(مقالهٔ پژوهشی)

شناسایی ژن‌های عامل پاتوژنیسیته در گونه‌های اسهال‌زای پاتووارهای *اشریشیاکلی* جداشده از نمونه‌های بالینی به روش Multiplex PCR

فائزه جلالوند[1]، کیومرث امینی[2*]

۱-کارشناسی‌ارشد میکروبیولوژی.
۲-استادیارگروه میکروبیولوژی.

۱و۲-گروه میکروبیولوژی، دانشکدهٔ علوم پایه، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی ساوه، ساوه، ایران.

[*] نویسندهٔ مسؤول:
کیومرث امینی؛ گروه میکروبیولوژی، دانشکدهٔ علوم پایه، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی ساوه، ساوه، ایران.
تلفن: ۰۰۹۸۹۱۲۵۴۵۴۰۷۴
Email: kamini@iau-saveh.ac.ir

چکیده

زمینه و هدف: *اشریشیاکلی* موجب انواع بیماری‌های روده‌ای و خارج روده‌ای شده و مهم‌ترین عامل اسهال کودکان در کشورهای در حال توسعه می‌باشد. هدف از این مطالعه، تعیین هویت مولکولی پاتووارهای *اشریشیاکلی* مولد اسهال جداشده از نمونه-های بالینی به روش Multiplex PCR می‌باشد.

روش بررسی: در این مطالعهٔ توصیفی، تعداد ۱۵۰ نمونهٔ مدفوع اسهالی از بیمارستان-های غرب شهر تهران جمع‌آوری و با انجام آزمون‌های بیوشیمیایی (TSI, SIM, MR&VP)، تعداد ۵۵ نمونه *اشریشیاکلی* شناسایی گردید. جهت شناسایی ژن‌های پاتووار از آزمون PCR چندگانه‌ای استفاده شد. داده‌های آماری با نسخهٔ ۱۹ نرم‌افزار SPSS و با استفاده از آزمون آماری توصیفی کروسکال-والیس مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

یافته‌ها: از مجموع ۵۵ نمونهٔ بالینی جهت شناسایی و تأیید ژن‌های مورد مطالعه در این تحقیق، ژن stx_1 در هیچ‌یک از نمونه‌ها شناسایی نگردید. بیشترین توزیع فراوانی مربوط به ژن stx_2 با ۱۲/۷۲ درصد و کمترین فراوانی مربوط به ژن *IPaH* به میزان ۱/۸۱ درصد گزارش شده است.

نتیجه‌گیری: توزیع فراوانی بیشتر ژن stx_2 نسبت به سایر ژن‌های مطالعه‌شده در این تحقیق را می‌توان به‌عنوان عامل اصلی در ایجاد اسهال ناشی از *اشریشیاکلی* دانست. با روش Multiplex PCR می‌توان در کوتاه‌ترین مدت زمان با ویژگی و حساسیت بالا به حضور ژن‌های بیماری‌زا پی برد و با درمان مناسب و به‌موقع از به‌وجود آوردن سویه‌های مقاوم و انتقال این ژن‌ها در جمعیت‌های انسانی جلوگیری به‌عمل آورد.

کلید واژگان: *اشریشیاکلی* اسهال‌زا، PCR چندگانه‌ای.

دریافت مقاله: ۱۳۹۴/۴/۲۰ **دریافت مقالهٔ اصلاح‌شده: ۱۳۹۴/۱۱/۲۶** **اعلام قبولی: ۱۳۹۴/۱۱/۲۷**

