرطوب است و فصل تابستان در این شهر، نزدیک به ۹ ماه از سال ادامه دارد (۳). جمعیت بالا، موقعیت خاص و استراتژیک استان، همجواری با خلیج فارس و پذیرش تعداد بیشماری مسافر و بازرگان در سال، بُعد مسافت تا سایر مراکز استان، بالا بودن میزان هزینه زندگی در استان، محرومیت منطقه، شیوع بیماری های خاص و بروز اپیدمی بیماری های عفونی، از عوامل و ویژگی های خاص این شهر است (۲). در فرهنگ پزشکی و بهداشت، کلمه ویبریو نام بیماری وبا را تداعی می کند (۳). ویبریو باکتری های گرم منفی و خمیده شکلی هستند که در آبهای شور و شیرین، مدفوع انسان و حیوانات یافت می شوند و اکثر آنها نیز ساپروفیت هستند (۴). همچنین برخی از انواع آنها در انسان و عده ای در ماهی ها بیماری زا می باشند. گروهی از این زیستوارک ها عامل اسهال خفیف (شیگلوئیدی) و گروهی نیز موجب اسهال و استفراغ خیلی شدید (وبا) می شوند (۵). در سالهای اخیر علاوه بر ویبریو کلرا (*V. cholerae*)، نقش انواع مختلف ویبریو ها در ایجاد اسهال های وبایی و شبه وبایی مشخص شده است (۶).

حضور ویبریو ها و بیماری زایی آنها به وسیله ویژگی های فیزیکی و شیمیایی محیط آبی تحت تأثیر قرار می گیرد. اگرچه ویبریو کلرا، ویبریو پاراهمولیتیکوس (*V. parahaemolyticus*) و ویبریو ولنیفیکوس (*V. vulnificus*)، پاتوژن های انسانی هستند که به خوبی شناخته شده اند، اما در ۲۰ سال اخیر بسیاری از گونه های ویبریو هالوفیل نظیر ویبریو آلترینولیتیکوس (*V. alginolyticus*)،

ویبریو هولیسائه (*V. hollisae*)، ویبریو فلوویالیس (*V. fluvialis*)، ویبریو هارویی (*V. harveyi*)، ویبریو میمیکوس (*V. mimicus*)، ویبریو فورنسیسی (*V. furnissii*) و فتوباکتریوم دامسلا (*Photobacterium damsela*) در بیماری های روده ای، عفونت های زخم و سپتی سمی به دلیل مصرف صدف داران (*Shellfish*) و قرارگیری در تماس با آب دریا دخیل بوده اند. مکانیسم های واقعی بیماری زایی ویبریو های هالوفیل در انسان به خوبی شناخته نشده است. در واقع، پاتوژن عفونت های ویبریو پیچیده بوده و با انواعی از فاکتورهای بیماری زا نظیر سایتوتوکسین ها، آنروتوکسین ها و آنزیم های لیتیک (تجزیه کننده) مرتبط است. به علاوه، تحقیقات اخیر نشان داده اند برخی از ویبریو ها که به عنوان غیرپاتوژن شناخته شده اند، دارای ژن های *tdh*، *ctx* و *trh* بوده و قادر به تولید توکسین هایی نظیر سم کلرا (*CTX*)، همولیزین مقاوم به گرما (*TDH*) و همولیزین خویشاوند (*TRH*) می باشند (۷).

