دراسة امراضية لضمات الكوليرا النمط الحيوي الطور وبكتريا مشابهة للضمات المعزولة من مرضى الاسهال المائي المشخصة خلال وباء ٢٠٠٧-٢٠٠٨

سؤدد عواد كاظم ،ضحى سعد صالح[1]

قسم علوم الحياة ، كلية العلوم ، جامعة بغداد. بغداد- العراق

[1]sosomicro@yahoo.com

الخلاصة

تحرت الدراسة عن مسببات الإسهال الوبائي في محافظة بغداد وبعض المحافظات الشمالية إذ تم جمع 140 عينة براز مائي من مختلف الأعمار للفترة من بداية شهر تشرين الأول 2007 إلى نهاية شهر آب2008 ،وبعد إجراء الفحوصات الزرعية والمجهرية والكيموحيوية شخصت(113) عزلة بكتيرية كان من بينها(66) عزلة وبنسبة(47.14%) فقط عائدة لضمات الكوليرا*Vibrio cholerae* موزعه بواقع (58) عزلةوبنسبة(87.87%) عائدة للنمط تحت المصلي Inaba،و(5) عزلات وبنسبة (7.57%)عائدة للنمط تحت المصلي Ogawa جميعها تعود للنمط الحيوي El-Tor وثلاث عزلات بنسبة(4.54%) عائدة لضمات الكوليرا غير المتلازنة NAG

كما واظهرت الدراسة وجود 10 عزلات بكتيرية مشابهه في اغلب صفاتها البايو كيميائية والمصليه لبكتريا ضمات الكوليرا مع بعض الاختلافات التي ظهرت عند اجراء الفحوصات الكيمو حيوية حيث اعطت نتيجة سلبية لفحص احمر الكوليرا وفحص التخييط واختزال النترات

بينت نتائج تجربة الامراضية في الحيوانات المختبرية تشابها في التاثير النسيجي لبكتريا ضمات الكوليرا والبكتريا المشابهة لها حيث اظهرت المقاط النسجية احتقان الكبد والطحال وانسلاخ الزغابات في امعاء الحيوانات

الكلمات المفتاحية:- الاسهال الوبائي، ضمات الكوليرا.

DETECTION OF SOME BACTERIAL CAUSES OF WATERY DIARRHEA IN THE PROVINCE OF BAGHDAD AND SOME NORTHERN GOVERNORATES WITH ASTUDY OF PATHOLOGICAL EFFECTS

Suadad Awadd Kadhim, Dhuha Saad Saleh

Depatment of Biology, College of Science, University of Baghdad. Baghdad-Iraq

Abstract

The present study Investigate the study on the causes of diarrhea epidemic in the province of Baghdad and some northern governorates since been collected 140 stool samples of water of different ages for the period from the beginning of the month of October 2007 to the end of August 2008, after culture ,microscopic biochemical testing diagnosed (113) bacterial isolates was among them (66) isolation rate of (% 47.14) only belonging to Vibrios cholera, Vibrio cholerae are divided by (58) in a rate (% 87.87) and returned to the pattern under serum Inaba, and (5) isolates, a rate

(% 7.57) and returned to the pattern under serum Ogawa, all belonging to the pattern of bio-El-Tor and three isolates by (4.54%) belonging to non-cholera vibrios NAG The study showed the presence of 10 bacterial isolates were similar in most characteristics of the cholera bacteria, vibrios with some of the differences that emerged when Biochemical tests, which gave a negative result of the examination and testing of cholera red stitching and nitrate reduction
Histopathological study using experimental animals indicate similarity in pathogenesis of V. cholerae and vibrio like bacteria ,both cause congested spleen and liver and desquamation in the intestinal villi

Keywords:-Uibrio, Diarrhea.

