مقاله پژوهشی

مجله میکروب شناسی پزشکی ایران

سال ۷ – شماره ۱ – بهار ۱۳۹۲

Journal homepage: www.ijmm.ir

به‌کارگیری روش Multiplex PCR برای جداسازی همزمان ژن‌های ctxA، ctxB و zot در *ویبریو کلرا* ایزوله‌شده از بیماران

دکتر رضا میرنژاد[۱]، شهرام شجاع[۲]، دکتر عباسعلی ایمانی فولادی*[۲]

۱. مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا...(عج)- تهران- ایران

۲. مرکز تحقیقات میکروبیولوژی کاربردی دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا...(عج)- تهران- ایران

اطلاعات مقاله

تاریخچه مقاله

دریافت: ۱۳۹۲/۰۱/۲۰

پذیرش: ۱۳۹۲/۰۳/۲۰

انتشار آنلاین: ۱۳۹۲/۰۸/۱۵

IJMM 1392; 7(1): P 22-27

نویسنده مسئول:

دکتر عباسعلی ایمانی فولادی

تهران، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، مرکز تحقیقات میکروبیولوژی کاربردی

تلفاکس : ۰۲۱-۸۲۴۸۲۵۶۶

پست الکترونیک:

imanifouladi.a@gmail.com

چکیده

زمینه و اهداف: سویه‌های سمزای (Toxogenic) *ویبریوکلرا* که واجد ژن‌های ctxA،ctxB و zot هستند، نسبت به سویه‌های غیرسمزابیماری شدیدتری ایجاد می‌کنند، بنابراین شناسائی دقیق و سریع سویه‌های سمزا بسیار حائز اهمیت است. این مطالعه با هدف به‌کارگیری روش Multiplex PCR برای جداسازی همزمان ژن‌های ctxA، ctxB و zot در *ویبریو کلرا* ایزوله‌شده از بیماران طراحی گردید.

مواد و روش کار: در این مطالعه ۷۳ سویه بالینی جمع‌آوری و با آزمایش‌های سرم‌شناختی و زیست‌شیمیایی به‌عنوان *ویبریوکلرای* O1 تشخیص داده شدند. در نهایت به‌منظور شناسایی ژن های ctxA، ctxB وzot از روش Multiplex PCR استفاده شد و سپس نتایج حاصل با نرم‌افزار آماری SPSS16 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

یافته‌ها: برطبق نتایج حاصل از Multiplex PCR، فراوانی ctxA، ctxB و zot به ترتیب (٦٦ نمونه) ٩٠/٤ ٪، (٦٦ نمونه) ٩٠/٤ ٪ و(٦٧ نمونه) ٩١/٧ ٪ بود. نتایج ما نشان داد که Multiplex PCR روشی سریع و دقیق برای جداسازی *ویبریوکلرا* سمزا در نمونه‌های بالینی است. همچنین حساسیت این روش برای جداسازی سویه‌های *ویبریوکلرا* که واجد ژن‌های ctxA، ctxB وzot هستند، کمتر از ۱۰ کپی ژن مورد نظر در نمونه است.

نتیجه‌گیری: در صورتی‌که پرایمرهای اختصاصی (ژن‌های هدف ctxA، ctxB وzot) برای تشخیص *ویبریوکلرا* سمزا به‌کار برده شود، روش Multiplex PCR یک روش ساده، راحت و نسبتاً ارزان برای جداسازی سریع و دقیق *ویبریوکلرا* سمزا در نمونه‌های کلینیکی است.

کلمات کلیدی: *ویبریو کلرا* ، Multiplex PCR ، ژنهای ctxA، ctxB وzot

کپی رایت © : حق چاپ، نشر و استفاده علمی از این مقاله برای مجله میکروب شناسی پزشکی ایران محفوظ است.