خانواده ویبریوناسه (*Vibrionaceae*) شامل: سه جنس ویبریو فتوباکتریوم و سالینی ویبریو می باشد (۸). شاخه ویبریونال (*Vibrionales*) از خانواده ویبریوناسه؛ باکتری های میله ای خمیده یا گاهی بدون خمیدگی و گرم منفی به واسطه تاژک های قوی متحرک هستند. تاژک های جانبی اضافی نیز ممکن است به هنگام رشد بر روی محیط های جامد تولید شوند. این تاژک ها از نظر طول و خصوصیات آنتی ژنیکی با یکدیگر متفاوت بوده و تعداد آنها کمتر یا بیشتر از ۱۰۰ تاژک به ازای هر سلول است، که اشکال اندوسپور یا میکروکیست تولید نمی کنند. این خانواده در گروه کموارگانوتروف و بی هوازی اختیاری قرار دارند، و در حقیقت دارای متابولیسم تخمیری و غیر تخمیری بوده و قادر به دنیتریفیکاسیون نیستند. همچنین اغلب سویه ها اکسیداز مثبت بوده و نیترات را به نیتريت احیا می کنند. از  $NH_4$  نیز به عنوان تنها منبع نیتروژن استفاده کرده و در محیط های حداقل حاوی D-گلوکز و یا سایر ترکیبات (به عنوان تنها منبع کربن و انرژی) رشد می کنند. تعدادی از سویه ها به ویتامین ها و برخی به اسیدهای آمینه نیاز دارند و طیف وسیعی از کربوهیدرات های ساده و پیچیده را تخمیر کرده و مورد استفاده قرار می دهند. بیشتر سویه ها به سدیم و یا آب دریا برای رشد نیازمندند و به  $NaCl$  تا ۰/۵٪ برای رشد بهینه

احتیاج دارند. همچنین، درصد C+G در DNA آنها ۵۱-۳۸٪ است (۸). این تحقیق با هدف تعیین فراوانی انواع ویبروها و تعیین مقاومت میکروبی در مناطق مختلف ساحلی جنوب کشور در فصول مختلف سال صورت گرفت.

## روش بررسی

نمونه برداری از آب دریا در سواحل دریای خلیج فارس (استان هرمزگان) و نواحی بندرعباس در فصول بهار و زمستان سال ۱۳۸۹-۱۳۹۰ انجام شد. از مناطق مختلف ساحل و به فواصل تقریباً ۴۰۰m در هر فصل، ۳۰۰ نمونه (به طور کلی ۶۰۰ نمونه) برداشت شد. از نقاط مورد نظر، ۲-۳m داخل آب خلیج و از عمق ۳۰cm آب به وسیله شیشه های دهان گشاد استریل، نمونه گیری انجام شد، سپس در کوتاه ترین زمان، به آزمایشگاه ارسال گردید (۹).

عمل صاف کردن نمونه های جمع آوری شده به وسیله صافی های غشایی با منفذ ۰/۴۵μm صورت گرفت. صافی های غشایی با رعایت شرایط سترون در محیط آب پیتونه نمک دار قلیایی با pH=۸/۶±۰/۲ قرار گرفته و در دمای ۳۵°C به مدت ۶-۸ ساعت گرماگذاری شدند. با استفاده از حلقه کشت سترون، از محیط کشت مذکور برداشت شده و بر روی محیط کشت TCBS آگاردار (تیوسولفات-سیترات-نمک صفراوی-سوکروز آگار) منتقل و به صورت خطی کشت داده شد. سپس پلیت ها در دمای ۳۷°C به مدت ۱۸-۲۴ ساعت گرماگذاری شدند. در نهایت از کلنی های حاصل، کشت خالص تهیه گردید (۹).

برطبق روش های تشخیص ماکروسکوپی، کلنی هایی با ظاهری زرد، زرد متمایل به سبز و سبز رنگ، محدب، مات، دانه دانه، ظریف و کشدار با قطری حدود ۲-۵mm کشت داده شده روی محیط TCBS آگاردار به عنوان ویبرو فرعی انتخاب شدند. تشخیص نهایی با استفاده از واکنش گرم (Burke Method)، تست حرکت، کاتالاز، اکسیداز، KIA (Kliglers Iron Agar)، وجود آنزیم لیزین دکربوکسیلاز، متیل رد (MR)، وژزپروسکوئر (VP) و تولید اندول براساس روش پیشنهادی Smibert و همکاران (سال ۱۹۹۴) صورت گرفت (۱۰). سایر روش های تشخیص بیوشیمیایی ویبرو از جمله نمک