*مستل من رسالة ماجستير الباحث الأول

المقدمة

يعد الإسهال والالتهابات المعوية من المشاكل الصحية الشائعة في مختلف بلدان العالم خصوصاً البلدان النامية حيث تحتل المرتبة الرابعة بين أسباب الوفيات لاسيما في الأطفال [1]، وتعد ضمات الكوليرا *Vibrio cholerae* احد مسببات الإسهال الخطيرة واسعة الانتشار في العالم لاسيما في المناطق التي تفتقد للرعاية الصحية وذات الكثافة السكانية العالية حيث سببت العديد من الأوبئة منذ عام(1817) مودية بحياة العديد من الأشخاص وخاصة في الحالات الشديدة وغير المعالجة[2] ، يعد تناول الماء والغذاء الملوثين المصدر الرئيس لنقل المرض إذ تظهر الأعراض على الشخص المصاب بعد مرور 12–48 ساعة اعتمادا على طبيعة الناقل وحجم جرعة الإصابة فضلا عن بعض العوامل المؤثرة في حموضة المعدة مثل تناول الأدوية المضادة للحموضة [3]. ومن أهم الأعراض الظاهرة على المصاب: إسهال شديد ذو لون ابيض شبيه بماء الرز Rice water ، ورائحة شبيهة برائحة السمك مصحوبا بقيء ومغص معوي ، مع ارتفاع بسيط في درجة الحرارة في بعض الأحيان [4].
ظهرت في العراق اوبئه عده اهمها عام (1991) و(1999) وفي عام (2007) انتشر المرض بصورة واسعه ليشمل العديد من المحافظات وفي هذا الوباء سجلت ملاحظات عن وجود بكتريا مشابهة لضمات الكوليرا ومسببة للاعراض نفسها لذا هدفت الدراسة الحالية الى التحري عن هذه البكتريا ومعرفة علاقتها بضمات الكوليرا على المستوى الذي يتعلق بالفحوصات البايوكيميائية التشخيصية وكذلك بإحداثها المرض في الحيوانات التجريبية.

المواد وطرائق العمل

جمع العينات

جمعت 140عينة براز من مختلف الأعمار والمصابين بالإسهال المائي من مستشفيات عدة في المحافظات(بغداد، و اربيل ،والسليمانية) للفترة من بداية شهر كانون الثاني 2007 إلى بداية شهر آب2008 ،وقد جمعت العينات في أنابيب معقمة حاوية على ماء الببتون القاعدي بوصفه منشطاً لنمو البكتريا ونقلت مباشرة إلى المختبر لحضنها

عزل البكتريا

نقل جزء من البراز الى وسط ماء الببتون القاعدي وبعد حضن الأنابيب الحاوية على العينات لمدة 24 ساعة وبدرجة 37 م° تم نقل ملئ عروة الزرع من هذا الوسط وزرع على الأطباق الحاوية على وسط Nutreint agar ،ووسط Thiosulfate Citrate Bile Salt Sucrose agar بوصفه وسطاً انتخابياً ،ووسط MacConk agar بوصفه وسطاً تفريقياً وحضنت الأطباق المزروعة لمدة 24 ساعة وبدرجة 37م° وذلك لمعرفة المسببات البكتيرية الأخرى فضلا عن ضمات الكوليرا

تشخيص البكتريا

شخصت البكتريا اعتمادا على ما ورد في كتاب Bergye's [5] بعد تنميتها وعزلها وكما يلي

الفحص الزرعي

اعتمد هذا الفحص على اختلاف لون وشكل وحجم وصفات مستعمرات الأنواع البكتيرية المختلفة وقدرتها على النمو على الأوساط التفريقية المذكورة سابقا .

الفحص ألمجهري

اجري الفحص المجهري للعزلات البكتيرية النقية وذلك بتصبيغها بصبغة غرام وفحصها تحت العدسة الزيتية للتحري عن شكل البكتريا وطبيعة تفاعلها مع الصبغة .

الفحوصات الكيموحيوية

وتضمنت : (اختبار استهلاك السترات ، اختبار التخمر السكري، اختبار إنتاج الاندول، اختبار احمر المثيل وفوكس بروسكاور، اختبار الحركة، اختبار تحلل الدم، اختبار إنزيم الكتاليز، اختبار الاوكسديز، اختبار أنزيم اليوريز، اختبار أحمر الكوليرا ، اختبار التخيط أو اللزوجة،وفحص حساسيتها للقرص o/129 اختبار الحساسية لمضادات الحياة)