مقدمه

ویبریو کلرا عامل وبا، یکی از بیماری‌های نام آشنای انسانی است. وبا عمدتاً در ماه‌های گرم، وقتی که باکتری بتواند در آب آلوده به مدفوع تکثیر کند، مشاهده می‌گردد. این بیماری یک نوع اسهال شدید است که در طی قرن‌ها به‌شدت وضعیت بهداشت، سلامت و اقتصاد جوامع مبتلا را تحت تاثیر قرار می‌دهد (۴-۱). به‌طوری‌که بعضی مواقع همه‌گیری‌های ایجادشده ناشی از آن، بر پیامد جنگ‌ها و سرنوشت کشورها تأثیرگذار بوده است. مطالعات نشان می‌دهد که در طی دو قرن گذشته این بیماری به‌عنوان عامل اصلی مرگ و ایجاد عوارض چشمگیر در بسیاری از کشورهای در حال توسعه نقش داشته است. این باکتری که دارای بیوتیپ یا سروتیپ‌های مختلفی است، در اصل ساکن محیط‌های آبی دهانه خلیج‌ها و رودخانه‌ها است (۲،۴) و به‌عنوان یک

بیماری‌زای اختیاری در انسان عمل می‌کند. *ویبریو کلرا* دارای۴ بیوتیپ کلرا، التور، آلبنسیس و پروتئوس است. هم بیوتیپ کلرا، هم التور سبب وبای کلاسیک می‌شود و سروگروپO1 هستند. البته بعضی ویبریوهای سروگروپ O1 هم وجود دارند که توکسین کلرا را تولید نمی‌کنند و نمی‌توانند بیماری ایجاد کنند. بیوتیپ های آلبنسیس و پروتئوس با پادتن ضدآنتی‌ژن O1 آگلوتینه نمی‌شوند و معمولاً سویه‌های غیرآگلوتینه یا ویبریوی غیرکلرا نامیده می‌شوند. بنابراین سه گروه از سویه‌های *ویبریوکلرا* وجود دارد(۱). VCO1/O139 عامل وبا کلاسیک (۲). non-O1/non-O139 عامل شبه‌وبا (۳) NAG یا NCV که فقط گاهی سبب بیماری می‌شود ولی اغلب اسهال خونی ایجاد می‌کند. بیشتر موارد همه‌گیری‌های وبا در کشورهای در حال توسعه، توسط ویبریوکلرای سم‌زا گروه سرمی O1 و ویبریوکلرای گروه سرمی O139 ایجاد می‌شوند(۷-۵).

با توجه به اینکه علائم بالینی و شدت بیماری ایجادشده توسط *ویبریوکلرا*های سم‌زا با سویه‌های بدون سم فرق می‌کند، بنابراین تشخیص سویه‌های سم‌زا بسیار مهم است. همچنین تشخیص بیماری در مراحل اولیه و شناسایی عامل آن در نمونه‌های آب و غذا، در جلوگیری از بروز همه‌گیری‌ها حائز اهمیت است (۸). به‌همین دلیل امروزه تعداد زیادی از روش‌های میکرب‌شناسی از قبیل کشت، سروتایپینگ ریزاندامگان‌ها (microorganism) از طریق آگلوتیناسیون، روش‌های زیست‌شیمیایی و زیست‌شناختی، سنجش سم، الیزا و ایمونوفلورسانس توسعه یافته است که برای تشخیص *ویبریو کلرا* سم‌زا به‌کار می‌روند (۹-۱۱)، ولی غالباً این روش‌ها وقت‌گیر و پرهزینه هستند (۱۲). همچنین این روش‌های تشخیصی که در حال حاضر نیز مورد استفاده قرار می‌گیرند، به دلایل محدودیت‌های مختلف، چه از نظر زمانی و چه به دلیل نتایج کاذب و همچنین عدم حساسیت نسبت به تشخیص مقادیر کم عامل بیماری، دارای محدودیت‌هایی هستند(۱۰،۱۲). در مقایسه با این روش‌ها، امروزه روش‌های منطبق بر اسیدنوکلئیک، از قبیل واکنش زنجیره‌ای پلیمراز،Multiplex PCR، PCR-ELISA، Real-Time PCR، دورگه‌سازی و غیره با تشخیص سریع و قابل اطمینان به‌عنوان یک جایگزین قدرتمند به جای این روش‌ها به‌کار گرفته می شوند(۱۲،۱۳،۱۴).