٪، ۶٪ و وجود آنزیم بتاگالاکتوزیداز با استفاده از دیسک NPG (O-Nitrophenyl-β-D-Galactopyranoside) به کار برده شد (۸). الگوی مقاومت سویه های ویبرو جدا شده نسبت به ۹ آنتی بیوتیک (۱۲، ۱۱) خریداری شده از شرکت پادتن طب و با استفاده از روش Kirby-Bauer بررسی شد (۱۳). آنتی بیوتیک های مورد استفاده شامل سیپروفلوکساسین، تری متوپریم، کلرامفنیکل، استرپتومایسین، نالیدیکسیک اسید، ریفامپین، آمپی سیلین، سفتریاکسون، اکسی تتراسیکلین بود. برای انجام تست حساسیت، از محیط مولر هیتون آگار استفاده شد. سوآپ استریل آغشته به سوسپانسیون میکروبی معادل با لوله ۰/۵ مک فارلند بر روی تمام سطح محیط مولر هیتون آگار به طور یکنواخت کشت داده شد و انبوه پلیت ها ۱۵ دقیقه در دمای ۳۷°C قرار گرفتند تا محیط خشک شود. دیسک های آنتی بیوتیک به فاصله ۲/۵cm از مرکز و ۱/۵cm از لبه پلیت قرار داده شدند. سپس پلیت ها در دمای ۳۴°C به مدت ۲۴ ساعت گرماگذاری شدند و قطر هاله ها با توجه به جدول کارخانه سازنده دیسک ها مورد تفسیر قرار گرفت (۱۴).

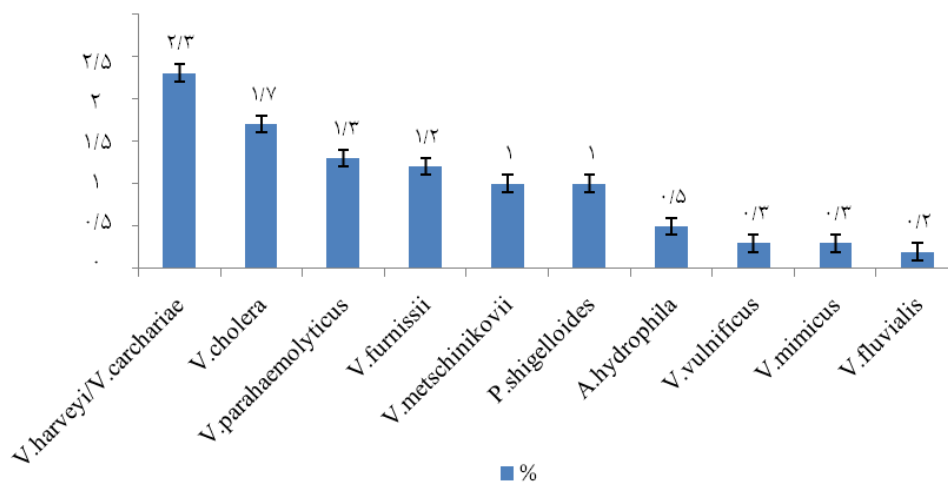
## یافته ها

در این تحقیق از مجموع ۶۰۰ نمونه برداشت شده از آب های ساحلی شهر بندرعباس، ۵۱ مورد ویبرو شامل: ۱۴ مورد (۲/۳٪) ویبرو هاروئی، ۱۰ مورد (۱/۷٪) ویبرو کلرا، ۸ مورد (۱/۳٪) ویبرو پاراهمولیتیکوس، ۷ مورد (۱/۲٪) ویبرو فورنسیسی، ۶ مورد (۱٪) ویبرو متسچینوکوی و P شیگلونید، ۳ مورد (۰/۵٪) هیدروفیلا A، ۲ مورد (۰/۳٪) ویبرو ولنیفیکوس و ویبرو میمیکوس و ۱ مورد (۰/۲٪) ویبرو فلورولایس شناسایی شد.