التشخيص التأكيدي للبكتريا باستخدام API 20E Kit

تم هذا التشخيص باستخدام عدة API 20E التي تحوي على 20 اختباراً كيموحيوياً والمعتمدة من منظمة الصحة العالمية ،وقد تم فيها تحضير العالق البكتيري بحيث يكون مطابقاً لعكورة أنبوبة (0.5) MacFarland Tube No وأضيف من هذا العالق إلى كل حقل من الحقول الموجودة على الشريط ،وقد ملئت الحقول التي تشمل (CIT, VP, GEL) بالكامل كما تم إضافة الزيت إلى الحقول LDC, ADH (ODC, H_2S,) لغرض توفير ظروف لا هوائية كما تم إضافة كمية قليلة من الماء المقطر المعقم إلى قاعدة العلبة لتوفير الرطوبة، حُضنت الأشرطة عند درجة حرارة 37م لمدة 24 ساعة وبعدها أضيفت الكواشف الخاصة بكل اختبار ،وتم تسجيل النتائج على ورقة خاصة ومطابقته مع دليل API 20E.

التنميط المصلي Serotyping

أخذت شريحة زجاجية ووضعت قطرة من المصل المضاد متعدد التكافؤ (Polyvalent) الخاص بضمات الكوليرا للنمط المصلي O1 ، ثم أخذ جزء من مستعمرة على وسط الاغار المغذي ومزجت مع المصل المضاد لعمل مستحلب تم التحري عن التلازن الحاصل خلال دقيقتين كدليل على إيجابية الاختبار وكون العزلة البكتيرية تعود إلى النمط المصلي O1، وتم تحديد النمط تحت المصلي (Subserotype) باستعمال مصل أحادي التكافؤ (Monovalent) التي تتضمن المصل المضاد Ogawa والمصل المضاد Inaba وبالطريقة نفسها

الدراسة التجريبية

مجاميع التجربة

استخدم 30 فأراً مختبرياً ابيض نوع Mus musculus و بعمر (10) أيام لجنس واحد (ذكور) بأوزان تراوحت من (11-13)غم للفأر الواحد ، وضعت الفئران في أقفاص بلاستيكية خاصة وبظروف تربية معينة مسيطر عليها تتضمن درجات حرارة (22-25 م°) وإضاءة كافية كما زودت بصورة مستمرة بالماء والعلف الكافيين .

تحضير الجرعات

أخذت مستعمرات بكتيرية من ضمات الكوليرا تم تنشيطها مسبقا على وسط الاغار المغذي بوساطة ناقل Loop بعد التاكد من نقاوتها باستخدام صبغة غرام علقت في أنبوب اختبار حاوٍ على 5 مل من محلول الملح الفسلجي بعد ذلك رجت الأنبوبة ، وقورنت عكورتها مع أنبوب ماكفرلاند القياسي (0.5) الذي يعادل ال 10^8وحدة مكونة للمستعمرة ل سم3

دراسة امراضية (Inaba) V.cholerae باستخدام الفئران المختبرية

استخدم في هذه التجربة 15 فأراً مختبرياً جرعت (1) مل من العالق البكتيري بتركيز (1×10^8) وحدة مكونة للمستعمرة من بكتريا V. Cholerae المعزولة والمشخصة على أنها عائدة للنمط الحيوي (El-Tor) والنمط المصلي Inaba كما حضر سابقا بينما جرعت مجموعة السيطرة بمحلول الملح الفسلجي

تركت الفئران لحين ظهور العلامات السريرية بعد ثلاثة ايام المتمثلة بالإسهال وأخذت مسحات من البراز وزرعت على الأوساط التشخيصية للتأكد من وجود البكتريا

دراسة امراضية البكتريا الشبيهة ببكتريا *V.cholerae* باستخدام الفئران المختبرية

في هذه التجربة استخدمنا 15 فأراً مختبرياً أبيض قسمت كما في المجموعة الأولى جرعت الفئران (1) مل من العالق البكتيري لكل فأر بتركيز (1×10^8) وحدة مكونة للمستعمرة من البكتريا الشبيهة ببكتريا *V.cholerae* بينما جرعت مجموعة السيطرة بمحلول الملح الفسلجي ، تركت الفئران لحين ظهور العلامات السريرية بعد ثلاثة ايام المتمثلة بالإسهال ثم نقلت الفئران إلى أقفاص بلاستيكية نظيفة ومعقمة مسبقا وخالية من الفرشة لغرض ملاحظة نوع البراز من الحيوانات التجريبية المصابه وأخذت مسحات من البراز وزرعت على الأوساط التشخيصية للتأكد من وجود البكتريا ، بعدها قتلت الفئران ونقلت الأجزاء (الأمعاء،والكبد،و الطحال) إلى المختبرات التعليمية في مستشفى مدينة الطب لعمل المقاطع النسيجية