روش Multiplex PCR یک روش اختصاصی جهت تکثیر اسیدنوکلئیک و نوع تغییریافته‌ای از PCR است که در آن دو یا بیش از دو لوکوس از ژن به‌طور هم‌زمان در یک واکنش تکثیر می‌شود. امروزه از این روش در شناسایی سریع و هم‌زمان بیماری‌زاها، بررسی کیفیت و کمیت نمونه‌ها و تشخیص بیماری‌های ژن‌شناختی استفاده می‌شود.Multiplex PCR نشان‌دهنده وجود یک بیماری‌زای خاص در میان دیگر باکتری‌ها یا تمایز گونه‌ها یا سویه‌ها در یک جنس یا وجود ژن‌های مختلف در یک اندامگان (Organism) است (۱۲،۱۵).

با توجه به اینکه مطالعات مختلف نشان داده که سویه‌های حاوی عوامل ویرولانسی کلراتوکسین (توسط ژن‌های ctxA و ctxB کد می‌شود) ، سم Zonnula occludens (توسط ژن zot کد می‌شود) بیماری بسیار شدیدتری ایجاد می‌کنند و شناسایی سویه‌هایی که دارای این ژن‌ها هستند از نظر کلینیکی دارای اهمیت **می باشند** (۱۶،۱۷). بنابراین این مطالعه با هدف به‌کارگیری روش Multiplex PCR در جداسازی هم‌زمان ژن‌های ctxA ، ctxB و zot در *ویبریو کلرا* ایزوله‌شده از بیماران استفاده گردید.

مواد و روش ها:

جمع آوری نمونه‌های بالینی

در این مطالعه توصیفی- مقطعی ۷۳ نمونه بالینی از بیمارانی که در استان‌های سیستان و بلوچستان، کردستان، گلستان و بیمارستان بقیه‌ا...(عج) تهران بین سال‌های ۱۳۸۵ تا۱۳۹۰، به وبا مبتلا شده بودند، جمع‌آوری و مورد بررسی و مطالعه قرار گرفتند. همچنین سویه استاندارد *ویبریوکلرا* PTCC۶۲۰۱۳ تهیه‌شده از آزمایشگاه رفرانس انستیتو پاستور ایران به‌عنوان کنترل مثبت مورد استفاده قرار گرفت.

جداسازی اولیه و شناسایی فنوتیپی (زیست‌شیمیایی-سرم‌شناختی) نمونه‌ها ی بالینی

در آزمایشگاه ابتدا نمونه *ویبریوکلرای* بالینی و استاندارد جمع‌آوری‌شده در محیط (LB) Luria Bertani (مرک آلمان) مایع گلیسرول‌دار حاوی پرل شیشه‌ای کشت داده شدند. در مرحله بعد عمل غنی‌سازی در محیط آب پپتونه قلیایی صورت گرفته و سپس در محیط Thiosulfate Citrate Bile Sucrose Agar(TCBS) (شرکت مرک آلمان) در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به‌مدت ۲۴ ساعت کشت و گرمخانه‌گذاری شدند. بعد از گرمخانه‌گذاری ، در صورت مشاهده کلنی های زرد رنگ، جهت

تائید گونه *ویبریوکلرا* رنگ‌آمیزی گرم و تست‌های بیوشیمیایی انجام گردید. همچنین جهت تعیین سروتیپ‌های مهم *ویبریوکلرا*، آزمایش آگلوتیناسیون روی اسلاید با آنتی‌سرم‌های پلی‌والان O1 و O139 اینابا و اگاوا تهیه‌شده از شرکت Mast Diagnostics کشور انگلستان، آزمایش سرم‌شناختی انجام شد.

