Downloaded from hms.gmu.ac.ir at 11:00 +0330 on Sunday February 17th 2019

تشخیص مایکوباکتریوم توبرکلوزیس نوع بیجینگ در نمونه های کشت مثبت بیماران ریوی با روش پی سی آر ترکیبی

حسین گودرزی[1]- سمیه جهانی شرافت[2]- پریسا فرنیا[3]- الناز السادات میرصمدی[4]

چکیده

زمینه و هدف: بیجینگ سویه ای از مایکوباکتریوم توبرکلوزیس است که از مقاومت بالایی نسبت به چند دارو برخوردار بوده و قدرت انتقال بسیار سریعی دارد. روش استاندارد شناسایی سویه های بیجینگ، اسپولیگوتایپینگ است که روشی با حساسیت و اختصاصیت بالاست، ولی نیاز به تجهیزات خاصی دارد که در آزمایشگاه های روتین موجود نمی باشد. از این رو در این مطالعه از یک روش سریع و مقرون به صرفه جهت تعیین این ژنوتایپ استفاده شد تا بتوان از گسترش آن در جامعه جلوگیری کرد.

روش تحقیق: در این مطالعه توصیفی- تحلیلی ابتدا DNA نمونه های کشت مثبت را با استفاده از روش Cetyltrimethyl Ammonium Bromide (CTAB) استخراج نموده و با استفاده از روش اسپولیگوتایپینگ سویه های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس شناسایی گردیدند. سپس بر روی DNA استخراج شده از باکتری، روش پی سی آر ترکیبی (Multiplex Polymerase Chain Reaction) انجام شد.

یافته ها: با استفاده از روش اسپولیگوتایپینگ روی 200 نمونه جداشده مایکوباکتریوم توبرکلوزیس 19 نوع بیجینگ تشخیص داده شد و در روش PCR ترکیبی نیز این نتایج تأیید شد.

نتیجه گیری: با در نظر گرفتن قدرت تمایز یکسان دو روش، آسان تر و اقتصادی تر بودن روش این روش می تواند در آزمایشگاه های روتین مورد استفاده قرار گیرد.

کلید واژه ها: پی سی آر ترکیبی؛ سویه بیجینگ؛ مایکوباکتریوم توبرکلوزیس

افق‌دانش؛ فصلنامه ی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی گناباد (دوره ی16؛ شماره ی2؛ تابستان سال 1389)

دریافت: 1388/10/28 **اصلاح نهایی: 1389/5/31** **پذیرش: 1389/6/11**

1- دکتری میکروبیولوژی پزشکی، گروه میکروب شناسی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

2- **نویسنده ی مسؤول؛** کارشناس ارشد، میکروبیولوژی پزشکی، گروه میکروب شناسی، مرکز تحقیقات مایکوباکتریولوژی، بیمارستان مسیح دانشوری، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

آدرس: تهران - اوین- خیابان تابناک - دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

تلفن: 022432518-021 نمابر: 022432518-021 پست الکترونیکی: jahani_somayeh@yahoo.com

3- دکتری میکروبیولوژی پزشکی، بیمارستان مسیح دانشوری، مرکز تحقیقات مایکوباکتریولوژی

4- کارشناس ارشد میکروبیولوژی پزشکی، گروه میکروب شناسی، مرکز تحقیقات مایکوباکتریولوژی، بیمارستان مسیح دانشوری، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

Downloaded from hms.gmu.ac.ir at 11:00 +0330 on Sunday February 17th 2019

مقدمه

بیماری سل ناشی از باکتری مایکوباکتریوم توبرکلوزیس[1] هنوز به عنوان یک مشکل بزرگ در جهان باقی مانده است و هر سال 9-8 میلیون نفر به عفونت فعال سل مبتلا گشته و در نهایت 3-2/5 میلیون مرگ در سال به دلیل ابتلا به این بیماری رخ می دهد. این مشکل در اغلب کشورهای دنیا وجود دارد و البته در کشورهای در حال توسعه بیشتر دیده می شود به طوری که 95 درصد مبتلایان و 98 درصد مرگ های مرتبط با این بیماری در این کشورها رخ می دهد (1,2).