مقدمه

عفونت‌های اسهالی یکی از مهم‌ترین عوامل مرگ و میر در کودکان، به‌ویژه در کشورهای در حال توسعه می‌باشد و هر ساله حدود دو میلیون نفر در اثر اسهال جان خود را از دست می‌دهند. از جمله عوامل باکتریایی، *اشریشیاکلی* اسهال‌زاست. (Diarrheagenic *Escherichia coli*) (DEC) مهم‌ترین عامل اتیولوژیک اسهال کودکان و نشان‌دهندهٔ یک مسألهٔ جدی در بهداشت عمومی کشورهای در حال توسعه می‌باشد(۱). این باکتری دارای فاکتورهای حدت مهمی از جمله آدهزین‌های فیمبریه‌ای، آنتروتوکسین‌ها، سایتوتوکسین‌ها، کپسول و لیپوپلی‌ساکارید است که توسط ژن‌های مختلفی رمزدهی می‌شوند (۲-۴). این ارگانیسم به‌واسطهٔ تولید سموم روده‌ای حساس به حرارت (LT) و مقاوم به حرارت (ST) ممکن است یکی از این دو سم یا هر دو را تولید نماید. سم LT توسط ژن‌های ***eltA*** و ***eltB*** رمزدهی شده و جزء سموم داخلی سلولی و ترکیبات ADP – ریبوزیل ترانسفراز می‌باشد (۵، ۶). این سم از طریق سیستم ترشحی نوع II به فضای خارجی باکتری ترشح و از لحاظ ساختاری و عملکردی مشابه سم باکتری وبا بوده و از لحاظ پادگنی به دو نوع LT-1 و LT-II دسته‌بندی می‌شود. این سموم آنزیم آدنیلات سیکلاز را ریبوزیله و فعال نموده و در نهایت، منجر به ترشح یون‌ها از یاخته میزبان به فضای خالی روده می‌شوند (۷، ۸). سم ST توسط ژن ***sta*** رمزدهی شده و نوعی از آنزیم گووانیلات سیکلاز می‌باشد که به دو نوع Sta و Stb دسته‌بندی شده که هر دو از لحاظ ساختاری و عملکردی با هم تفاوت دارند. سم Sta در بیماری‌زایی انسان و سم Stb در ایجاد بیماری در حیوانات اهمیت دارد. آنزیم Sta گووانیلات سیکلاز یاخته میزبان را فعال نموده و منجر به ترشح یون‌ها به فضای داخلی روده می‌شود؛ در حالی‌که Stb باعث آزاد شدن سروتونین و پروستاگلاندین E2 از یاخته میزبان و افزایش مقادیر یون‌های کلسیم در سیتوپلاسم شده که در نهایت، منجر به ترشح یون‌ها به فضای داخلی روده و ایجاد اسهال می‌گردد (۷-۹). پاتوتیپ EHEC توانایی تولید سم شیگا و دارای جایگاه ژنی LEE بوده که منجر به تولید سموم (Stx,Hemolysin) می‌شود (۱۰). اسهال در ایران در مناطق مختلف دارای شیوع متفاوتی بوده که در سال ۱/۶ میلیون گزارش می‌شود که این رقم در سال ۲۰۰۳ به ۷۱۰۰۰ نفر کاهش یافت (۱۶). شناسایی انواع مختلف DEC شامل واکنش‌های بیوشیمیایی، سروتایپینگ، سنجش‌های فنوتیپی براساس خصوصیات ویرولانس و روش‌های تشخیص مولکولی می‌باشد. از این میان، تشخیص ژن‌های بیماری‌زایی اختصاصی با PCR غالباً مورد استفاده قرار می‌گیرد، زیرا این روش نتایج سریع و مطمئن با حساسیت بالا می‌دهد (۵، ۶). به‌دلیل فراوانی *اشریشیاکلی* در نمونه‌های اسهالی و شیوع بیماری‌های گاستروانتریت به‌ویژه در کودکان، نورادان و افراد با سیستم ایمنی سرکوب‌شده، دانستن فراوان‌ترین پاتوژن عامل مولد بیماری، راه مقابله با آن و پیشگیری و کنترل ضروری می‌باشد. لذا این مطالعه می‌تواند جنبه‌های نوینی را در این خصوص برای ما مهیا نماید. هدف از این مطالعه، تعیین هویت مولکولی پاتووارهای *اشریشیاکلی* مولد اسهال و شناسایی ژن‌های ***LT***، ***ST***، ***IPaH***، ***stx1*** و stx_2 در نمونه‌های بالینی به روش Multiplex PCR بوده است.