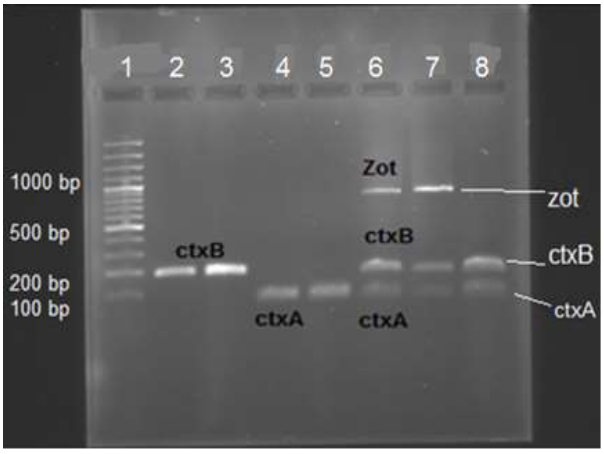
آماده سازی واکنشMultiplex PCR و انجام آن:

در آزمایشگاه، استخراج دنا (DNA) از نمونه ها با استفاده از کیت AccuPrep (ساخت شرکت Bioneer کشور دانمارک) انجام شد. واکنش PCR در حجم نهائی ۳۰ µL در نظر گرفته شد. هر نمونه شامل 2X Master mix ۱۲ µL (ساخته کمپانی Ampliqon III کشور دانمارک) حاوی ۱/۵ mM $MgCl_2$، ۱µgr DNA الگو، l20 pmol از هر پرایمر R,F (جدول ۱) و آب مقطر دوبار تقطیر استریل تا حجم ۳۰ µL بود.

فرایند PCR در دستگاه ترموسایکلر شامل ۵ دقیقه ۹۵ درجه سلسیوس، بدنبال آن ۳۵ سیکل ۶۰ ثانیه در ۹۴ درجه سلسیوس ، ۶۰ ثانیه در ۵۳ درجه سلسیوس مرحله Annealing و ۶۰ ثانیه در ۷۲ درجه سلسیوس و در نهایت ۴ دقیقه در ۷۲ درجه سلسیوس انجام گرفت. برای بررسی محصولات PCR از الکتروفورز در ژل آگاروز ۱/۵٪ و رنگ آمیزی DNA با رنگ SYBR® Green از تولیدات شرکت QIAGeen استفاده شد. در نهایت ژل ها با استفاده از دستگاه Gel Documentation مورد بررسی قرار گرفتند (شکل ۱).

تحلیل آماری:

اطلاعات جمع‌آوری‌شده برای تعیین تعداد نمونه مثبت و منفی برای هر ژن به‌دست‌آمده ارزیابی شدند. تحلیل توصیفی



شکل ۱: ژل آگارز مربوط به Uniplex/Multiplex PCR ژن های ctxA, ctxB و zot چاهک شماره ۱مربوط به DNA ladder, SM#333 ۱۰۰ bp چاهک شماره ۳و۲ UniplexPCR ژن ctxB چاهک شماره ۵ و۴ UniplexPCR ژن ctxA چاهک شماره ۷و۶و ۸ Multiplex PCR ژن های ctxA, ctxB و zot

انجام شد و اطلاعات به‌صورت تعداد (درصد) بیان گردید.

جدول ۱: پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه

نام پرایمر	سکانس پرایمر	اندازه محصول(bp)
ctxA-F	5'- GGGAGCATTATATGGTAAAG-3'	**180**
ctxA-R	5'- GGTTGATATTCTTTGAGTAC-3'	**180**
ctxB-F	5′- GGTGCAACTTTTCAA GTA G-3′	**120**
ctxB-R	5′- GGGTATCCTTCATCCTTTC-3′	**120**
Zot-F	5′-TCGCTTAACGATGGCGCGTTT <T>-3′	**946**
Zot-R	5′-AACCCCGTTTCACTTCTACCC <A>-3′	**946**

یافته‌ها:

در طی این مطالعه تعداد ۷۳ ایزوله *ویبریوکلرا* از طریق کشت بر روی محیط TCBS و انجام آزمایش‌های بیوشیمیایی و سرم‌شناختی مورد شناسایی قرار گرفته و معلوم شد که همه آنها به بیوتیپ التور تعلق دارند.