النتائج

الدراسة التشخيصية

الفحص المجهري

بعد تصبيغ البكتريا حديثة النمو ظهرت الخلايا البكتيرية ولكلا النوعين البكتري ذات أشكال منحنية تشبه الضمة وذات لون احمر دليل على سلبيتها لملون غرام وظهرت الخلايا بشكل عصيات عند فحص مستعمرات قديمة النمو.

الفحوصات الكيموحيوية

اظهرت هذه الفحوصات وجود 10 عزلات مشابهة للصفات في جميع الفحوصات المصلية والكيماحيوية منها ماعدا اختزال النترات واحمر الكوليرا والتخيط كما في (الجدول 10)

جدول 10 : يظهر الفحوصات البايو كيميائية لضمات الكوليرا والبكتريا الشبيهة بالضمات

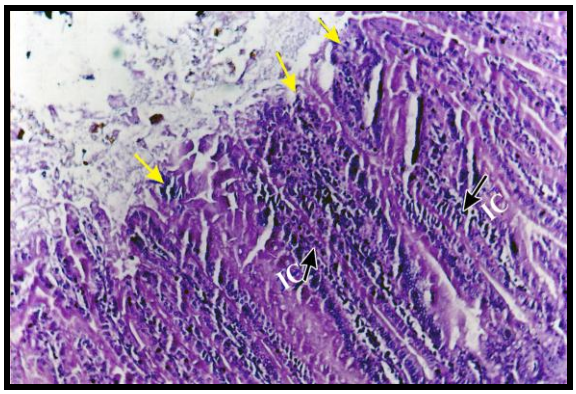
الفحص	V.cholerae	V.cholerae like organism
Oxidase	+	+
Catalase	+	+
Cholera red	+	−
Indol production	+	+
Methyl red	+	+
Urease production	−	−
Gelatinase production	+	+
String test	+	−
H2S productinn	−	−
Nitrate reduction	+	−
Citrate reduction	+	+
VP Test	+	+
تحمل الملوحة	+تركيز (0%،3% NaCl)	+تركيز (0%،3%،6%، 7% NaCl)
تخمير السكريات	استطاعت تخمير جميع السكريات ما عدا اللاكتوز والارابينوز	استطاعت تخمير جميع السكريات ما عدا اللاكتوز والارابينوز
تحلل الدم	تحلل من نوع β	تحلل من نوع β
حساسيتها للقرص O/129	+	+
حساسيتها للقرص Polymyxin	+	+

الدراسة التجريبية

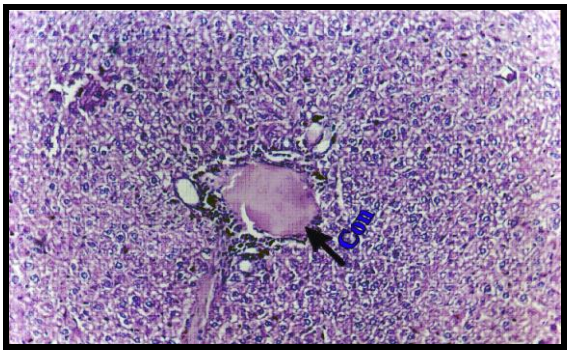
التأثيرات الامراضية لبكتريا (Inaba) *V.cholerae* في الفئران المختبرية

لوحظت العلامات السريرية في اليوم الثالث من الإصابة والمتمثلة بظهور إسهال مع خمول بسيط وعند إجراء الفحص العياني بعد عملية التشريح لم نلاحظ تغيرات على أعضاء الفئران المصابة قياسا بفئران السيطرة ، فيما بين الفحص النسجي وجود تنخر في الزغابات المعوية مع تمزق الطبقة المخاطية فضلا عن ارتشاح الخلايا الالتهابية بين طيات الزغابات ، اظهر فحص الكبد وجود احتقان دموي مع تنخر الخلايا الكبدية وارتشاح الخلايا الالتهابية أحادية النواة قليلة