روش بررسی

در این مطالعهٔ مقطعی- توصیفی، بر اساس مطالعات قبلی و سطح اطمینان ۹۵ درصد با استفاده از فرمول $n=z2P(1-P)/d2$ و خطای قابل قبول ۰/۰۵، تعداد ۱۵۰ نمونه اسهالی از بیمارستان‌های غرب تهران، طی ماه‌های خرداد تا شهریور ۱۳۹۳ جمع‌آوری و سپس جهت کشت بر روی محیط‌های مک‌کانکی آگار، EMB آگار و کروم آگار ***E.coli*** انتقال داده شد و در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی-

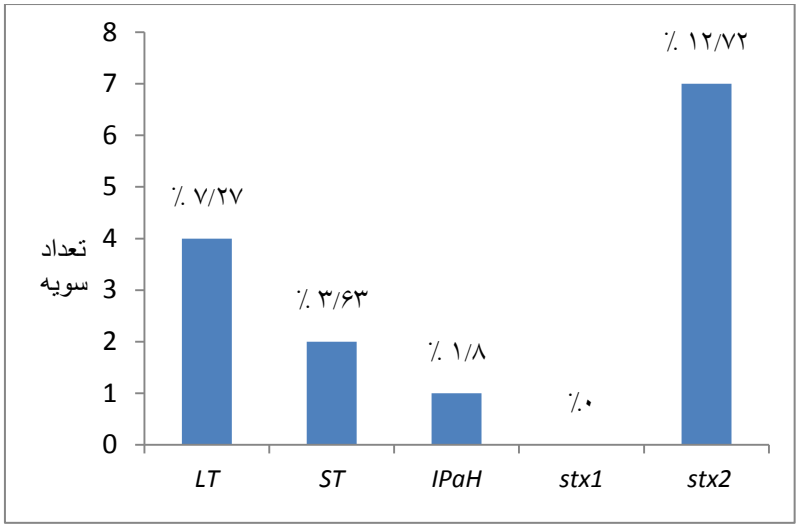
گراد به‌مدت ۲۴ ساعت انکوباسیون گردید. بعد از شناسایی حضور باکتری *E.coli*، آزمون‌های تأییدی بیوشیمیایی شامل: تست‌های IMViC، TSI (Triple Sugar Iron Agar) جهت تشخیص نهایی انجام شد. در نهایت، تعداد ۵۵ نمونه باکتری *اشریشیاکلی* شناسایی و تأیید گردید. برای استخراج DNA از کیت باکتری‌های گرم منفی سیناژن (Cinna Pure DNA KIT-PR881613) استفاده گردید. برنامهٔ آزمون Multiplex-PCR: مرحلهٔ دناتوراسیون اولیه ۹۵ درجهٔ سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰ دقیقه، مرحلهٔ دناتوراسیون ۹۵ درجهٔ سانتی‌گراد به‌مدت ۴۰ ثانیه، مرحلهٔ اتصال ۵۸ درجهٔ سانتی‌گراد به‌مدت ۱ دقیقه، مرحلهٔ بسط ۷۲ درجهٔ سانتی‌گراد به‌مدت ۲ دقیقه (تعداد ۴۰ سیکل)، مرحلهٔ بسط نهایی ۷۲ درجهٔ سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰ دقیقه می‌باشد. پرایمرهای مورد استفاده در این آزمون در جدول ۱ ذکر شده است (۱۱). مخلوط‌های استفاده‌شده جهت انجام آزمون M-PCR به این شرح می‌باشد: آب مقطر ۱۶/۱۵ میکرولیتر، 1X.PCR Buffer به میزان ۲ میکرولیتر، $MgCl_2$ به میزان ۰/۷ میکرولیتر، (dNTP mix (5Mm به میزان ۰/۷ میکرولیتر، پرایمرهای مورد استفاده هر کدام ۰/۶ میکرولیتر، آنزیم *Taq Polymerase* به میزان ۰/۲۵ میکرولیتر، نمونه DNA ۴ میکرولیتر در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر تهیه گردید. آزمون Multiplex-PCR در دستگاه TECHNE انجام شد. جهت بررسی محصول نمونه‌ها بر روی ژل آگارز ۱ درصد انتقال داده شد و بعد از رنگ‌آمیزی در دستگاه ژل داک BIORAD مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها

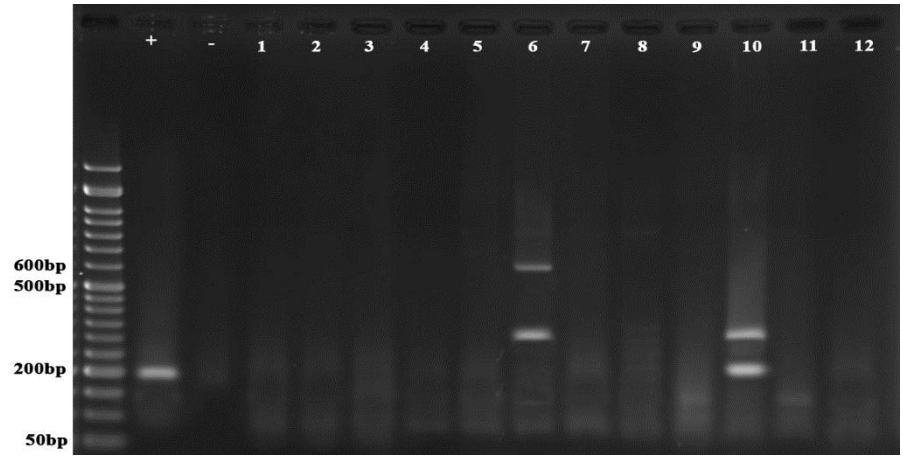
با توجه به نتایج به‌دست آمده از مجموع ۵۵ نمونهٔ بالینی جهت شناسایی و تأیید ژن‌های مورد مطالعه در این تحقیق، ژن‌های stx_1 در هیچ‌یک از نمونه‌ها شناسایی نگردید. بیشترین توزیع فراوانی مربوط به ژن stx_2 با ۱۲/۷۲ درصد بوده و کمترین فراوانی مربوط به ژن *IPaH* به میزان ۱/۸۱ درصد گزارش شده است. همچنین در این مطالعه در ۵ نمونه از مجموع نمونه‌ها، دو ژن stx_2 و *ST* به‌طور همزمان ردیابی و در ۴ نمونه نیز ژن‌های stx_2، *ST* و *IpaH* به‌طور همزمان شناسایی گردید. در ۴ نمونه نیز ژن‌های *LT* وstx_2 به‌طور همزمان شناسایی شدند. تنها در یک نمونه ژن *LT* به تنهایی شناسایی گردید.

جدول ۱: مشخصات پرایمرهای مورد استفاده

طول باند (bp)	ژن هدف	توالی پرایمر(3 to 5)	پرایمر
۴۵۰	*LT*	GGCGACAGATTATACCGTGC	LTf
		CGGTCTCTATATTCCCTGTT	LTr
۱۹۰	*ST*	ATTTTTMTTTCTGTATTRTCTT	STf
		CACCCGGTACARGCAGGATT	STr
۶۰۰	*ipaH*	GTTCCTTGACCGCCTTTCCGATACCGTC	IpaH1
		GCCGGTCAGCCACCCTCTGAGAGTAC	IpaH2
۱۸۰	*Stx1*	ATAAATCGCCATTCGTTGACTAC	Stx1f
		AGAACGCCCACTGAGATCATC	Stx1r
۲۵۵	*Stx2*	GGCACTGTCTGAAACTGCTCC	Stx2f
		TCGCCAGTTATCTGACATTCTG	Stx2r



نمودار ۱: توزیع فراوانی ژن‌های مورد مطالعه با روش Multiplex-PCR



شکل ۱: نتایج M-PCR بر روی ژل از چپ: مارکر (۵۰ bp)، کنترل مثبت، کنترل منفی، نمونهٔ شماره ۱۰ حاوی ژن *ST* (۱۹۰ bp) و *stx*$_2$ (۲۵۵ bp)، نمونهٔ شماره ۶ دارای ژن *stx*$_2$ (۲۵۵ bp) و ژن *IpaH* (۶۰۰ bp) می‌باشد.

