

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

فائزه جالوند^۱، کیومرث امینی^{۲*}

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 نمونه‌های بالینی به روش Multiplex PCR می‌باشد.

روش بررسی: در این مطالعه توصیفی، تعداد ۱۵۰ نمونه مدفوع اسهالی از بیمارستان‌های 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 نسخه ۱۹ نرم‌افزار SPSS و با استفاده از آزمون آماری توصیفی کروسکال-والیس مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

یافته‌ها: از مجموع ۵۵ نمونه بالینی جهت شناسایی و تأیید ژن‌های مورد مطالعه در این تحقیق، ژن *stx1* در هیچ‌یک از نمونه‌ها شناسایی نگردید. بیشترین توزیع فراوانی مربوط به ژن *stx2* با ۱۲/۷۲ درصد و کمترین فراوانی مربوط به ژن *IPaH* به میزان ۱/۸۱ درصد گزارش شده است.

نتیجه‌گیری: توزیع فراوانی بیشتر ژن *stx2* 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.

۱- کارشناسی ارشد میکروبیولوژی.

۲- استادیار گروه میکروبیولوژی.

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

* نویسنده مسؤول:

کیومرث امینی؛ گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی ساوه، ساوه، ایران.

تلفن: ۰۰۹۸۹۱۲۵۴۵۴۰۷۴

Email: kamini@iau-saveh.ac.ir

اعلام قبولی: ۱۳۹۴/۱۱/۲۷

دریافت مقاله اصلاح‌شده: ۱۳۹۴/۱۱/۲۶

دریافت مقاله: ۱۳۹۴/۴/۲۰

مقدمه

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 فتوتیپی براساس خصوصیات ویروالانس 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). به دلیل فراوانی اشریشیاکلی در نمونه‌های اسهالی و شیوع بیماری‌های گاستروانتریت به‌ویژه در کودکان، نوزادان 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 *ST*، *LT*، *IPaH*، *stx1* و *stx2* در نمونه‌های بالینی به روش Multiplex PCR بوده است.

روش بررسی

در این مطالعه مقطعی - توصیفی، بر اساس مطالعات قبلی و سطح اطمینان ۹۵ درصد با استفاده از فرمول $n = z^2 P(1-P) / d^2$ 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 درجه سانتی-

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 نشان‌دهنده یک مسأله جدی در بهداشت عمومی کشورهای در حال توسعه می‌باشد (۱). این باکتری دارای فاکتورهای حدت مهمی از جمله آدهزین‌های-فیمبریه‌ای، آنروتوکسین‌ها، سایتوتوکسین‌ها، کپسول و لیپوپلی‌ساکارید است که توسط ژن‌های مختلفی رمزدهی می‌شوند (۲-۴). این ارگانیزم به‌واسطه 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 ترشحي 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 گوانیلات 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* گوانیلات سیکلاز یاخته میزبان را فعال نموده و منجر به ترشح یون‌ها به فضای داخلی روده می‌شود؛ در حالی که *Stb* باعث آزاد شدن سروتونین و پروستاگلاندین E2 از یاخته میزبان و افزایش مقادیر یون‌های کلسیم در

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 داگ BIORAD مورد بررسی قرار گرفت.

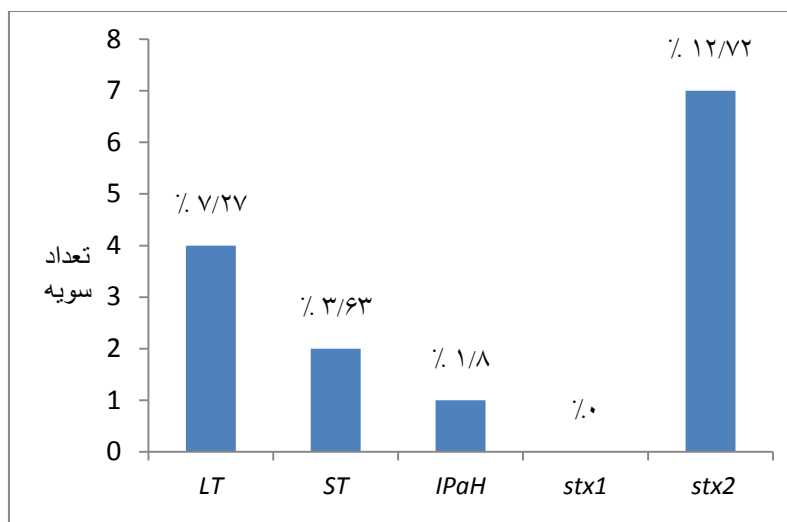
یافته‌ها

با توجه به نتایج به‌دست آمده از مجموع ۵۵ نمونه بالینی جهت شناسایی و تأیید ژن‌های مورد مطالعه در این تحقیق، ژن‌های *stx1* در هیچ‌یک از نمونه‌ها شناسایی نگردید. بیشترین توزیع فراوانی مربوط به ژن *stx2* 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 *ST* و *stx2* به‌طور همزمان ردیابی و در ۴ نمونه نیز ژن‌های *stx2*، *ST* و *IpaH* به‌طور همزمان شناسایی گردید. در ۴ نمونه نیز ژن‌های *LT* و *stx2* به‌طور همزمان شناسایی شدند. تنها در یک نمونه ژن *LT* به تنهایی شناسایی گردید.