جدول ۲: درصد فراوانی ژن های ctxA، ctxB و zot در *ویبریو کلرا* ایزوله شده از بیماران با روش Multiplex PCR

درصد فراوانی	تعداد نمونه	نام ژن در ویبریو کلراهای ایزوله شده
٪۹۰/۴	۶۶	$ctxA^+$
٪۹۰/۴	۶۶	$ctxB^+$
٪۹۱/۸	۶۷	Zot^+
٪۹/۵۸	۷	$ctxA^-/ctxB^-$
٪۸/۲۱	۶	$ctxA^-, ctxB^-/zot^-$
٪۱/۳۶	۱	$ctxA^-, ctxB^-/zot^+$

از ۷۳ نمونه بررسی شده ۶۶مورد(٪۹۰/۴) نمونه ها از نظر ctxA و ctxB مثبت بودند. بدین معنی که تمام نمونه‌هایی که فاقد ژن ctxA هستند از نظر وجود ژن ctxB نیز منفی هستند. ۶۷ نمونه (٪۹۱/۸) از نظر وجود ژن zot مثبت بودند وجود ژن zot وابستگی مطلق با دو ژن ctxA و ctxB داشتند، به این معنی که همه نمونه‌هایی که واجد دو ژن ctxA وctxB بودند از نظر وجود ژن نیز zot مثبت هستند. تنها یک نمونه فاقد دو ژن ctxA وctxB و واجد ژن zot بود (جدول ۲).

بحث:

باتوجه به اینکه علائم بالینی *ویبریو کلرا*های سمزا با سویه‌های بدون سم متفاوت است، لذا تشخیص سویه‌های سمزا بسیار مهم است(۱۷). به‌همین دلیل از روش‌های مختلفی مانند کشت، سروتایپینگ ریزاندامگان‌ها از طریق آگلوتیناسیون، روش‌های بیوشیمیایی و زیست‌شناختی، سنجش سم، الیزا و ایمونوفلورسانس برای تشخیص *ویبریوکلرا* سم زا استفاده می‌گردد (۱۲،۱۳)، که اغلب فاقد حساسیت و اختصاصیت مناسب بوده و اکثراً وقت‌گیر و پرهزینه هستند (۱۲،۱۱). در مقایسه با این روش‌ها، امروزه روش‌های مولکولی متنوعی با تشخیص سریع و قابل اطمینان به‌عنوان یک جایگزین قدرتمند به‌کار گرفته می‌شوند (۱۴،۱۵). با توجه به اینکه مطالعات مختلف نشان داده که سویه‌های حاوی عوامل ویرولانسی کلراتوکسین، سم Zonnula occludens بیماری بسیار شدیدتری ایجاد می‌کند و شناسایی سویه‌هائی که دارای این ژن‌ها هستند، از نظر کلینیکی دارای اهمیت هستند(۱۷). بنابراین این مطالعه با هدف به‌کارگیری روش Multiplex PCR برای جداسازی هم‌زمان ژن‌های ctxA، ctxB و zot در *ویبریوکلرا* ایزوله‌شده از بیماران استفاده گردید.

نتایج این مطالعه نشان داد که روش Multiplex PCR برپایه سه ژن ctxA،ctxB و zot یک روش با اختصاصیت، دقت و سرعت بالا است و می‌تواند ابزاری بسیار مفید برای آگاهی از سویه‌های بالینی سمزا ویبریوکلرا باشد، که این نتایج مشابه مطالعاتMarashi و همکاران(۱۸)، Tarr و همکاران(۱۹)، و Fallah Mehrabadi و همکاران (۲۰) است.