از سال 1980 به بعد افزایش شدیدی در سویه های مقاوم به درمان در تمامی جهان مشاهده شد. مقاومت به یک دارو از سالها قبل شناخته شده بود ولی با افزایش شدید مقاومت ها متاسفانه تعداد زیادی از این مقاومت ها به صورت مقاومت چند دارویی[2] (حداقل مقاومت به دو داروی خط اول بیماری سل یعنی ریفامپین و ایزونیازید) مشاهده شده است (3). میزان بروز سل مقاوم به چند دارو به سرعت در حال افزایش است و بروز تخمینی آن در کل جهان 460000 مورد در سال 2005 گزارش شده است (4). میزان شیوع سل مقاوم به چند دارو در بسیاری از کشورهای در حال توسعه به دلیل کمبود امکانات آزمایشگاهی و تشخیصی مناسب کمتر از میزان واقعی تخمین زده می‌شود (4).

برخی از سویه های این باکتری به همین دلیل بیشتر مورد توجه قرار گرفته اند. از جمله این سویه ها می توان به سویه بیجینگ[3] اشاره نمود. در سالهای اخیر این سویه از MTB به دلیل قدرت انتقال بالا و MDR بودن بسیار مطرح شده است، این سویه برای اولین بار در سال 1995در چین و کشورهای همسایه آن شناسایی شد (5). شیوع بالای آن در آسیا به خصوص آسیای شرقی گزارش شده است. اما گزارشات به دست آمده حاکی از آن است که شیوع این سویه در روسیه و اروپا و آمریکا دارای درصدهای مختلفی است (5,6). در ایران 7/1 درصد MTB های جدا شده از بیماران ریوی در سال 2005 به عنوان سویه بیجینگ گزارش شده است (7).

روشهای مختلفی برای شناسایی و جداسازی این سویه وجود دارد که متداولترین روش RFLP[4] و اسپولیگوتایپینگ[5] است (8,9). روش RFLP بر پایه آنالیز توالی دخولی IS6110 بنا شده است، ولی روش اسپولیگوتایپینگ برپایه PCR[6] است با این تفاوت که روش های مبتنی بر PCR در کل سریعتر از RFLP هستند ولی حد تفکیک پایین تری دارند. اسپولیگوتایپینگ بر اساس پلی مورفیسم لوکوس کروموزومی DR[7] (توالی تکراری مستقیم) 36 جفت بازی است که به یک یا دو توالی فاصله انداز 41-35 جفت بازی متصل می باشد. بر اساس وجود یا فقدان این توالی ها می توان تمام سویه های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس را از هم متمایز کرد. سویه های بیجینگ فاقد توالی فاصله انداز 34-1 هستند و فقط دارای توالی فاصله انداز 43-35 می باشند (10).

اسپولیگوتایپینگ یک استاندارد طلایی برای شناسایی و طبقه بندی سویه های نوع بیجینگ به شمار می رود (6) ولی نیاز به تجهیزات خاصی دارد که در تعداد معدودی از آزمایشگاه ها وجود دارد. روشی که ما بررسی کردیم روش PCR ترکیبی است که روشی ساده، ارزان و سریع برای جداسازی سویه های بیجینگ از غیر بیجینگ است.

روش تحقیق

مطالعه حاضر از نوع توصیفی- تحلیلی می باشد و نتایج به دست آمده از مقاومت دارویی با آزمون فیشر و با نرم افزار SPSS نسخه 13 و تحلیل اسپولیگوتایپینگ با استفاده از اطلاعات بانک جهانی اسپولیگوتایپینگ (SpolBD4) انجام شد. در این مطالعه جداسازی اولیهٔ سویه های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس از نمونه های بیماران مراجعه کننده به آزمایشگاه رفرانس کشوری با روش پتروف 4 درصد و با استفاده از محیط (Lowensten Jensen Lj) انجام شد و برای شناسایی سویه ها از تست های بیوشیمیایی از قبیل تستهای نیاسین، فعالیت کاتالاز، احیاء نیترات استفاده گردید. حساسیت دارویی به ایزونیازید (0/2 ?g/ml)،

1- Mycobacterium Tuberculosis (MTB)
2- Multi Drug Resistant (MDR)
3- Beijing
4- Restriction Fragment Length Polymorphisms (RLFP)
5- Spoligotyping
6- Polymerase Chain Reactin
7- Direct Repeat

Downloaded from hms.gmu.ac.ir at 11:00 +0330 on Sunday February 17th 2019

ریفامپین (40?g/ml) و استریتومایسین (10?g/ml) و اتامبوتول (2?g/ml) به روش تناسبی (Proportion Method) بررسی گردید. براساس تست های حساسیت آنتی بیوتیکی سویه ها به سه گروه حساس، مقاومت چند دارویی (MDR) و مقاومت به یک داروی (غیر MDR) تقسیم بندی شدند. سپس DNA کلنی های کشت مثبت به روش CTAB (N استیل NNN-تری متیل آمونیوم برماید) استخراج شدند.