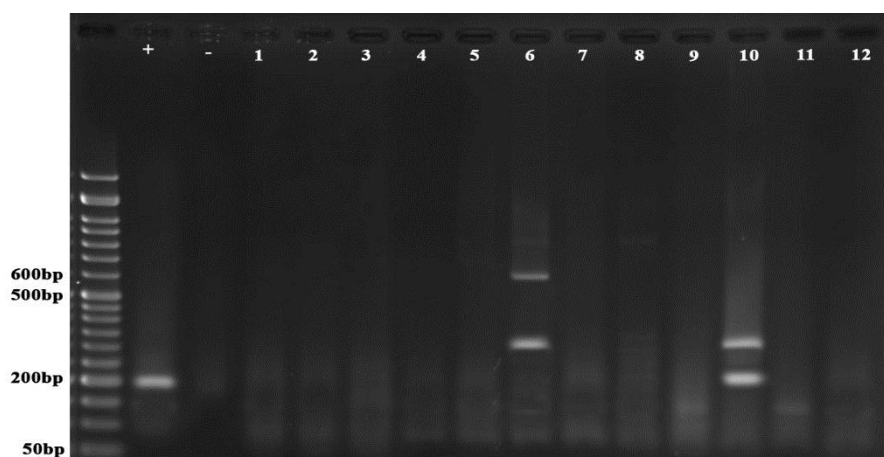
گراد به‌مدت ۲۴ ساعت انکوباسیون گردید. بعد از شناسایی حضور باکتری *E.coli*، آزمون‌های تأییدی بیوشیمیایی شامل: تست‌های TSI, IMViC (Triple) Sugar Iron Agar جهت تشخیص نهایی انجام شد. در نهایت، تعداد ۵۵ نمونه باکتری/شریشیاکلی شناسایی و تأیید گردید. برای استخراج DNA از کیت باکتری‌های گرم منفی سیناژن (-) Cinna Pure DNA KIT-PR881613 استفاده گردید. برنامه آزمون Multiplex-PCR: مرحله دنا تورا سیون اولیه ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰ دقیقه، مرحله دنا تورا سیون ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۴۰ ثانیه، مرحله اتصال ۵۸ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱ دقیقه، مرحله بسط ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲ دقیقه (تعداد ۴۰ سیکل)، مرحله بسط نهایی ۷۲ درجه 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*

جدول ۱: مشخصات پرایمرهای مورد استفاده

پرایمر	توالی پرایمر (3 to 5)	ژن هدف	طول باند (bp)
LTf	GGCGACAGATTATACCGTGC	<i>LT</i>	۴۵۰
LTr	CGGTCTCTATATTCCTGTT		
STf	ATTTTTMTTCTGTATTRTCTT	<i>ST</i>	۱۹۰
STr	CACCCGGTACARGCAGGATT		
IpaH1	GTTCCCTTGACCGCCTTTCCGATACCGTC	<i>ipaH</i>	۶۰۰
IpaH2	GCCGGTCAGCCACCCTCTGAGAGTAC		
Stx1f	ATAAATCGCCATTCGTTGACTAC	<i>Stx1</i>	۱۸۰
Stx1r	AGAACGCCACTGAGATCATC		
Stx2f	GGCACTGTCTGAAACTGCTCC	<i>Stx2</i>	۲۵۵
Stx2r	TCGCCAGTTATCTGACATTCTG		



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، نمونه شماره ۱۰ حاوی ژن *ST* (۱۹۰ bp) و *stx2* (۲۵۵ bp)، نمونه شماره ۶ دارای ژن *stx2* (۲۵۵ bp) و ژن *IpaH* (۶۰۰ bp) می‌باشد.