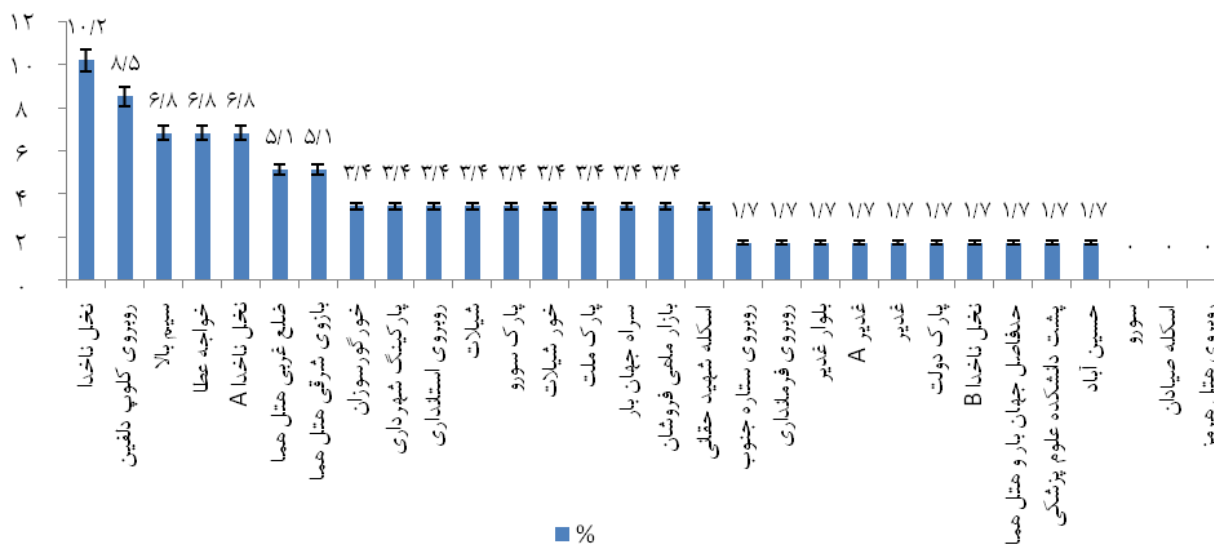
برحسب فصول مورد مطالعه، ۷۱/۲٪ آلودگی مربوط به فصل زمستان و ۲۸/۸٪ مربوط به فصل بهار بود. بیشترین درصد آلودگی مربوط به ایستگاه نخل ناخدا (۱۰/۲٪ موارد مثبت) و ایستگاه روبروی کلپ دلفین (۸/۵٪ موارد مثبت) گزارش شد (نمودار شماره ۱ و ۲). سویه های ویبرو جدا شده در فصل زمستان و بهار از نظر مقاومت به ۹ آنتی بیوتیک بررسی شدند. بیشترین درصد حساسیت در انواع سویه های مختلف مربوط به سیپروفلوکساسین با ۷۹/۷٪ بود.

سفتریاکسون و تتراسایکلین حساس بودند (نمودار شماره ۳).

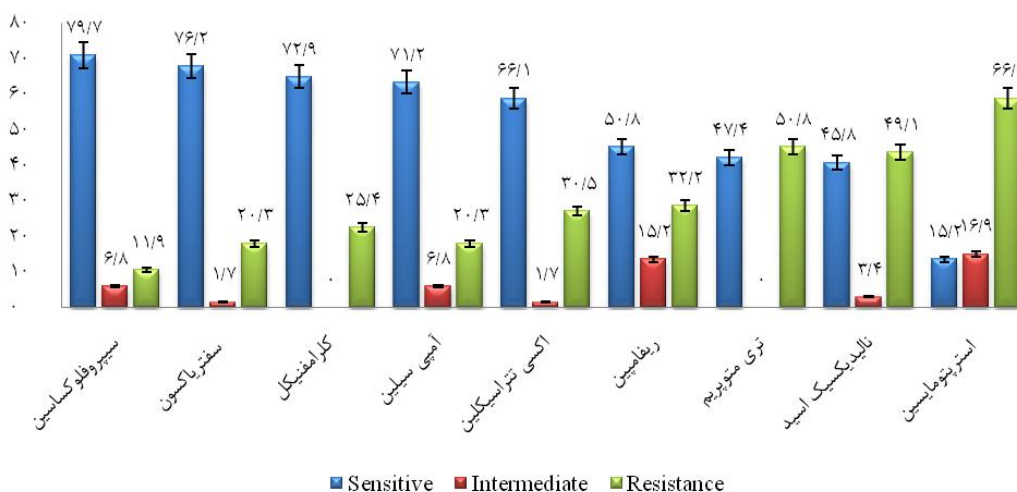
همچنین باکتری‌های مورد بررسی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های کلرامفنیکل، آمپی‌سیلین، ریفامپسین، سیپروفلوکساسین،



نمودار شماره ۱: توزیع درصد آلودگی بر حسب انواع باکتری‌های جدا شده



نمودار شماره ۲: توزیع فراوانی نسبی موارد آلودگی بر حسب ایستگاه‌های مورد مطالعه



نمودار شماره ۳: توزیع فراوانی نسبی وضعیت حساس و مقاومت سوبه‌های جدا شده بر حسب انواع آنتی‌بیوتیک‌ها

## بحث

جنس ویبرو شامل ۶۳ گونه است، که حداقل ۱۱ گونه آن برای انسان بیماری‌زا می‌باشد. گونه‌های بیماری‌زای این جنس بیشتر در کشورهایی مانند ایالات متحده و ژاپن که فرآورده‌های غذایی دریایی زیاد مصرف می‌کنند، گزارش شده است. در خصوص فراوانی گونه‌های جنس ویبرو و بیماری‌زایی آنها در ایران، مطالعه گسترده‌ای صورت نگرفته است. اما در مورد گونه ویبرو کلرا مطالعاتی انجام شده، که در آنها یکی از بیماری‌هایی تحت تأثیر فاکتورهای اقلیمی، بیماری کلرا ناشی از ویبرو کلرا معرفی شده است. این بیماری در گذشته شیوع داشته و در اغلب کشورهای توسعه یافته در نیمه دوم قرن بیستم ناپدید شده است، ولی در مناطق گرمسیری در سالهای اخیر مجدداً به صورت اپیدمی ظاهر شده است. این باکتری دارای گونه‌های متعددی است، که غالب گونه‌ها بخش بزرگی از فلور طبیعی محیط‌های آبی و خاکی را تشکیل می‌دهند (۱۵).

Sano و همکاران از آبهای دریایی ازاکا در ژاپن، ویبرو کلرا جدا کردند که همه آنها بایوتیپ التور و سروتایپ اگاوا بودند (۱۶). Dumontet و همکاران (سال ۲۰۰۰)، آبهای ساحلی و رسوبات را در جنوب ایتالیا از نظر وجود جنس ویبرو و آئروموناس ارزیابی نمودند (۱۷). همچنین Fukushima و همکاران (سال ۲۰۰۴)، اکولوژی ویبرو ولنیفیکوس و ویبرو پاراهمولیتیکوس را در محیط‌های شور رودخانه Sada در شیمان پرفکتور ژاپن مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد هر دو ارگانیسم به‌طور دائمی در دهانه رود Sada بدون توجه به درجه حرارت آب در سرتاسر سال پراکنش دارند (۱۸). در نتایج تحقیق هلاکو و همکاران (سال ۱۳۸۵) نیز آمده است که از مجموع ۵۴ نمونه برداشت شده، ۴۲ مورد ویبرو بوده‌اند، که ۳۵ مورد (۸۴/۲٪) ویبرو کلرا غیر O<sub>1</sub>، ۲ مورد (۲/۶۳٪) ویبرو میمیکوس و ۵ مورد (۱۳/۱٪) ویبرو کلرا O<sub>1</sub> شناسایی شدند (۱۹). همچنین در تحقیق دیگری (سال ۱۳۸۶) نشان دادند گونه ویبرو پاراهمولیتیکوس در سواحل دریای خزر به فراوانی یافت می‌شود (۱۹، ۲). امیرمظفری و همکاران (سال ۲۰۰۵)، ۷ گونه ویبرو مختلف را از سواحل دریای خزر جدا نمودند که بیشترین گونه جدا شده، ویبرو ولنیفیکوس بود و سپس به ترتیب ویبرو پاراهمولیتیکوس، ویبرو