روش اسپولیگوتایپینگ: این روش بر پایه تکثیر منطقه ای به نام DR به وسیلهٔ PCR است که پس از هیبدریداسیون محصولات PCR با غشاء حاوی الیگونوکلئوتیدهای مکمل مناطق فاصله دهنده که در بین مناطق DR وجود دارد انجام می شود. با انجام این روش سویه های متفاوت از یکدیگر متمایز گردیدند.

PCR ترکیبی: سه جفت پرایمر برای تشخیص سویه های بیجینگ از غیر بیجینگ به کار برده شد که توالی پرایمرها در جدول شماره 1 آمده است. از سه جفت پرایمر ذکر شده به صورت ترکیبی در روش PCR ترکیبی استفاده گردید.

جدول 1: توالی پرایمرها

نام پرایمر	توالی پرایمرها ('5-'3)	سایز محصول PCR
BjF BjR	CTCGFCAGCTTCCTCGAT)) ((CGAACTCGAGGCTGCCTAACTAC	129 bp
nBjF nBjR	(AAGCATTCCCTTGACAGTCGAA) (GGCGCATGACTCGAAAGAGAAG)	105 bp
IS59 IS60	(GCGCCAGGCGCAGGTCGATGC) (GATCAGCGATCGTGGTTCCTGC)	523 bp

ایجاد باند bp 523 نشان دهنده نمونه های مثبت از نظر MTB است. علاوه بر باند کنترل bp 523، وجود باند اختصاصی bp 129 نشان دهنده سویه های بیجینگ و باند bp 105 نشان دهنده سویه های غیر بیجینگ است.

واکنش PCR در غلظت کلی 25 میکرولیتر با مقادیر زیر آماده گردید: dNTP µL 0/75، MgCL2 µL 0/5، 1 واحد آنزیم Taq polymerase، از هر پرایمر µL 2، DNA الگو µL 1/5 و µL 2/5 بافرو و آب مقطر µL 13/55 بود.

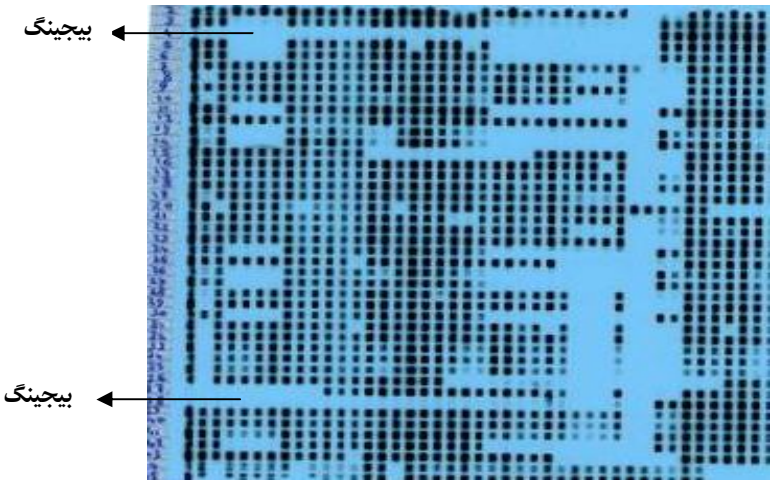
سپس برنامه حرارتی زمانی زیر برای تکثیر قطعات به کار برده شد: ?96 به مدت 5 دقیقه، 35 سیکل?96 به مدت 30 ثانیه،?58 به مدت 20 ثانیه،?72 به مدت 60 ثانیه و مرحله آخر ?72 به مدت 7 دقیقه.

محصول PCR بر روی ژل پلی اکریل آمید 8 درصد برده شد و از مارکر (ladder) bp 50 استفاده گردید.