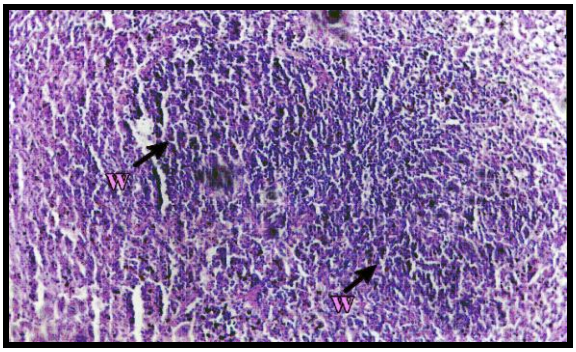
العدد خصوصا في المنطقة البوابية، فيما بين فحص الطحال توسع اللب الأبيض على حساب اللب الأحمر ما يدل على حدوث التحفيز المناعي نتيجة الإصابة بالبكتريا (الاشكال 1، 2، 3).



شكل1: التغيرات النسجية في امعاء فئران مصابة ببكتريا V.cholerae ويلاحظ فيها ارتشاح خلايا التهابية (IC) وانسلاخ الزغابات



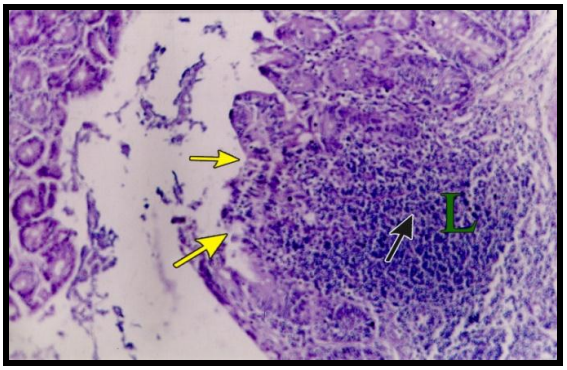
شكل2: التغيرات النسجية في كبد فئران مصابة ببكتريا V.cholerae ويلاحظ فيها الاحتقان



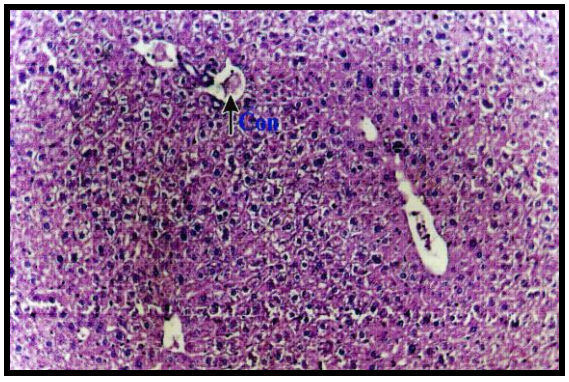
شكل 3: التغيرات النسجية في طحال فئران مصابة ببكتريا V.cholerae ويلاحظ فيها توسع اللب الابيض (W) على حساب اللب الاحمر

التأثيرات الامراضية للبكتريا المشابهة لبكتريا ضمات الكوليرا في الفئران المختبرية

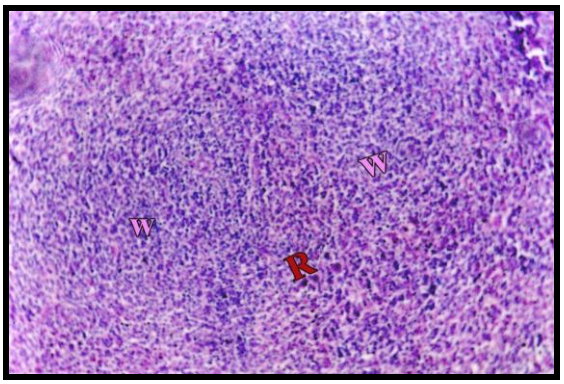
كانت العلامات السريرية في الحيوانات المختبرية المجرعة بالبكتريا الشبيهة بضمات الكوليرا مطابقة للعلامات السريرية التي ظهرت على الحيوانات المجرعة ببكتريا V.cholerae، وقد استغرق ظهورها المدة نفسها ، وعند إجراء الفحص النسجي للأمعاء ثبت إصابتها بتنخر وتلف في الطبقة المخاطية مع توسع الزغابات المعوية فضلا عن ارتشاح الخلايا الالتهابية في داخل الزغابات مع تنسج في العقد اللمفاوية و اظهر فحص الكبد وجود احتقان دموي مع ارتشاح الخلايا الأحادية النواة وتنسج خلايا كفر فضلا عن توسع اللب الأبيض على حساب اللب الأحمر في الطحال(شكل 4،5،6).



شكل4: التغيرات النسجية في امعاء فئران مصابة ببكتريا V.cholerae like organism ويلاحظ فيها تلف الزغابات وتجمع الخلايا اللمفية(L)



شكل5: التغيرات النسجية في كبد فئران مصابة ببكتريا V.cholerae like organism ويلاحظ فيها الاحتقان (Con)



شكل 6: التغيرات النسجية في طحال فئران مصابة ببكتريا V.cholerae like organism ويلاحظ فيها توسع اللب الابيض(W) على حساب اللب الاحمر(R)

المناقشة

جاءت المواصفات المجهرية ونتائج الفحوصات البايوكيميائية متطابقة مع ما هو موجود في المصادر التشخيصية ذات العلاقة [6،7،8،9،10،11،12،13،14،15،16،17،18،19] اظهرت النتائج وجود ضمات الكوليرا الطور بواقع (87.87%) Inaba و (7.57%) Ogawa و(4.54%) من الضمات غير المتلازنة وجاءت النتائج متطابقة مع الدراسات المحلية وكذلك ظهر وجود عشر عزلات البكتيرية الشبيهة لضمات الكوليرا و قد تكون هذه البكتريا هي بكتريا *V.cholerae* وحدثت لها بعض التغيرات الوراثية نتيجة تغير الظروف البيئية المحيطة بها أو قد تكون نوعاً جديداً من البكتريا. اظهرت بعض من الدراسات نتائجاً مشابهة لنتائج الدراسة الحالية ومنها دراسة أجريت في الهند (1996) حيث سجلت (18) حالة إصابة ببكتريا *V.cholerae* من أصل (232) عينة ،وعند إجراء الفحوص المصلية وجد إن(15)عزلة منها عائدة لضمات الكوليرا غير المتلازنة وضمن هذا العدد حدد النمط المصلي ل (13)عزلة بكتيرية غير متلازنة فيما لم يحدد نوع اثنين من العزلات (20) ، وفي أفغانستان سجلت (44) حالة إصابة بالكوليرا من أصل (3245) حالة ظهرت عليها علامات سريريه مشابهة لمرض الكوليرا ،وعند إجراء الفحوصات المختبرية تبين أن (30) حالة فقط كان المسبب لها بكتريا *V.cholerae* ، فيما لم يعرف المسبب الرئيس ل(14) حالة المتبقية [21].

اتفقت نتائج تجربة امراضية بكتريا ضمات الكوليرا في الحيوانات المختبرية مع نتائج البحوث العالمية المماثلة[27,26,25,24,23,22]كما واظهرت نتائج تجربة البكتريا المشابهة لضمات تشابها مع النتائج العائدة لبكتريا الضمات الأمر الذي بين أن البكتريا المشابهة لضمات الكوليرا تمتلك عوامل الفوعة نفسها على الرغم من اختلاف بعض الصفات الكيموحيوية وهو ما يستوجب مزيدا من البحث للتحري عن طبيعة وتشخيص هذه البكتريا المشابهة للضمات .

لقد اختلفت أنماط ضمات الكوليرا المسببة للأوبئة العالمية على مر السنين إذ كانت الضمات التقليدية Classical المسبب الرئيس في الأوبئة الست الأولى التي اجتاحت العالم [29,28]ثم ظهرت ضمات الطور El–Tor بوصفها مسبباً أساسي للوباء الذي اجتاح العالم عام (1961) والذي استمر بعدها بالانتشار على حساب الضمات التقليدية حيث انتشر هذا النمط في مختلف أنحاء العالم [30] . أما ضمات الكوليرا غير المتلازنة NAG فقد تسببت هذه الضمات بثلاث موجات وبائية الأولى في جكسلوفاكيا عام (1965)،والثاني في السودان عام (1968)،والثالث في البحرين عام (1973) [31].

وفي عام (1992) ظهر نمط جديد من ضمات الكوليرا غير المتلازنة الذي سمي O139 (Bengal) إذ كان سبب الوباء الذي حدث في بنغلادش ومنها انتشر إلى 11 دولة في جنوب شرق آسيا راح ضحيته عدد كبير من الناس والذي اكتشف انه مشتق من النمط الطور ولكن حدثت عليه تغيرات في التركيب الجيني،وبهذا فقد تكون البكتريا المشابهة للضمات مسبباً لوباء عالمي في المستقبل[32] .

References

1. World Health Organization .(**2008a**) The top 10 causese of death. W.H.O. media center .fact sheet N. 310.
2. Wiewel,E.(**2001**).Cholera epide mio logy and molecular pathogenesis of *Vibrio cholera* Bio 444.Emergin Infectious Dis.
3. Brooks,G.F.;Bulel,J.S.;and Morse, S.A.(**2007**) Medical microbiology (24th edition). Lange Medical Books / MC Graw-Hill.
4. Keusch, G.T.; Deresiewicz, R.L. and Waldor, M.K. (**2001**) Cholera and other vibriosis.In: Harrison's prin ciples of internal medicine (15th ed.)McGraw-Hill companies,Inc.
5. Holt, J.G.; Krieg, N.R.; Sneath, P.H. and Bergy. (**1994**) Bergey's manual of determinative bacteriology ,(9thed.) Lippincott, Williams and Wilkins East Lansing mich.
6. Cooper ,S. (**2001**) Helical growth and the curved shape of *Vibrio cholerae* . FEMS. Microbiol. Lett. **198**(2):123-124.
7. National Institute of Communicable Diseases (NICD) (**2001**) Laborotary Manual chapter 7 ,laboratory diagnosis of cholera .
8. Al-Amili,W.A. (**2001**) Genetic exchange between *Vibrio cholerae* and *Pseudomonas aeruginoas* . Athesis

El-Tor –like hemolysin of non-O1 *Vibrio cholerae*. J.Infect. Immun. (5):1090-1093.

19. Sharma,C.;Thungapathram,M.;Ghosh,A. ;Mukhopadhyay,A.K.;Basu,A.;Mitra,R.; Basu,I.;Bhattachary,S.K.;Shimada,T.;Ra mamurthy,T.; Takeda,T.; Yamasaki, S.Takeda,Y. and Nair,G.B. (**1998**) Molcular analysis of non-O1,non-O139 *Vibrio cholerae* associated with an unusual upsurge in the incidence of cholera-like diseases in Calcuta,India.J.Clinic.Microbiol.**36**(3):7 56-763.
20. World Health Organization (**2005**) Cholera in Afghanistan. W.H.O. Epidemic and Pandemic Alert and Response (EPR).
21. Stanier ,R.Y.; Ingraham ,J.L.; Wheelis ,M.L. and Painter,P.R. (**1989**) The Microbial World (5th ed.) .Prentice .Hall, Englewood, Cliff, New York .
22. Gill ,D.;Kokko,G.,Mandell,P. (**2000**) Text book of medicine. (12th ed.) W.B. Saunders Company Philadelphia .:1690-1693.
23. Chin ,J. (**2000**) Control of communicable disease manual. (17th ed.) American Public Health Association-Washington .
24. Qadri ,F.; Raqib,R.; Ahmed,F.; Rahman,T.; Wenneras, Ch.;Das,S .K.; Alam, N.H.; Mathan, M.M. and Svennerholm ,A. (**2002**) Increased levels of inflammatory mediators in children and adults infected with *Vibrio cholerae* O1 and O139 . Clinic.Diagnos. Lab. Immun. **9**(2):221-229.
25. Macsween, R.N.M. and Whaley, K.(**1992**) Muris textbook of pathology 13th edition Oxford University press New York, USA ,pp 1245.
26. Leeson, C.R; Leeson, T.S. and Paparo, A.A.(**1985**) Textbook of histology, 5th edition. W.B. Saunders Company, Philadelphia, Landon p277-281.
27. Faruque,S.M.;Albert,M.J. and Mekalanos,J.J. (1998) Epidemiology , genetics and ecology of toxigenic Vibrio cholerae . Microbiol .Mol . Revi. **62**(4):1301-1314.
28. Alam,M.; Hasan,N.A.; Sadique,A.; Bhuiyan,N.A.; Ahmed,K.U.; Nusrin, S.; Nair, G.B.; Siddique, A.K.; Sack,R. ;Sack,D.A.; Huq,A. and Colwell,R.R. (2006) Sesonal cholera caused by Vibrio submitted to the College of Science .Baghdad University.
9. Choopun,N.; Louis,V.; Huq,A. and Colwell,R.R. (**2002**) Simple procedure for rapid identification of *Vibrio cholerae* from aquatic environment .Appl. Enviro. Microbiol . **68**(2):995-998.
10. Collee.J.G.; Fraser,A.G.; Mermion ,B.P. and Simmons,A. (**1996**) Mackie and Maccatney Practical Medical Microbiology (14th ed.) .Churchill Livingstone Philadelphia . :425.
11. Hofer ,E.; Reis,E.M.F.; Quintaes, B.R.; Rodrigues,D.P.; Feitosa ,T. S.; Angelo, M . R.F. and Ribeiro, L.H.F.F. (**2001**) *Vibrio cholerae* resistant to 2,4-diamino-6,7-diisopropylpteridine (O/129) isola ted from patient with enteritis in Ceara', Brazil .J. Health. Popul .Nutr . **19**(1):39-42.
12. Holt,J.G.; Krieg,N.R.; Sneath, P.H .A.; Stalyt,J.T. and Williams,S.T. (**1994**) Bergey's manual of determin ative bacteriology, (9th ed.) Williams and Wilkins Publicat ion.London,New York .
13. Hood,M.A.; Ness,G.E. and Rodrick ,G.E. (**1981**) Isolation of *Vibrio cholerae* serotype O1 from the eastern oyster ,Crassostrea virginica . Appl.Environ. Microbiol. **41**(2):5 59-560.
14. Keast,A. and Riley,T.V. (**1997**) Identification of *vibrio* spp. with the string test . Appl.Microbiol.**25**:106-108.
15. Musa ,N.;Wei,L.S.; Wee,W.;Leon g,L.K.;Shah,Sh.M. and Ying,T.H. (**2008**) Studies pf phenotypic and numerical taxonomy pf *Vibrio* spp. isolated from oyster,Crassostrea iredalei .World.J.Agric.sci. **4**(2): 189-197.
16. Old,D.C.(**1996**) Practical medical microbiology ,*Vibrio, Aeromonas, Plesiomonas, Campylobacter, Aerob acter,Helicobacter* and *Wolinella* (14th ed.).Churchill Livingstone.
17. Twedt,R.M.; Madden,J.M.; Hunt, J.M.; Francis,D.W.; Peeler,J.T.; Duran,A .P.; Herbert,W.O.; Mccay ,S.G.; Roderick,C.N.; Spite,G.T. and Wazenski, T.J. (**1981**) Charact erization of *Vibrio cholerae* isolated from oyster .J.Appl.Environ. Microb iol. **41**(6):1475-1478.
18. Yoshio ,I.; Yamamoto, K.; Nakasone, M. and Masaaki, I. (**1987**) Enterotoxicity of

cholerae serogroup O1 and O139 in the coastac a quatic environment of Bangladesh. Appl. Environ. Microbiol. **72(**6):4097- 4104.

29. Todar,K. (2005) Vibrio cholerae and Asiatic cholera. Todar's online textbook of bacteriology. University of Wisconsin-Madison Department of Bacteriology
30. Cheasty,T.;Said,B. andThrelfall,E.T. (**1999)** Vibrio cholerae non-O: implications for man.Lancet. : 354-89.
31. World Health Organization (**1998)** Cholera in Peru. Diseases outbreaks reported. Communicable Diseases Surveillance and Response (CSR)