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که از بین ۷۳ نمونه مورد ارزیابی تعداد ۷ نمونه ctx^-/zot^-، ۶۶ نمونه ctx^+/zot^+ بودند که برخلاف نتایج مطالعه Blackstone و همکاران (۲۱) بود که سویه‌های ایزوله‌شده در مطالعه آنها فاقد ژن‌های سمزا بودند که این می‌تواند به این دلیل باشد که نمونه‌های آنها به‌صورت اتفاقی از محیط یا مواد غذایی گرفته شده بودند، ولی نمونه‌های مورد بررسی در این مطالعه از بین نمونه‌های بالینی ویبریوکلرا سروگروپO1 بودند .

نتایج این مطالعه نشان داد که همه ایزوله‌های دارای ژن‌های ctxA و ctxB واجد ژن zot هستند که مشابه مطالعه Singh و همکارانش است (۲۲) . این نتایج نشان دادند تقریباً ٪۱۰۰ نمونه‌های مورد مطالعه آنها هم‌زمان واجد ژن‌های ctxA،ctxB و zot هستند. آنها هم‌چنین ذکر کردند که اغلب سویه‌های Non-O1 و Non- O 139 فاقد ژن‌های فوق هستند و این بیانگر این موضوع است که سویه‌های *ویبریوکلرا* O1 واجد ژن‌های فوق بوده و در شناسایی عوامل سمزا و غیرسمزا می‌توان از ژن‌های ctxA،ctxB و zot استفاده کرد.

در مطالعهٔ دیگری که Rivera و همکاران (۲۳) انجام دادند ژن ctx و zot در ۸۹ نمونه کلینیکی از مکزیکوسیتی، برزیل، پرو و هندوستان مورد مطالعه قرار گرفت و از مجموع ۵۲ نمونه *ویبریوکلرا* O1 و O139 تعداد ۶ نمونه ctx^-/zot^- و ۴۶ نمونه ctx^+/zot^+ بودند یعنی٪۸۸/۵ نمونه‌ها ctx^+/zot^+ بودند. ۳۷ نمونه دیگر *ویبریو کلرا* O1 وNon O139 همگی ctx^-/zot^- بودند. نتایج حاصل از این مطالعه بسیار شبیه نتایج مطالعه حاضر بود. در مطالعه حاضر ٪۱۰۰ نمونه هایی که$ctxA^+$ از نظر ژن ctxB نیز مثبت بودند. این موضوع به این

دلیل است که سم کلرا یک سم AB5 است. همچنین ژن zot نیز در تمام این سویه‌ها مثبت ارزیابی شد و ۱۰۰٪ سویه‌هایی که واجد ژن‌های ctxA و ctxB بودند، از نظر وجود ژن zot نیز مثبت بودند. فقط در ۱/۳٪ از نمونه‌ها (یک نمونه) $ctxA^-/ctxB^-$ و zot^+ بود.

همان‌طورکه در بالا ذکر شد، در این مطالعه از یک نمونه بالینی سویه‌ای از *ویبریو کلرا* ایزوله شد که $ctxA^-/ctxB^-$ و zot^+ بود و این مشابه مطالعه Kislichkina و همکاران است(۲۴) . نتایج این مطالعات نشان داد که از ۵۵ سویه مورد مطالعه یک سویه واجد ژن zot ولی فاقد ژن‌های ctxA و ctxB و غیرسم‌زا بودند.

در مطالعه‌ای که Saleh و همکاران در عراق (۲۵) برروی نمونه‌های بالینی و محیطی انجام دادند گزارش دادند که همه ایزوله‌های بالینی واجد ژن‌های ctxA و ctxB هستند، ولی سویه‌های محیطی فاقد ژن‌های مذکورند که این تا حدودی با مطالعه حاضر مطابقت دارد.

در مطالعه حاضر ۹۰/۴ ٪ نمونه ها حاوی ژن‌های ctxA و ctxB بودند که این نتایج تقریباً مشابه مطالعه Fedio و همکاران (۲۶)، Imani و همکاران (۲۷) است و نشان داد که بیش از ۹۲ ٪ از سویه‌های ایزوله‌شده دارای ژن فوق هستند.