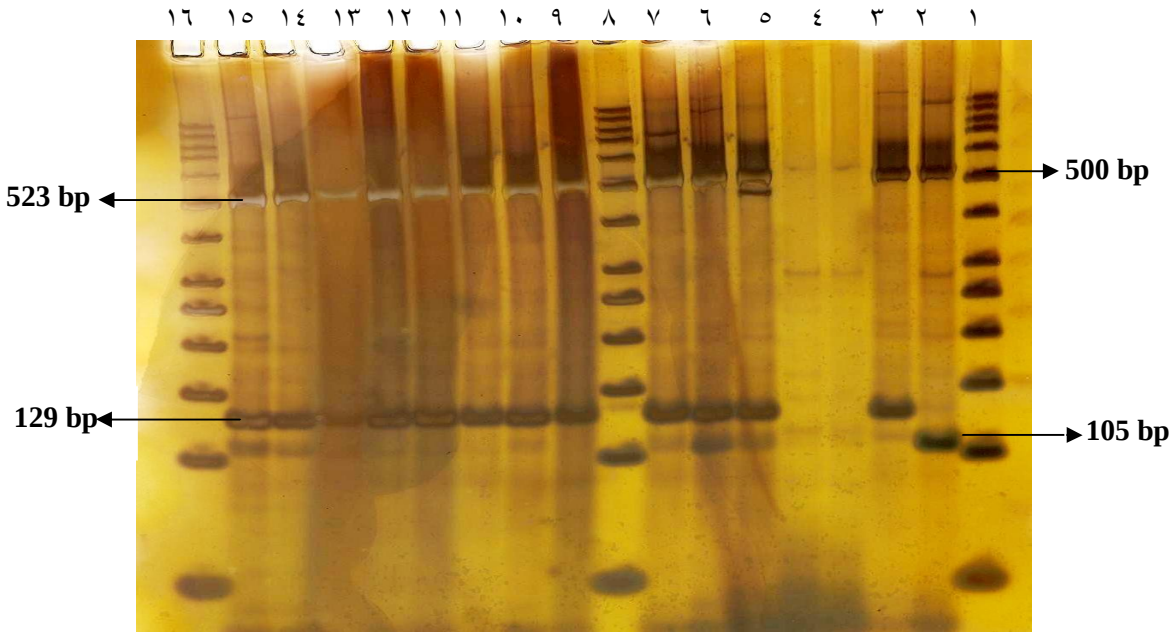
یافته ها

با استفاده از روش اسپولیگوتایپینگ بر روی 200 نمونه جداشده مایکوباکتریوم توبرکلوزیس (9/5 درصد) 19 سویه بیجینگ تشخیص داده شدند و 181 (90/5 درصد) ایزوله متعلق به سویه های غیر بیجینگ بودند (شکل 1). براساس تست های حساسیت آنتی بیوتیکی سویه ها به سه گروه حساس، MDR و غیر MDR تقسیم بندی شدند. 53 درصد از سویه های بیجینگ، MDR گزارش شدند و فقط 10 درصد از سویه های غیر بیجینگ مقاومت به دو داروی ریفامپین و ایزونیازید را نشان دادند. در روش PCR ترکیبی تمام سویه ها باند bp 523 را ایجاد نمودند. 19 نمونه باند bp 129 را نشان دادند که به عنوان سویه بیجینگ شناخته شدند. 181 ایزوله غیر بیجینگ باند bp 105را ایجاد نمودند. با توجه به این نتایج حساسیت و اختصاصی بودن روش PCR ترکیبی صد درصد مطابق نتایج روش اسپولیگوتایپینگ بود (شکل 2).

Downloaded from hms.gmu.ac.ir at 11:00 +0330 on Sunday February 17th 2019



شکل1: جداسازی سویه های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس کمپلکس با روش اسپولیگوتایپینگ (سویه بیجینگ مطابق شکل فاقد توالی فاصله انداز 34-1می باشد).



شکل 2: PCR ترکیبی بر روی ژل پلی اکریل آمید 8

* خط 1 و 10 و 18 مارکر، خط 2 تا 9 و 11 تا 16 نمونه بیجینگ، خط 17 نمونه غیر بیجینگ، خط 14 و 15 کمبود DNA نمونه (مارکر 50 bp خریداری شده از شرکت سیناژن).