بحث

با توجه به فراوانی بیشتر ژن *Stx*$_2$ در این مطالعه نسبت به سایر ژن‌ها، می‌توان آن را به‌عنوان عامل اصلی در ایجاد اسهال ناشی از *اشریشیاکلی* دانست. بیماری‌های ایجادشده توسط باکتری *اشریشیاکلی* شامل اسهال خونی، اسهال، کولیت هموراژیک، ترمبوتیک ترومبوسیتوپنی پورپورآ، سندرم اورمی همولتیک و در موارد شدید مرگ می‌باشد. اسهال یکی از عوامل بیماری‌زا و مرگ و میر در میان کودکان زیر ۵ سال در جهان سوم محسوب می‌شود (۲). بالانکو (Balanco) در سال ۲۰۰۳ در اسپانیا از روش Multiplex PCR به‌منظور بررسی ژن‌های *Stx*$_1$ و *Stx*$_2$، *eaeA* و *hlyA* استفاده نمود و گزارش کرد که از مجموع ۳۸۴ سویه STEC شناسایی شده در ۵۵ درصد ژن *Stx*$_1$ و *Stx*$_2$، در ۶ درصد *eae* و در ۲۸ درصد ژن *hlyA* مشاهده گردید. فراوانی بالای ژن *Stx*$_1$ در این مطالعه قابل توجه بوده است (۱۲). در صورتی‌که نتایج مطالعهٔ فوق با نتایج تحقیق حاضر از نظر توزیع فراوانی ژن‌های مورد مطالعه کاملاً متفاوت بوده و بیشترین میزان فراوانی متعلق به ژن *Stx*$_2$ می‌باشد. در

تحقیق بیرنه (Byrne) و همکاران در سال ۲۰۰۳، تعداد ۱۱ سویه همزمان دارای ژن‌های *eaeA*، *Stx_1* و *hly* و ۵ سویه واجد ژن‌های *Stx_2* ، *eaeA* و *hly* و ۳ سویه هم دارای ژن‌های *Stx_1*، *Stx_2* و *eaeA* بوده‌اند (۱۳). مویو (Moyo) و همکاران در تانزانیا در سال ۲۰۰۷، از روش M-PCR به‌منظور شناسایی پاتوتیپ‌های EAEC، EPEC، ETEC، EIEC و EHEC استفاده کردند. ۱۴/۶ درصد از سویه‌ها به‌عنوان پاتوتیپ *EAEC* و ۴/۶ درصد به‌عنوان پاتوتیپ *EPEC* شناسایی شدند. ۳/۶ درصد از سویه‌ها به‌عنوان پاتوتیپ *ETEC* شناسایی که حامل ژن *Stla* یا *Stlb* بودند، و ژن‌های مربوط به *EHEC (Stx_1,Stx_2)* و *EIEC* در هیچ‌کدام از نمونه‌ها مشاهده نشد. *EAEC* تیپیک و *EPEC* تیپیک به‌عنوان شایع‌ترین عامل اسهال خونی در کودکان تانزانیا شناسایی گردید (۶). شتی (Shetty) و همکاران در سال ۲۰۱۲ با بررسی میزان فراوانی پاتوتیپ‌های *اشریشیاکلی* اسهال‌زا به این نتیجه رسیدند که بیشترین فراوانی DEC مربوط به EPEC آتیپیکال با ۱۰/۴ درصد فراوانی و EAEC، STEC با ۳/۴ درصد فراوانی بود (۱۷). سلطان دلال و همکاران در سال ۲۰۱۰ در ایران، با استفاده از روش M-PCR به‌منظور شناسایی سویه‌های STEC، EPEC، EIEC در کودکان مبتلا به اسهال خونی، EPEC را در ۵۵/۶ درصد، STEC را در ۲۵ درصد و EIEC را در ۱۹/۴ درصد از نمونه‌ها جداسازی نمودند (۱۷). محمدی و همکاران در سال ۲۰۱۳، در کرمانشاه با روش PCR جهت شناسایی پاتوتیپ EPEC در شیر خام، ژن‌های *eaeA* و سپس *Stx_1, Stx_2* را هدف‌گذاری نموده و به این نتیجه رسیدند که ۱۷ نمونه (۸/۲۵ درصد) واجد ژن‌های *eaeA + Stx_2* بودند (۱۴). به‌نظر می‌رسد که با توجه به نتایج عبیری و توزیع ژن‌ها و مقایسهٔ آن با نتایج تحقیقات حاضر، مواد غذایی می‌تواند در انتقال *اشریشیاکلی* اسهال‌زا به‌خصوص در کودکان نقش مهمی را ایفا نماید. کارگر و همکاران در سال ۱۳۹۰ نیز طی مطالعه‌ای بر روی ژن‌های *Stx_1* ، *Stx_2* ، *eaeA* و *hly* ، ۳ سویه دارای مخلوطی از ژن‌های *Stx_1* و *eaeA* و ۱ سویه دارای مخلوطی از ژن‌های *Stx_1* و *Stx_2* و *eaeA* و ۱ سویه نیز دارای ژن *hly* بود (۱۵). در مطالعهٔ ما که بر روی نمونه‌های مبتلا به اسهال انجام گرفت، میزان جداسازی هر ۵ ژن بررسی گردید. در نتایج پژوهش فقط در ۱۴ نمونه این ۵ ژن شناسایی شد. ژن *stx_2* که توسط *اشریشیاکلی* STEC تولید می‌شود بیشترین فراوانی به میزان ۱۲/۷۲ درصد مشاهده شد. فراوانی بالاتر این ژن نسبت به سایر ژن‌های مورد مطالعهٔ ما با سایر مطالعات هم‌خوانی داشته و مؤید این نکته است که تفاوت منطقهٔ جغرافیایی در توزیع ژن کمتر دخیل می‌باشد. البته توزیع فراوانی ژن‌های مطالعه‌شده در این تحقیق نسبت به سایر مطالعات کشورهای آمریکایی و اروپایی پایین‌تر می‌باشد. دلیل این امر می‌تواند دربرگیرندهٔ این نکتهٔ مهم باشد که انجام مطالعات پیوسته و هدفدار این کشورها در توزیع فراوانی و اعلام ارقام صحیح آماری تأثیرگذار می‌باشد. در صورتی‌که در ایران، مطالعات زیادی برای شناسایی مولکولی پاتوتیپ های *E.coli* با استفاده از M-PCR صورت نگرفته است که این خود می‌تواند دلیلی بر وجود اختلاف بین نتایج باشد.