نتیجه‌گیری:

به‌طور کلی می‌توان گفت که روش Multiplex PCR با استفاده از پرایمرهای ctxA، ctxB و zot یک روش با اختصاصیت، دقت و سرعت بالا است و می‌تواند یک ابزار بسیار مفید برای آگاهی از سویه‌های بالینی سم‌زا از غیرسم‌زای *ویبریو کلرا* باشد که جداسازی سریع و دقیق این عامل سم‌زای وبا از عامل غیرسم‌زای آن به‌صورت هم‌زمان در مواردی که همه‌گیری وبا رخ می‌دهد، به منظور پیشگیری و جلوگیری از انتشار بیماری بسیار حائز اهمیت است، بنابراین این نوع Multiplex PCR روشی مناسب در جایگزینی روش‌های رایج PCR معمولی و روش کشت در جداسازی این اندامگان از نمونه های بالینی است.

تقدیر و تشکر:

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی خاتمه‌یافته مرکز تحقیقات میکرب‌شناسی کاربردی دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... (عج) است که در اینجا از تمامی اعضای این مرکز تشکر و قدردانی می‌گردد.

References:

1. Muanprasat C, Chatsudthipong V. Cholera: pathophysiology and emerging therapeutic targets. Future Med Chem 2013;5(7):781-98.
2. Shinoda S, Furumai Y, Katayama S, Mizuno T, Miyoshi S. Ecological study of pathogenic vibrios in aquatic environments. Biocontrol Sci 2013;18(1):53-8.
3. Mandal S, Mandal MD, Pal NK. Cholera: a great global concern. Asian Pac J Trop Med 2011; 4(7):573-80.
4. Vanden Broeck D, Horvath C, De Wolf MJ. Vibrio cholerae: cholera toxin. Int J Biochem Cell Biol 2007; 39(10):1771-5.
5. Albert MJ. Epidemiology & molecular biology of Vibrio cholerae O139 Bengal. Indian J Med Res 1996;104:14-27.
6. Mekalanos JJ, Rubin EJ, Waldor MK. Cholera: molecular basis for emergence and pathogenesis. FEMS Immunol Med Microbiol 1997;18(4):241-8.
7. Luo Y, Ye J, Jin D, Ding G, Zhang Z, Mei L, et al. Molecular analysis of non-O1/non-O139 Vibrio cholerae isolated from hospitalised patients in China. BMC Microbiol 2013;13:52.
8. Faruque SM, Albert MJ, Mekalanos JJ. Epidemiology, genetics, and ecology of toxigenic Vibrio cholerae. Microbiol Mol Biol Rev 1998;62(4):1301-14.
9. Shlyapnikov YM, Shlyapnikova EA, Simonova MA, Shepelyakovskaya AO, Brovko FA, Komaleva RL, Grishin EV, Morozov VN. Rapid simultaneous ultrasensitive immunodetection of five bacterial toxins. Anal Chem 2012;84(13):5596-603.
10. Pfeffer C, Oliver JD. A comparison of thiosulphate-citrate-bile salts-sucrose (TCBS) agar and thiosulphate-chloride-iodide (TCI) agar for the isolation of Vibrio species from estuarine environments. Lett Appl Microbiol 2003;36(3):150-1.
11. Ramamurthy T, Pal A, Bag PK, Bhattacharya SK, Nair GB, Kurozano H, et al. Detection of cholera toxin gene in stool specimens by polymerase chain reaction: comparison with bead enzyme-linked immunosorbent assay and culture method for laboratory diagnosis of cholera. J Clin Microbiol 1993 ;31(11):3068-70.
12. Dick MH, Guillerm M, Moussy F, Chaignat CL. Review of two decades of cholera diagnostics--how

far have we really come?PLoS Negl Trop Dis 2012;6(10):e1845.
13. Kumar P, Peter WA, Thomas S. Rapid detection of virulence-associated genes in environmental strains of Vibrio cholerae by multiplex PCR. Curr Microbiol. 2010;60(3):199-202.
14. Lyon WJ. TaqMan PCR for Detection of Vibrio cholerae O1, O139, Non-O1, and Non-O139 in Pure Cultures, Raw Oysters, and Synthetic Seawater. Appl Environ Microbiol 2001 ;67(10):4685-93.
15. Dalmasso A, Civera T, Bottero MT. Multiplex primer-extension assay for identification of six pathogenic vibrios. Int J Food Microbiol 2009 31;129(1):21-5.
16. Pal BB, Khuntia HK, Samal SK, Kar SK, Patnaik B. Epidemics of severe cholera caused by El Tor Vibrio cholerae O1 Ogawa possessing the ctxB gene of the classical biotype in Orissa, India. Int J Infect Dis 2010;14(5):e384-9.
17. Ang GY, Yu CY, Balqis K, Elina HT, Azura H, Hani MH, et al. Molecular evidence of cholera outbreak caused by a toxigenic Vibrio cholerae O1 El tor variant strain in Kelantan, Malaysia. J Clin Microbiol 2010;48(11):3963-9.
18. Marashi SM, Nasr Esfahani B, Tavakoli A, Moghim S, Pourshafie MR, Salehi M. Simultaneous Detection of Integrase and Antibiotic Resistance Genes within SXT Constin in Vibrio cholerae O1 El Tor Strains Isolated from Iran Using Multiplex-PCR. Iran J Basic Med Sci 2012;15(3):885-9.
19. Tarr CL, Patel JS, Puhr ND, Sowers EG, Bopp CA, Strockbine NA. Identification of Vibrio isolates by a multiplex PCR assay and rpoB sequence determination. J Clin Microbiol 2007;45(1):134-40.
20. Fallah Mehrabadi J, Morsali P, Nejad HR, Imani Fooladi AA. Detection of toxigenic Vibrio cholerae with new multiplex PCR. J Infect Public Health 2012;5(3):263-7.
21. Blackstone GM, Nordstrom JL, Bowen MD, Meyer RF, Imbro P, DePaola A. Use of a real time PCR assay for detection of the ctxA gene of Vibrio cholerae in an environmental survey of Mobile Bay. J Microbiol Methods 2007 ;68(2):254-9. 2007;68: 254–259
22. Singh DV, Isac SR, Colwell RR. Development of a hexaplex PCR assay for rapid detection of virulence and regulatory genes in Vibrio cholerae and Vibrio mimicus. J Clin Microbiol 2002 ;40(11):4321-4.
23. Rivera IG, Chowdhury MA, Sanchez PS, Sato MI, Huq A, Colwell RR, et al. Detection of cholera (*ctx*) and *zonula occludens (zot)* toxin genes in *Vibrio cholerae* O1, O139 and non-O1 strains. World Journal of Microbiology and Biotechnology . 1995; 11(5):572-577 .
24. Kislichkina AA, Stepanshina VN, Nizova AV, Maĭskaia NV, Mukhina TN, Mironova RI, Shemiakin IG. Vibrio cholerae strains certification. Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol 2012 ;(6):22-6.
25. Saleh TH, Sabbah MA, Jasem KA, Hammad ZN. Identification of virulence factors in Vibrio cholerae isolated from Iraq during the 2007-2009 outbreak. Can J Microbiol 2011 ;57(12):1024-31.
26. Fedio W, Blackstone GM, Kikuta-Oshima L, Wendakoon C, McGrath TH, DePaola A. Rapid detection of the Vibrio cholerae ctx gene in food enrichments using real-time polymerase chain reaction. J AOAC Int 2007;90(5):1278-83.
27. Imani FA, Iman ID, Hosseini DR, Karami A, Marashi SM. Design of a multiplex PCR method for detection of toxigenic-pathogenic in Vibrio cholerae. Asian Pac J Trop Med 2013;6(2):115-8.