بحث

مایکوباکتریوم توبرکلوزیس همچنان به عنوان شایعترین علت مرگهای مرتبط با عوامل بیماریزای عفونی در جهان شناخته می شود و از طرفی مقاومت های چند دارویی به علت کمبود امکانات آزمایشگاهی و تشخیصی مناسب و عدم درمان صحیح در کشورهای در حال توسعه، که بالاترین میزان آلودگی را دارا هستند، رو به افزایش است (۱،۲). با در نظر گرفتن این نکته که سویه های بیجینگ مایکوباکتریوم توبرکلوزیس دارای میزان بالاتری از مقاومت های چند دارویی نسبت به سویه های دیگر می باشند ضرورت تشخیص سریع و آسان آنها نمایان می گردد (3). نتایج حاصل از بررسی حساسیت دارویی که در این مطالعه انجام

Downloaded from hms.gmu.ac.ir at 11:00 +0330 on Sunday February 17th 2019

شد خود تأکیدی براین مطلب بود که مقاومت های چند دارویی در سویه های بیجنگ نسبت به سویه های غیر بیجینگ بسیار بالاتر است و لزوم شناسایی سریع این سویه را نسبت به سویه های دیگر مایکوباکتریوم توبرکلوزیس محرز می سازد. از طرفی روش های مختلفی برای بررسی های اپیدمیولوژیک مایکوباکتریوم توبرکلوزیس وجود دارد که البته به دلیل سرعت بالای انتشار این سویه، سریع و آسان بودن این روشها بسیار مهم است. به طور کلی می توان روشهای تشخیصی را به دو دسته تقسیم کرد. گروه اول روشهای غیر از PCR و گروه دوم روشهایی است که بر پایه PCR بنا شده اند. از جمله روشهای غیر وابسته به PCR روشIS6110 RFLP است. این روش بر پایهٔ آنالیز موتاسیون دخولی IS6110 است. از معایب این روش زمان بر بودن و نیاز به تکنیک های خاص و اختصاصی و قابلیت استفاده در ایزوله هایی که حداقل بیش از 5 سکانس IS6110 در ژنوم خود دارند، است. در صورتی که 20 درصد از ایزوله های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس در برخی از جمعیت ها دارای تعداد کمتر از 5 سکانس IS6110 در ژنوم خود هستند (5). روش PGRS[1] نیز برای تایید هویت سویه‌های با الگوهای یکسان با استفاده از روش RFLP و یا سویه‌های حاوی تعداد کم کپی IS6110 بکار می‌رود. تعداد زیاد باندهای بدست آمده با این تکنیک تفسیر ژلها را مشکل می‌کند که همین امر باعث محدودیت در بکار بردن این روش به عنوان روش تایپینگ اولیه می‌شود (11).

از دسته دوم که براساس PCR می باشد روش VNTR[۲] است که در این روش توالی های DNA با طول ≤ 45 جفت باز و تشابهی در حدود ≤95 که حداقل 2 کپی از آنها در طول 200 جفت باز قرار داشته باشد، شناسایی شدند که این لوکوس ها را توالی های تکرار شونده پشت سر هم (VNTR) نامیدند. تایپینگ سویه های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس در این روش براساس PCR و پلی مرفیسم در لوکوسهای متفاوت می باشد که نتیجه آن به صورت یک کد عددی بیان می شود و از آنجایی که تفسیر نتایج به صورت کد تا حدودی پیچیده است این روش نمی تواند به صورت کاربردی در همه آزمایشگاه ها به کار رود (12).

روش دیگر، روش Koksalan بود. او سویه های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس نوع بیجینگ را با روشی به نام MIRU بر مبنای PCR لوکوس 26 جداسازی کرد (13,14). این روش دارای حساسیت و اختصاصیت پایین است زیرا برخی از انواع غیر بیجینگ نیز دارای این توالی تکراری هستند و همچنین برخی از سویه های بیجینگ نیز فاقد این توالی تکراری می باشند (15).