آلترنولتیکوس، ویبرو فیشری، ویبرو ناتریژنز، ویبرو هاروئی و ویبرو دامسلا، بیشترین فراوانی را داشتند (۲۰). در این تحقیق از مجموع ۶۰۰ نمونه برداشت شده از آبهای ساحلی شهر بندرعباس، ۵۱ مورد ویبرو جدا شد که ویبرو هاروئی بیشترین فراوانی را داشت و به ترتیب ویبرو کلرا، ویبرو پاراهمولیتیکوس، ویبرو فورنسی، ویبرو متسچینوکووی، P شیگلویید، A هیدروفیلا، ویبرو ولنیفیکوس، ویبرو میمیکوس و ویبرو فلوویالیس، بالاترین فراوانی را داشتند. در این مطالعه، گونه ویبرو هاروئی جدا شده، جزء فلور میکروبی آبهای شور بوده و در مورد بیماری‌زا بودن آن برای انسان گزارشی ارائه نشده است و تنها بیماری‌زایی گونه ویبرو هاروئی در میگوها مشاهده شده است. با توجه به مطالعه محققین کشورهای هند و مالزی، جداسازی این گونه‌ها بعد از بارندگی، افزایش می‌یابد. در مطالعه حاضر نیز این دو پارامتر در جداسازی گونه‌های ویبرو تأثیر مثبت داشتند. همچنین، با توجه به سنتی بودن بافت شهری این مناطق و نبود سیستم فاضلاب پیشرفته در سرازیر شدن خروجی فاضلاب‌های خانگی به سمت سواحل این منطقه، میزان شیوع ویبرو چشمگیرتر بود، به‌طوری‌که مناطق دارای سیستم لوله‌کشی فاضلاب، میزان آلودگی کمتری داشتند.

همچنین، با توجه به دو فصلی بودن شهر بندرعباس و مناسب‌تر بودن هوا در فصل زمستان؛ تردد مسافر در قسمت‌های ساحلی بیشتر است و از طرفی نیز با توجه به اینکه ورزش‌های آبی مانند موج سواری و قایق سواری جزء مشاغل مردم این منطقه است، لذا به‌واسطه این مشاغل، میزان آلودگی بیشتر می‌باشد. در فصل بهار با توجه به شواهد موجود، مبنی بر بازسازی سواحل و کنترل فاضلاب‌های خانگی، میزان آلودگی روند نزولی دارد. از لحاظ تأثیر پارامترهای مختلف بر رشد گونه‌های ویبرو می‌توان به درجه حرارت و بارندگی اشاره نمود. همچنین در این مناطق، آلودگی به فاضلاب خانگی تأثیر بیشتری داشته است و به‌نظر می‌رسد با پیشرفت ساحل‌سازی و کنترل فاضلاب این میزان کاهش یابد. شفیکور و همکاران (سال ۲۰۱۰) وسعت و درجه عفونت آلودگی به ویبرو را در میگوهای پناهیده در محل‌های تخم‌ریزی و آبهای ساحلی خلیج بنگال با کاربرد آنتی‌بیوتیک‌های مناسب، تحت کنترل قرار دادند، که ۴۰٪ ایزوله‌ها، مقاومت جزئی را به

در مطالعه حاضر نیز این پارامتر در جداسازی گونه‌های ویبریو تأثیر مثبت داشته است. همچنین به نظر می‌رسد آلودگی به فاضلاب خانگی نیز تأثیر مثبت داشته، که انتظار می‌رود با پیشرفت ساحل‌سازی و کنترل فاضلاب این میزان کاهش یابد.

تری‌متوپریم، نالیدیکسیک اسید و ریفامپین و ۱۵٪ به آمپی‌سیلین و اکسی‌تتراسایکلین نشان دادند، درحالی‌که هیچ مقاومتی برای سفتریاکسون، سیپروفلوکساسین و کلرامفنیکل مشاهده نشد (۱۱). در این مطالعه، بیشترین درصد حساسیت در انواع سویه‌های مختلف مربوط به سیپروفلوکساسین با ۷۹/۷٪ بوده است.

### تشکر و قدردانی

این مطالعه با همکاری اداره محیط زیست شهر بندرعباس و دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم انجام شد که از تمامی زحمات ایشان متشکریم.

### نتیجه‌گیری

با توجه به مطالعه محققین، جداسازی این گونه‌ها بعد از بارندگی افزایش می‌یابد.

### References:

1. Ebrahimi M, Nikouyan AR. Seasonal variation and vertical distribution of environmental parameters in the Iranian waters of the Persian Gulf (Hormozgan province). Iran Sci Fish J 2005;13(4):1-14. [Full Text in Persian]
2. Ameri Siahoei HR, Rostam Gourani I, Biranvandzadeh M. Informal habitations, security and urban sustainable development: Case study (Bandar Abbas). J Iran Social Stud 2011;(24):60-37. [Full Text in Persian]
3. Holaku A, Mozafari A, Fruhesh N, Tehrani H, Khormali M. The distribution of *Vibrio cholerae* from the surface waters of Golestan province. Gorgan Univ Med Sci J 2006;8(3):48-52. [Full Text in Persian]
4. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Medical microbiology. 6<sup>th</sup> ed. Canada: Elsevier Pub; 2009. p. 317-22.
5. Park JE, Park K. Textbook of preventive and social medicine. 14<sup>th</sup> ed. India, Jabalpur: Banarasidas Bharat Pub; 1995. p. 388-89.
6. Chakraborty S, Nair GB, Shinoda S. Pathogenic *Vibrios* in the natural aquatic environment. Rev Environ Health 1997;12(2):63-80.
7. Masini L, De Grandis G, Principi F, Mengarelli C, Ottaviani D. Research and characterization of pathogenic *Vibrios* from bathing water along the Conero riviera (Central Italy). Water Res 2007 Oct; 41(18):4031-40.
8. Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT. Bergey's manual of systematic bacteriology. New York: Williams & Wilkins; 2005. p. 1388.
9. Codeço CT. Endemic and epidemic dynamics of Cholera: The role of the aquatic reservoir. BMC Infect Dis 2001;1:1.
10. Smibert RM, Krieg NR. Phenotypic characterization. In: Gerhardt P. Methods for general and molecular bacteriology. 3<sup>rd</sup> ed. New York: American Society for Microbiology Press; 1994. p. 607-54.
11. Shafiqur R, Khan ShN, Niamul MN, Manjurul KM. Isolation of *Vibrio* spp. From penaeid shrimp hatcheries and coastal waters of Cox's bazar, Bangladesh. Asian J Exp Biol Sci 2010;1(2):288-93.
12. Kumar PA, Patterson J, Karpagam P. Multiple antibiotic resistance profiles of *Vibrio cholerae* non-O1 and non-O139. Jpn J Infect Dis 2009 May; 62(3):230-2.
13. Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Am J Clin Pathol 1966 Apr; 45(4):493-6.

14. Snow J. On the adulteration of bread as a cause of rickets. *Int J Epidemiol* 2003 Jun; 32(3):336-7.
15. Snow J. On the adulteration of bread as a cause of rickets 1857. *Int J Epidemiol* 2003 Jun; 32(3):336-7.
16. Yamasaki S, Shimizu T, Hoshino K, Ho ST, Shimada T, Nair GB, et al. The genes responsible for O-antigen synthesis of *Vibrio cholerae* O139 are closely related to those of *Vibrio cholerae* O22. *Gene* 1999;237(2):321-32.
17. Dumontet S, Krovacek K, Svenson SB, Pasquale V, Baloda SB, Figliuolo G. Prevalence and diversity of *Aeromonas* and *Vibrio* spp. In coastal waters of Southern Italy. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2000 Jan; 23(1):53-72.
18. Fukushima H, Seki R. Ecology of *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus* in brackish environments of the Sada River in Shimane Prefecture, Japan. *FEMS Microbiol Ecol* 2004;48(2):221-9.
19. Holaku A, Amirmozafari N, Fruhesh Tehrani H, khormali M. The Frequency of *Vibrio parahaemolyticus* in Southeastern Coast of Caspian Sea. *Med Laboratory J* 2007;1(1):38-42. [Full Text in Persian]
20. Amirmozafari N, Forohesh H, Halakoo A. Occurrence of pathogenic *Vibrios* in coastal areas of Golestan Province in Iran. *Razi J Med Sci* 2005;60(1):33-44. [Full Text in Persian]