بحث

روش Multiplex PCR به منظور بررسی ژن‌های *Stx1* و *Stx2*، *eaeA* و *hlyA* استفاده نمود و گزارش کرد که از مجموع ۳۸۴ سویه STEC شناسایی شده در ۵۵ درصد ژن *Stx1* و *Stx2*، در ۶ درصد *eae* و در ۲۸ درصد ژن *hlyA* مشاهده گردید. فراوانی بالای ژن *Stx1* در این مطالعه قابل توجه بوده است (۱۲). در صورتی که نتایج مطالعه فوق با نتایج تحقیق حاضر از نظر توزیع فراوانی ژن‌های مورد مطالعه کاملاً متفاوت بوده و بیشترین میزان فراوانی متعلق به ژن *Stx2* می‌باشد. در

با توجه به فراوانی بیشتر ژن *Stx2* در این مطالعه نسبت به سایر ژن‌ها، می‌توان آن را به عنوان عامل اصلی در ایجاد اسهال ناشی از /شیریشیاکلی دانست. بیماری‌های ایجاد شده توسط باکتری /شیریشیاکلی شامل اسهال خونی، اسهال، کولیت هموراژیک، ترمبوتیک ترومبوسیتوپنی پورپورا، سندرم اورمی همولیتیک 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

۳ سویه دارای مخلوطی از ژن‌های *Stx1* و *eaeA* و ۱ سویه دارای مخلوطی از ژن‌های *Stx1* و *Stx2* و *eaeA* و ۱ سویه نیز دارای ژن *hly* بود (۱۵). در مطالعه 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 *stx2* که توسط /شیریشیاکلی STEC تولید می‌شود بیشترین فراوانی به میزان ۱۲/۷۲ درصد مشاهده شد. فراوانی بالاتر این ژن نسبت به سایر ژن‌های مورد مطالعه ما با سایر مطالعات هم‌خوانی داشته و مؤید این نکته است که تفاوت منطقه جغرافیایی در توزیع ژن کمتر دخیل می‌باشد. البته توزیع فراوانی ژن‌های مطالعه شده در این تحقیق نسبت به سایر مطالعات کشورهای آمریکایی و اروپایی پایین‌تر می‌باشد. دلیل این امر می‌تواند دربرگیرنده این نکته مهم باشد که انجام مطالعات پیوسته و هدفدار این کشورها در توزیع فراوانی و اعلام ارقام صحیح آماری تأثیرگذار می‌باشد. در صورتی که در ایران، مطالعات زیادی برای شناسایی مولکولی پاتوتیپ‌های *E. coli* با استفاده از M-PCR صورت نگرفته است که این خود می‌تواند دلیلی بر وجود اختلاف بین نتایج باشد.

نتیجه‌گیری

به نظر می‌رسد که مناطق جغرافیایی و زمان نمونه برداری از بیماران یکی از عوامل تأثیرگذار بر روی میزان جداسازی و شناسایی ژن‌های حدت باکتری /شیریشیاکلی و پاتووار عامل اسهال به‌عنوان ژن‌های هدف می‌تواند مطرح باشد. بررسی و مطالعه بیشتر در این مورد بر روند پیشگیری و اجرای برنامه‌های کنترلی مؤثر می‌باشد.

قدردانی

نگارنده 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 اعلام می‌دارد.

تحقیق بیرنه (Byrne) و همکاران در سال ۲۰۰۳، تعداد ۱۱ سویه همزمان دارای ژن‌های *Stx1*، *eaeA* و *hly* و ۵ سویه واجد ژن‌های *Stx2*، *eaeA* و *hly* و ۳ سویه هم دارای ژن‌های *Stx1*، *Stx2* و *eaeA* بوده‌اند (۱۳). مویو (Moyo) و همکاران در تانزانیا در سال ۲۰۰۷، از روش M-PCR به منظور 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 (*Stx1*، *Stx2*) و EIEC در هیچ‌کدام از نمونه‌ها مشاهده نشد. EAEC تپیک و EPEC تپیک به‌عنوان شایع‌ترین عامل اسهال خونی در کودکان تانزانیا شناسایی گردید (۶). شتی (Shetty) و همکاران در سال ۲۰۱۲ با بررسی میزان فراوانی پاتوتیپ‌های /شیریشیاکلی اسهال‌زا به این نتیجه رسیدند که بیشترین فراوانی DEC مربوط به EPEC آنتیپیکال 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 به منظور 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 *Stx1*، *Stx2* را هدف‌گذاری نموده و به این نتیجه رسیدند که ۱۷ نمونه (۸/۲۵ درصد) واجد ژن‌های *Stx2 + eaeA* بودند (۱۴). به نظر می‌رسد که با توجه به نتایج عبیری و توزیع ژن‌ها و مقایسه آن با نتایج تحقیقات حاضر، مواد غذایی می‌تواند در انتقال /شیریشیاکلی اسهال‌زا به‌خصوص در کودکان نقش مهمی را ایفا نماید. کارگر و همکاران در سال ۱۳۹۰ نیز طی مطالعه‌ای بر روی ژن‌های *Stx1*، *Stx2*، *eaeA* و *hly*،

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 and stx2*), 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 Environ 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 invasive plasmid 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 Jalalvand¹, 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 *stx₁* was not identified in any of the samples. Among the identified genes, the highest frequency of responsible gene was *stx₂* with 12.72% and the lowest was for *IPaH* gene with 1.81%.

Conclusion: Frequency more *Stx₂* 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