روش کار شده دیگر روش Real-Time PCR است که به صورت ترکیبی انجام شده است. این روش دارای اختصاصی بودن و حساسیت 100 درصد است. تنها عیب این روش نیاز به دستگاه و تجهیزات خاص، صرف هزینه بالا و قابل انجام در تعداد محدودی از آزمایشگاه های پیشرفته است (16). روشی که ما بررسی کردیم از همان پرایمرهای Real-Time PCR استفاده شد. ولی در روشی ساده تر به صورت ترکیبی PCR، پرایمرهای IS60 و IS59 طی PCR محصولی با اندازه 523 bp را تولید می کنند، که قطعه ای از ناحیه توالی IS6110 می باشد و این قطعه 523 bp در تمام سویه های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس وجود دارد و از آن می توان برای اطمینان از TB بودن ایزوله های بدست آمده استفاده نمود. همچنین از این قطعه (523 bp) به عنوان یک کنترل داخلی در PCR استفاده می شود تا از صحت مراحل انجام شده اطمینان حاصل گردد. در نتیجه می توان این نکته را به عنوان یک مزیت برای این روش در نظر گرفت. پرایمرهای ست دوم nBjF و nBjR قسمتی از ژن RV2819 است که در سویه های غیر بیجینگ تولید می شود و این قطعه از ژنوم مایکوباکتریوم توبرکلوزیس در سویه های بیجینگ حذف شده است. در نتیجه این اطمینان حاصل می شود که سویه های بیجنگ قادر به تولید این باند نمی باشند و سویه های تولید کننده آن حتما غیر بیجینگ هستند. پرایمر BjF و BjR شامل انتهای '3 IS6110 و انتهای '5 ژن RV 2820 است، که مختص سویه های بیجینگ است. با در نظر گرفتن اختصاصی بودن پرایمرهای به کار برده در این روش و با توجه به اینکه روش مورد مطالعه

1- Polymorphic GC-Rich Sequence
2- Variable Number of Tandem Repeats

ساده، ارزان و قابل انجام در آزمایشگاههای کلینیکی و با امکانات کم می باشد می تواند به طور گسترده در تشخیص سویه های بیجینگ به کار گرفته شود.

نتیجه گیری

با توجه به نتیجه به دست آمده، روش PCR ترکیبی روش ساده، ارزان و قابل انجام در آزمایشگاه های کلینیکی و با امکانات کم و دارای حساسیت و اختصاصیت صددرصد است و می تواند برای غربالگری سویه های بیجینگ از غیر بیجینگ مورد استفاده قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

از همکاری صمیمانه مرکز تحقیقات مایکوباکتریولوژی، آزمایشگاه رفرانس سل کشوری واقع در بیمارستان مسیح دانشوری و دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی که در این راه صمیمانه ما را یاری نمودند، قدردانی می شود.

References:

1- CDC. Center for disease control and prevention. Estimated of future global tuberculosis. MMWR Morb Mortal Wkly Rep1993; 42-49.

2- Dolin PJ, Raviglione MC, Kochi A. A review of current epidemiologicaldata and estimationsof current and future incidence and mortality from tuberculosis. Tuberculosis program. Geneva: WHO, 1993.

3- JIAO Wei-wei, Mokrousov Igor, SUN Gui-zhi, LI Mo, LIU Jia-wen, Narvskaya Olga, SHEN A-dongChin. Molecular characteristics of rifampin and isoniazid resistant Mycobacterium tuberculosis strains from Beijing. ChinaChin Med J 2007; 120(9): 814-819.

4- Zignol M, Wright A, Jaramillo E, Nunn P, Raviglione MC. Patients with previously treated tuberculosis no longer neglected. Clin infec Dis 2007; 44: 61-64.

5- Van Soolingen D, Qian L, de Haas PE, Douglas JT, Traore H, Portaels F, et al. Predominance of a single genotype of Mycobacterium tuberculosis in countries of east Asia. J Clin Microbiol 1995; 33(12): 3234–3238.

6- Sun J-R, Lee S-Y, H-Y, Dou J-J, et al. Using a multiplex polymerase chain reaction for the identification of Beijing strains of Mycobacterium tuberculosis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2009; 28:105–107.

7- Rohani M, Farnia P, Naderi Nasab M, Moniri R, Torfeh M, Amiri MM. Beijing genotype and other predominant Mycobacterium tuberculosis spoligotypes observed in Mashhad city, Iran. Ind J Med Microbiol 2007; 27(4): 306-310.

8- Kanduma E, McHugh TD, Gillespie SH. Molecular methods for Mycobacterium tuberculosis strain typing: a user guide. J Appl Microbiol 2003; 94:781–91.