نتیجه‌گیری

به‌نظر می‌رسد که مناطق جغرافیایی و زمان نمونه‌برداری از بیماران یکی از عوامل تأثیرگذار بر روی میزان جداسازی و شناسایی ژن‌های حدت باکتری *اشریشیاکلی* و پاتووار عامل اسهال به‌عنوان ژن‌های هدف می‌تواند مطرح باشد. بررسی و مطالعهٔ بیشتر در این مورد بر روند پیشگیری و اجرای برنامه‌های کنترلی مؤثر می‌باشد.

قدردانی

نگارندهٔ این مقاله، کمال تشکر و سپاسگزاری خود را از کارکنان آزمایشگاه پژوهشی میکروبیولوژی پاسارگاد مهندس ابوالفضل مقدم و دکتر علیرضا مختاری که در انجام مراحل عملی این تحقیق یاری نمودند اعلام‌می‌دارد.

منابع

1-Bryce J, Boschi-Pinto C, Shibuya K, Black RE, Group WCHER. WHO estimates of the causes of death in children. The Lancet. 2005;365(9465):1147-52.

2-Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clin Microbiol rev. 1998;11(1):142-201.

3-Nataro JP, Baldini MM, Kaper JB, Black RE, Bravo N, Levine MM. Detection of an adherence factor of enteropathogenic *Escherichia coli* with a DNA probe. J Infect Dis. 1985;152(3):560-5.

4-Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL. Pathogenic *Escherichia coli*. Nat Rev Microbiol. 2004;2(2):123-40.

5-Ali MMM, Mohamed ZK, Klena JD, Ahmed SF, Moussa TA, Ghenghesh KS. Molecular characterization of diarrheagenic *Escherichia coli* from Libya. Am J Trop Med Hyg . 2012;86(5):866-71.

6-Moyo SJ, Maselle SY, Matee MI, Langeland N, Mylvaganam H. Identification of diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from infants and children in Dar es Salaam, Tanzania. BMC Infect Dis. 2007;7(1):92.

7-Jawetz M, editor .Adelberg's Medical microbiology. Twenty; 2007.

8-Murray PR, Drew WL, Kobayashi GS, Thompson Jr J. Medical microbiology: Wolfe Medical Publications Ltd; 1990.

9-Mayatepek E, Seebass E, Hingst V, Kroeger A, Sonntag H. Prevalence of enteropathogenic and enterotoxigenic *Escherichia coli* in children with and without diarrhoea in Esteli, Nicaragua. J Diarrhoeal Dis Res. 1993:169-71.

10-Fagan PK, Hornitzky MA, Bettelheim KA, Djordjevic SP. Detection of Shiga-Like Toxin (*stx1 andstx2*), Intimin (*eaeA*), and Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) Hemolysin (EHEC *hlyA*) Genes in Animal Feces by Multiplex PCR. Appl Environ Microbiol. 1999;65(2):868-72.

11-Aranda K, Fagundes-Neto U, Scaletsky I. Evaluation of multiplex PCRs for diagnosis of infection with diarrheagenic *Escherichia coli* and Shigella spp. J Clin Microbiol. 2004;42(12):5849-53.

12-Blanco M, Blanco J, Mora A, Rey J, Alonso J, Hermoso M, et al. Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from healthy sheep in Spain. J Clin Microbiol. 2003;41(4):1351-6.

13-Byrne CM EI, Call JE, ka Spar CW, Buege DR, Hie mke cj, et al. Characterization of *Escherchia Coli* 0157: K7 from downerand healthy dairy cattle in the upper mid west region of the united state. Appl Envion Microbiol. 2003;69(8): 4683-8.

14-Mohammadi P, Abiri R. Isolation of Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) from raw milk in Kermanshah by polymerase chain reaction (PCR). Jundishapur J Microbiol. 2013;6:5439.

15-Kargar M DP, Homayoon M. Evolution of Virulence Genes and Antibiotic Resistance of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Isolated from Hamburger by Multiplex PCR in Shiraz. J Isfahan Med Sch. 2011;29(148):977-87.

16-Jafari F, Garcia-Gil L, Salmanzadeh-Ahrabi S, Shokrzadeh L, Aslani M, Pourhoseingholi M, et al. Diagnosis and prevalence of enteropathogenic bacteria in children less than 5 years of age with acute diarrhea in Tehran children's hospitals. J Infect. 2009: 58(1):21-7.

17-Soltan Dallal MM SYM, Akbari A. Multiplex Polymerase chain Reaction (PCR) assay for simultaneous detection of Shiga-like toxin *(Stx1 and stx2)*, intimin (*eae*) and invasiveplasmid antigen M (*iPam*) genes in diarrheagenic *Escherchia Coli*. Afr J Biotechnol. 2010;10(9):1522-6.

Identification of Genes Responsible for Pathogenicity in a Diarrhea-causing Strain of *Escherichia coli* Pathovars Clinically Isolated Specimens by Multiplex PCR

Faezeh Jalalvand[1], Kumarss Amini[2*]

1-Msc in Microbiology.
2-Assistant Professor of Microbiology.

1,2-Department of Microbiology, Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh, Iran.

⁎Corresponding author:
Kumarss Amini; Department of Microbiology, Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh, Iran.
Tel: +989125454074
Email: kamini@iau-saveh.ac.ir

Abstract

Background and Objectives: *Escherichia coli* causes intestinal and extra intestinal diseases and is a major cause of diarrhea in children in developing countries. The aim of this study was to determine the molecular identity of pathogenic *E.coli* isolated from clinical samples by the Multiplex PCR.

Subjects and Methods: In this cross-sectional study 150 stool samples collected from hospitals in West Tehran and biochemical tests (TSI, SIM, MR&VP) were used to identify E. coli species. Identification of genes pathovar diarrheal was carried out by use of multiplex PCR assay. Statistical data was performed with SPSS version 19, using (kruskal–Wallis one-way analysis of variance) descriptive statistical analysis.

Results: A total of 55 of isolated clinical samples were identify as *E. coli*. Gene stx_1 was not identified in any of the samples. Among the identified genes, the highest frequency of responsible gene was stx_2 with 12.72% and the lowest was for *IPaH* gene with 1.81%.

Conclusion: Frequency more Stx_2 than other genes gene studied in this research can be seen as a major factor in causing diarrhea caused by E. coli. Multiplex PCR method can be in the shortest period of time with high specificity and sensitivity to the presence of disease-causing genes discovered and be prevented With appropriate and timely treatment of the creation of resistant strains and transmission of these genes in the human population.

Keywords: *Escherichia coli* Diarrheagenic, Multiplex PCR.

►*Please cite this paper as:*
Jalalvand F, Amini K. Identification of Genes Responsible for Pathogenicity in a Diarrhea-causing Strain of Escherichia coli Pathovars Clinically Isolated Specimens by Multiplex PCR. Jundishapur Sci Med J 2016;15(1):11-17.

Received: July 11, 2015 **Revised: Feb 15, 2016** **Accepted: Feb 16, 2016**