9- Mokrousov I, Jiao WW, Valcheva V, Vyazovaya A, Otten T, Ly HM, et al. Rapid detection of the Mycobacterium tuberculosis Beijing genotype and its ancient and modern sublineages by IS6110-based inverse PCR. J Clin Microbiol 2006; 44 (8): 2851–2856.

10- Kamerbeek J. Simultaneous detection and strain differention of M.tuberculosis for diagnosis and epidemiology. J clin Microbiol 1997; (35:4): 907– 914.

11- Dellagi CD, Abderrahman A. Large – scale DNA fingerprinting of M. tuberculosis strains as a tool for epidemiological studies of tuberculosis. J clin Microbiol 1993; 31(9): 2156 – 2170.

12- Fillol I, Ferdinan S, Negroni L. Molecular typing of Mycobacterium tuberculosis based on variable namber of tandem DNA repeata used alone and in association with spoligotyping. J Clin microbial. 2000; 38(7): 2520-4.

13- Koksalan OK. Use of mycobacterial interspersed repetitive unit locus 26 for rapid identification of Beijing genotype Mycobacterium tuberculosis strains. J Clin Microbiol 2006; 44(4): 1612; author reply 1612–1613.

14- Rao KR, Ahmed N, Srinivas S, Sechi LA, Hasnain SE. Rapid identification of Mycobacterium tuberculosis Beijing genotypes on the basis of the mycobacterial interspersed repetitive unit locus 26 signature. J Clin Microbiol 2006; 44(1): 274–277.

15- Chin PJ, Chiu CC, Jou R. Identification of Beijing lineage Mycobacterium tuberculosis with combined mycobacterial interspersed repetitive unit loci 26, 31, and ETR-A. J Clin Microbiol 2007 45(3): 1022–1023.

16- Hillemann D, Warren R, Kubica T, Rüsch-Gerdes S, Niemann S Rapid detection of Mycobacterium tuberculosis Beijing genotype strains by real-time PCR. J Clin Microbiol 2006; 44(2): 302– 306.

Downloaded from hms.gmu.ac.ir at 11:00 +0330 on Sunday February 17th 2019

Downloaded from hms.gmu.ac.ir at 11:00 +0330 on Sunday February 17th 2019

Identification of Beijing Strains of Mycobacterium Tuberculosis in Pulmonary Tuberculosis Patients with Culture Positive Specimens Using Multiplex PCR Method

Hossein Goudarzi [1], Somayeh Jahani Sherafat[2], Parisa Farnia[3] and Elnaz Sadat Mirsamadi[4]

Abstract

Background and Aim: The genotype of Beijing strain of Mycobacterium tuberculosis has attracted special attention due to the association with multi drug resistance and rapid transmission although spoligotyping is the gold standard for the identification and classification of Beijing strains of MTB. This technique, however, is needed to apply special equipments that do not exist in clinical laboratory. Therefore, in this study we used a fast and cost-effective method for detection of this genotype to prevent its spread in the community.

Materials and Methods: CTAB method was used to extract DNA from positive culture specimens in tuberculosis patients. Next, with spoligotyping, we determined different strains of MTB, and then we used multiplex PCR with 3 sets of PCR primers.

Result: A total of 200 MTB isolates were genotyped by both spoligotyping and multiplex PCR of which19 isolates were determined to be Beijing strains and the remaining (181) isolates were non-Beijing strains. The multiplex PCR method indicated the same result.

Conclusion: Considering the same detection power of two methods to distinguish Beijing strain and higher cost-effectiveness in comparison to spoligotyping, multiplex PCR can be used in clinical laboratory settings.

Keywords: Beijing strain, multiplex PCR, mycobacterium tuberculosis

Ofogh-e-Danesh. GMUHS Journal. 2010; Vol. 16, No. 3

[1]- PhD in Microbiology, Department of Microbiology, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

[2]- **Corresponding Author:** MSc., in Microbiology, Department of Microbiology, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

Tel: +98 21 22432518 **Fax:** +98 21 22432518 **E-mail:** jahani_somayeh@yahoo.com

[3]- PhD in Microbiology, Micobacteriology Research Center, Masihdaneshvary Hospital, Tehran, Iran

[4]- MSc., in Microbiology, Department of Microbiology, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran