مقاله اصلی

نفس، سال ۷، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۹، صفحات ۲۲ تا ۲۹

بررسی ژن DosT در بیماران مبتلا به مایکوباکتریوم توبرکلوزیس

فائزه حمیدیه[۱]، پریسا فرنیا[۲*]، جمیله نوروزی[۱]، پوپک فرنیا[۲و۳]، علی اکبر ولایتی[۲]

۱) گروه میکروب شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، تهران، ایران

۲) مرکز تحقیقات مایکوباکتریولوژی، پژوهشکده سل و بیماری‌های ریوی، مرکز آموزشی، پژوهشی و درمانی سل و بیماری‌های ریوی بیمارستان دکتر مسیح دانشوری، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی، تهران، ایران

۳) گروه بیوتکنولوژی، دانشکده فن‌آوری‌های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

چکیده:

مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، پاتوژنی است که توانایی ایجاد بیماری سل در میزبان را دارد. اگرچه مایکوباکتریوم توبرکلوزیس به عنوان قدیمی‌ترین باکتری در انسان شناخته می‌شود، اما هم‌چنان بیماری کشنده در سراسر جهان است. مایکوباکتریوم توبرکلوزیس می‌تواند برای دهه‌ها در بدن انسان زنده بماند و هیچ علامتی نداشته باشد. با این حال، ممکن است در افراد دارای نقص سیستم ایمنی یا افرادی که بیماری‌هایی مانند دیابت، ایدز یا سوء تغذیه دارند فعال شده و منجر به بیماری سل شود. هدف از این مطالعه، بررسی ژن dosT در بیماران مبتلا به مایکوباکتریوم توبرکلوزیس می‌باشد.

حضور ژن dosT در بیماران مبتلا به مایکوباکتریوم توبرکلوزیس با PCR مشخص شد و با روش‌های آماری فراوانی حضور این ژن در نمونه‌های حساس و مقاوم مایکوباکتریوم توبرکلوزیس تجزیه و تحلیل شد.

ژن dosT در تمامی بیماران مبتلا به مایکوباکتریوم توبرکلوزیس با تکنیک PCR شناسایی شد (۲۱۹ bp).

فراوانی ژن dosT در ایزوله‌های بیماران مبتلا به مایکوباکتریوم توبرکلوزیس تعیین شد (۹۴/۳ درصد)

درصد حضور ژن dosT دربیماران مبتلا به مایکوباکتریوم توبرکلوزیس حساس و مقاوم مشخص شد (در بیماران مبتلا به توبرکلوزیس حساس ۷۸/۸ درصد و مقاوم ۲۱/۲ درصد)

حضور ژن dosT تقریبا درتمامی بیماران مبتلا به مایکوباکتریوم توبرکلوزیس مشخص شد و نشان داده شد این ژن در ایزوله‌های حساس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس فراوانی بیشتری را دارد.

واژگان کلیدی: مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، سل، ژن DosT، PCR

* **نویسنده مسئول:**

دکتر پریسا فرنیا، مرکز تحقیقات مایکوباکتریولوژی، پژوهشکده سل و بیماریهای ریوی، بیمارستان دکترمسیح دانشوری، دارآباد، تهران، ایران،

پست الکترونیک: pfarnia@hotmail.com

مقدمه:

سل بیماری عفونی است که بوسیله *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس*[1] ایجاد میشود و به طور مشخص بیماری سل، ریه ها را در گیر میکند اما میتواند به مناطق دیگر بدن نیز آسیب برساند . این بیماری با استنشاق و تنفس هوایی که آغشته به باکتری بوده منتقل میشود و مخزن این بیماری در افراد مبتلا به سل میباشد که بوسیله سرفه کردن باکتری را وارد هوای تنفسی میکنند . از ۳-۲ میلیون جمعیت انسانی حدود ۱۵-۵ درصد آنها آلوده به *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* بوده و بیماری را در سرتا سر زندگی خود گسترش می دهند ، همچنین احتمال ابتلا به این بیماری در افراد مبتلا به ایدز[2] بیشتر میباشد (۱،۲).

کنترل بیماری سل در سطح جهانی امری بسیار سخت و دشوار است و این امر ناشی از توانایی باکتری در ایجاد بیماری به فرم نهفته و خاموش در انسان است چنانچه تخمین زده می شود حدود دو بیلیون از مردم به صورت نهفته آلوده به *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* هستند که خود به عنوان عامل ایجاد بیماری توبر کلوزیس محسوب میشود (۳) . در شرایط نامساعد رشد ، باکتری به فاز نهفته[3] میرود که در این حالت فعالیت متابولیکی آن به شدت کاهش پیدا میکند ، باکتری در برابر فاکتورهای مضر بشدت مقاومت میکند و تقسیم نمیشود (۴). رگولون dosR باعث ماندگاری *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* در شرایط خفتگی می شود . این رگولون به طور گسترده ای میان ژنوم مایکوباکتریوم توزیع شده است و با دو سیستم رگولاتور از جمله ژن dosT تنظیم میشود. dosT در پاسخ به کاهش اکسیژن ، حساس و قوی است و با فسفریله کردن dosR منجر به فعال شدن آن میشود (۵). امروزه برآورد می شود بیشتر از یک سوم جمعیت جهان به عفونت سل نهفته مبتلا میباشند که ۲۳-۲ در صد آنها در طول این دوره به سل فعال مبتلا می شوند (۶). برای افراد عواقب متفاوت در مواجهه با باسیل *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* وجود دارد به این صورت که ۱- ممکن است باسیل فورا بوسیله پاسخ ایمنی ذاتی فرد تخریب شود ۲- باکتری برای ۳-۱ سال باقی میماند و عامل فعال شدن سل در فضای محدود میشود ۳- یا آنکه میتواند بصورت خفته برای سالها بدون علائم باقی بماند و عفونت سل نهفته ایجاد کند . لازم بذکر است افراد مبتلا به سل نهفته بیمار نمی شوند و باکتری را به افراد دیگر انتقال نمی دهند (۷). در این مطالعه ، ما حضور ژن[4] dosT را در بیماران مبتلا به سل ریوی بررسی و تجزیه و تحلیل کردیم.

مواد و روش:

این مطالعه از نوع مقطعی بوده و در مرکز تحقیقات مایکوباکتریولوژی بیمارستان مسیح دانشوری تهران انجام شد . در ابتدا ۳۵ نمونه خلط، از بیماران مسلول مراجعه کننده به بیمارستان مسیح دانشوری طی سالهای ۹۹-۹۸ جمع آوری گردید . ابتدا نمونه های مایکوباکتریوم از نظر میکروسکوپی بررسی شدند به اینصورت که پس از تهیه نمونه مورد نظر، یک گسترش از آن بر روی یک لام شیشه ای تهیه شد و نمونه برای فیکس کردن درون دستگاه فور به مدت یک ساعت در دمای ۸۵ درجه سانتی گراد قرار داده شد. سپس رنگ فوشین بروی لام اضافه شد و به مدت ۵ دقیقه طوری حرارت داده شد تا رنگ خشک نشود .سطح لام با آب شستشو داده شد وبرای رنگبری روی اسلاید، اسید الکل اضافه و اسمیر مجددا با آب شستشو داده شد و متعاقبا خشک گردید.سپس سطح لام با محلول متیلن بلو آغشته گردید .پس از سپری شدن یک تا دو دقیقه، اسمیر مجددا با آب شستشو داده شد و در نهایت، لام با بزرگنمایی 100X با استفاده از روغن ایمرسیون مشاهده شد .برای بررسی میکروسکوپی به صورت تقریبی 100 میدان میکروسکوپی به دقت مورد ارزیابی قرار گرفت. در مرحله بعد نمونه های مایکوباکتریوم کشت داده شدند به اینصورت که جهت از بین بردن بقایای مواد آلی و فلور نرمال نمونه، ابتدا نمونه با روش آلودگی زدایی هیدروکسید سدیم (سود) تیمار شد. برای انجام این روش ابتدا برای تهیه محلول استریل سود ۴ درصد، ۱۰گرم از هیدروکسید سدیم را در ۲۵۰ میلیتر آب مقطر

[1] *Mycobacterium tuberculosis*
[2] HIV
[3] Latent
[4] Gene

جدول ۱ - پرایمر استفاده شده جهت شناسایی ژن DosT

Primer	Oligonucleotide	Sequence (5´–3´)	length (bp)	PCR reaction conditions
DosT-F	dosT 2027 C	CACAAGCGCCGACTGTC	219	94°C 300s (94°C 30s-55.1°C 30s-72°C 30s) ×40, 72°C 600s
DosT-R		TTGACCCGCGCGTACAC		

استریل به خوبی حل نموده سپس نمونه طبق مراحل زیر فرآوری گردید:

۱- انتقال ۴ تا ۵ میلی لیتر از خلط به لوله فالکون و اضافه کردن دو برابر حجم از محلول استریل سود ۴ درصد

۲- سفت کردن درب لوله های فالکون و هم زدن کامل آن به طوری که اطمینان حاصل شد سود با تمام قسمتها برخورد داشته است.

۳– لوله ها در دمای اتاق به مدت ۱۵ دقیقه نگاه داشته شدند.

۴- سپس لوله ها با دور ۲۰۰۰ xg به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند.

۵– لوله های فالکون بدون تکان خوردن، به دقت از سانتریفیوژ برداشته شدند و مایع رویی به آرامی به یک ظرف حاوی فنل ۵ درصد انتقال داده شد وسپس دور ریخته شد.

۶- با استفاده از اسید کلریدریک ۱ نرمال و محلول شناساگر فنل رد، نمونه ها خنثی شدند.

۷- با استفاده از سرسمپلر استریل، مقدار ۰/۲ میلی لیتر از رسوب بر روی محیط لون اشتاین - جنسن [1] تلقیح گردید.

۸- محیطهای لون اشتاین - جنسن در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شدند.

۹- رشد باسیل به طور هفتگی بررسی شد.

سپس الکترفورز DNA انجام شد ، الکتروفورز یکی از پرکاربردترین تکنیکها در بیولوژی مولکولی است که اساس آن بسیار ساده است . در واقع حرکت ذرات تحت تأثیر میدان الکتریکی را الکتروفورز گویند .

با استفاده از الکتروفورز [2] ژل، میتوان وجود و اندازه محصولات PCR را تعیین نمود .در این تکنیک، مولکولهای DNA براساس بار و وزن مولکولی تفکیک میگردند. در مرحله بعد ، جهت تشخیص گونه های کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس از روش PCR-IS6110 استفاده شد در این روش، پس از تهیه مخلوط PCR و پایان مراحل کاردستگاه ترموسایکلر ، محصولات PCR برروی ژل آگارز ۱/۵درصد برده شد. پس از گذشت مدت زمان لازم، ژل از نظر وجود باند 190 bp مورد بررسی قرار گرفت ، وجود باند 190 bp نشانگر وجود باکتریهای کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس در نمونه مورد نظر بود (۸) . سپس تعیین حساسیت دارویی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس کمپلکس تعیین گردید و نمونه های حساس ، MDR، XDR [3] [4] و TDR [5] جدا شدند .

در مرحله بعد از تعیین مقاومت، بررسی روی ۳۵ نمونه بیمار مبتلا به سل انجام شد ، با طراحی پرایمر جهت ژن *dosT* (جدول ۱) با استفاده از PCR قطعه ژنی مورد نظر (*dosT*) تکثیر و محصول PCR ،الکتروفورز شد و با مشاهده باندهای 219 bp ، وجود ژن مورد نظر اثبات شد و در انتها مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت (۹).

یافته‌ها:

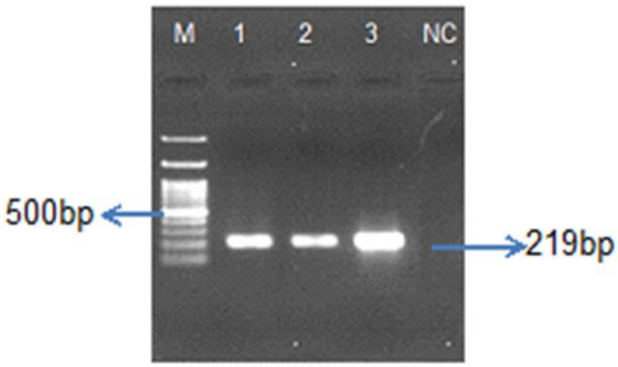
۱. نتیجه حاصل از PCR ژن *dosT*

حضور ژن *dosT* با PCR نشان داده و اندازه ۲۱۹ bp را نشان داد (شکل ۱).

۲. نتایج فراوانی حضور ژن *dosT* د ر بیماران

[1] Löwenstein-Jensen medium

[2] Electrophoresis
[3] Multidrug resistance
[4] Extensively drug resistant
[5] Totally drug-resistant



شکل ۱ - محصول PCR ژن dosT

ستون M : مارکر وزن مولکولی(100 bp)
ستون ۳-۱ : ژن dosT
ستون۴ : کنترل منفی

نتایج حاصل نشان داد که ژن *dosT* د ر بیماران در بیماران مبتلا به *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* شایع تر (۹۴/۳٪) می‌باشند (جدول ۲، نمودار ۲) .

۳. نتایج فراوانی ژن *dosT* و نوع مقاومت یا حساسیت در بیماران

نتایج حاصل از بررسی توزیع ژن *dosT* در میان ایزوله های حساس ،MDR، XDR و TDR نشان داد که این ژن در نمونه های فعال بیشتر در ایزوله های حساس (S) یافت می شود (جدول ۳، نمودار ۳).

بحث:

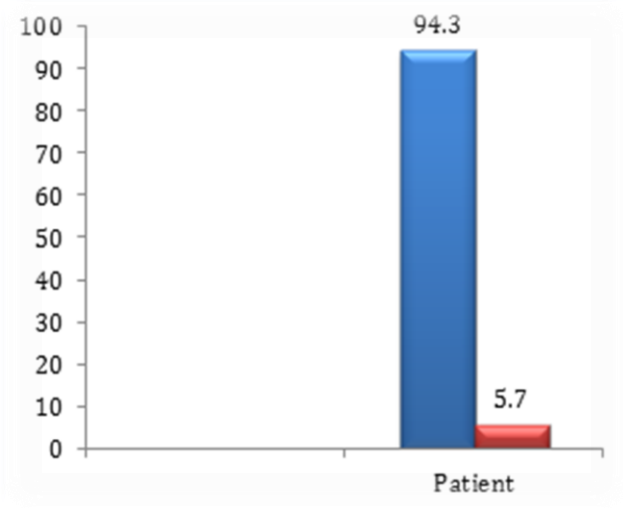
از زمانی که باسیل سل توسط رابرت کخ کشف شده ، این ارگانیسم هنوز هم برزندگی بشر تاثیر گذار است (۱۰) *مایکوباکتریم توبرکلوزیس* (Mtb) باعث ایجاد بیماری سل می‌شود و در سراسر جهان یک عامل عفونی مهم در ایجاد مرگ و میر در بزرگسالان است (۱۱). تخمین زده می شود که بیش از ۱/۷ میلیارد نفر (حدود ۲۵ درصد از جمعیت جهان) آلوده به Mtb باشند (۱۲). بروز جهانی سل در حدود سال ۲۰۰۳ به اوج خود رسید و به نظر می‌رسد به آرامی در حال کاهش است. طبق گزارش سازمان بهداشت جهانی (WHO [1])، در سال ۲۰۱۸، ۱۰ میلیون نفر مبتلا به سل شدند و ۱/۵ میلیون نفر نیز درگذشتند (۱۱) اپیدمیولوژی سل در سطح جهان مختلف می‌باشد. بالاترین میزان سل (۱۰۰ مورد یا بالاتر در هر ۱۰۰ هزار نفر)، در جنوب صحرای آفریقا، هند، جزایر جنوب شرقی آسیا و میکرونزی مشاهده شده است. میزان متوسط سل (۲۶ تا ۱۰۰ مورد در هر ۱۰۰ هزار نفر) در چین، آمریکای مرکزی و جنوبی، اروپای شرقی و شمال آفریقا مشاهده شده است. پایین‌ترین میزان سل (کمتر از ۲۵ مورد در هر ۱۰۰ هزار نفر) نیز در ایالات متحده، اروپای غربی، کانادا، ژاپن و استرالیا می‌باشد (۱۲).

بزرگترین مانع کاهش میزان سل و مرگ و میر ناشی از آن، تعداد قابل توجه افراد مبتلا به بیماری سل است که هرگز تشخیص داده نمی شوند و بنابراین هرگز نیز درمان نمی‌شوند. WHO تخمین زده است که تقریباً ۳۰ درصد افراد مبتلا به سل هرگز تشخیص داده نمی شوند (۱۱). بنابراین، استراتژی‌های کارآمد برای غربالگری و درمان این افراد، شناسایی آنها می‌باشد، بالاترین میزان سل

[1] World Health Organization

جدول ۲ - فراوانی حضور ژنDosT در بیماران مبتلا به *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس*

	Active n (%)	
Genes	**Positive**	**Negative**
DosT	33 (94.3)	2 (5.7)



نمودار ۲ - فراوانی حضور ژن DosT در بیماران مبتلا به مایکوباکتریوم توبرکلوزیس

(۱۰۰ مورد یا بالاتر در هر ۱۰۰ هزار نفر)، در جنوب صحرای آفریقا، هند، جزایر جنوب شرقی آسیا و میکرونزی مشاهده شده است. میزان متوسط سل (۲۶ تا ۱۰۰ مورد در هر ۱۰۰ هزار نفر) در چین، آمریکای مرکزی و جنوبی، اروپای شرقی و شمال آفریقا مشاهده شده است. پایین‌ترین میزان سل (کمتر از ۲۵ مورد در هر ۱۰۰ هزار نفر) نیز در ایالات متحده، اروپای غربی، کانادا، ژاپن و استرالیا می‌باشد (۱۳).

ژن *dosT* کیناز حسگر است که ژن *dosT* را فسفریله میکند و در نتیجه ژن *dosR* به DNA متصل میشود و در بالادست ژنهای هیپوکسی[1] قرار میگیرد ، بنابراین خفتگی در مایکوباکتریوم توبرکلوزیس فعال میشود . ژن *dosT* میتواند از Ca^{2+} علاوه بر Mg^{2+} بعنوان یون دو ظرفیتی برای اتوفسفریلاسیون استفاده کند و باعث انتقال فسفات به *dosR* میشود و آن را فسفریله و فعال میکند ولی مطالعات ثابت کردند رونویسی *dosT* در هنگام کمبود اکسیژن تنظیم مجدد نمیشود (۱۴). در مطالعه حاضر، ۳۵ اسمیر خلط بیمار ریوی مشکوک به TB کشت مثبت جدا شد. ژن *dosT* جزء رگولاتور تنظیم کننده خفتگی توبرکلوزیس می باشد ، در این مطالعه فراوانی حضور ژن *dosT* در بیمارن مبتلا به توبرکلوزیس۹۴ درصد گزارش شده است و ژن *dosT* در نمونه‌های حساس مایکوباکتریوم بیشتر می‌باشد (۷۸/۸٪).

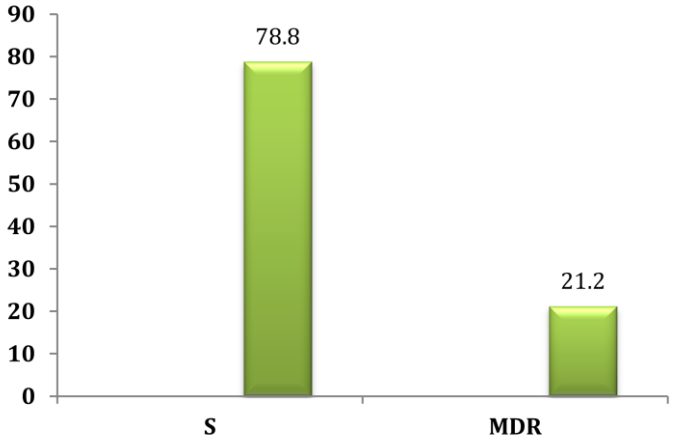
نتیجه‌گیری:

در این بررسی ژن *dosT* ،در تمامی بیماران مبتلا به *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* تشخیص داده شد و مشخص شد فراوانی حضور این ژن در بیماران بسیار میباشد ، در ۳۵ بیمار مسلول مورد آزمایش ۹۴/۳ ٪ است که رقم قابل ملاحظه ای میباشد و همینطور مشخص شد که فراوانی ژن *dosT* در بیماران حساس در مقایسه با ایزوله‌های MDR بیشتر میباشد (۷۸/۸ ٪) . در کل این نتایج نشان دهنده نقش پررنگ ژن مذکور در بیماران مبتلا به توبرکلوزیس میباشد، همانطور که میدانیم ژن *dosT* یکی از ژنهای موثر در نهفتگی *مایکوباکتریوم*

[1] Hypoxia

جدول ۳ - نتایج فراوانی ژن DosT و نوع مقاومت یا حساسیت در گروه بیمار

ژن	(درصد) فراوانی	S	MDR	جمع کل
DosT	(درصد) فراوانی	۲۶ (۷۸/۸)	۷ (۲۱/۲)	۳۳ (۱۰۰)



نمودار ۳ - مقایسه نوع مقاومت یا حساسیت ژن DosT در بیماران

توبرکلوزیس میباشد که میتواند منجر به رفتن بیماران مسلول به حالت خفتگی بیماری سل شود.

سپاسگزاری:

بدین وسیله کمال قدردانی خود را از استاد گرانقدر، سرکار خانم دکتر پریسا فرنیا و پرسنل محترم مرکز تحقیقات مایکوباکتریولوژی (دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، بیمارستان مسیح دانشوری، تهران) ابراز مینمایم.

منابع:

1) World Health Organization. (2014). Companion handbook to the WHO guidelines for the programmatic management of drug-resistant tuberculosis. World Health Organization.
2) Weiss, J. (2016). Handbook of Ion Chromatography, 3 Volume Set (Vol. 1). John Wiley & Sons.
3) Diel, R., Rutz, S., Castell, S., & Schaberg, T. (2012). Tuberculosis: cost of illness in Germany. European Respiratory Journal, 40(1), 143-151.
4) Schuster, M. L., & Coyne, D. P. (1974). Survival mechanisms of phytopathogenic bacteria. Annual Review of Phytopathology, 12(1), 199-221.
5) Fallow, A., Domenech, P., & Reed, M. B. (2010). Strains of the East Asian (W/Beijing) lineage of Mycobacterium tuberculosis are DosS/DosT-DosR two-component regulatory system natural mutants. Journal of bacteriology, 192(8), 2228-2238.
6) World Health Organization (WHO). Global Tuberculosis . www.who.int/tb/publications/global_report/en / Date last accessed: November 14, 2016. Date last updated (2016)
7) Velayati, A. A., & Farnia, P. (2017). The species concept. Atlas of Mycobacterium Tuberculosis; Elsevier Inc.: San Diego, CA, USA.
8) Farnia, P., Masjedi, M. R., Nasiri, B., Mirsaedi, M., Sorooch, S., Kazeampour, M., & Velayati, A. A. (2007). Instability of IS6110 patterns in multidrug-resistant strains of Mycobacterium tuberculosis. Epidemiology & Infection, 135(2), 346-352.
9) Velayati, A. A., Masjedi, M. R., Farnia, P., Tabarsi, P., Ghanavi, J., ZiaZarifi, A. H., & Hoffner, S. E. (2009). Emergence of new forms of totally drug-resistant tuberculosis bacilli: super extensively drug-resistant

tuberculosis or totally drug-resistant strains in Iran. Chest, 136(2), 420-425.
10) Farnia, P., Mohammad, R. M., Merza, M. A., Tabarsi, P., Zhavnerko, G. K., Ibrahim, T. A., ... & Setareh, M. (2010). Growth and cell-division in extensive (XDR) and extremely drug resistant (XXDR) tuberculosis strains: transmission and atomic force observation. International journal of clinical and experimental medicine, 3(4), 308.
11) Stephen H.E.K and Paul van. H. 2008. Handbook of Tuberculosis.
12) Tinsley R.H.(2017). Harison's Principles of internal medicine.
13) Brennan, P. J., & Nikaido, H. (1995). The envelope of mycobacteria. Annual review of biochemistry, 64(1), 29-63.
14) Kumar, A., Toledo, J. C., Patel, R. P., Lancaster, J. R., & Steyn, A. J. (2007). Mycobacterium tuberculosis DosS is a redox sensor and DosT is a hypoxia sensor. Proceedings of the National Academy of Sciences, 104(28), 11568-11573.

Nafas, Vol. 7, No. 2, Summer 2020, Pages: 22-29

Original Article

Evaluation of dosT Gene in Patients with Mycobacterium Tuberculosis

Faezeh Hamidieh[1], Parissa Farnia[2*], Jamileh Nowroozi[1], Poopak Farnia[2,3], Ali Akbar Velayati[2]

1) Departement of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
2) Mycobacteriology Research Center (MRC), National Research Institute of Tuberculosis and Lung Disease (NRITLD) ,Shahid Beheshti University of Medical Sciences ,Tehran ,Iran
3) Department of Biotechnology, School of Advanced Technology in Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran. Iran.

Abstract:
Mycobacterium tuberculosis is a pathogen that can cause tuberculosis in the host. Although Mycobacterium tuberculosis is the oldest known bacterium in humans, it is still a deadly disease worldwide. Mycobacterium tuberculosis can survive in the human body for decades without any symptoms. However, it may be activated in people with defective immune systems or people with diseases such as diabetes, AIDS or malnutrition, leading to tuberculosis. The aim of this study was to evaluate the dosT gene in patients with Mycobacterium tuberculosis

The presence of dosT gene in patients with Mycobacterium tuberculosis was determined by PCR and the presence of this gene in susceptible and resistant samples of Mycobacterium tuberculosis was analyzed by many statistical methods.

The dosT gene was detected in all patients with E. coli by PCR (219 bp). The frequency of dosT gene in isolates of patients with Mycobacterium tuberculosis was determined (94.3%). The percentage of dosT gene presence in patients with susceptible and resistant Mycobacterium tuberculosis was determined (78.8% and 21.2% in patients with recessive tuberculosis)

The presence of dosT gene was detected in almost all patients with Mycobacterium tuberculosis and it was shown that this gene is more common in susceptible isolates of Mycobacterium tuberculosis.

Keywords: Mycobacterium tuberculosis, tuberculosis, dosT gene, PCR

[*] **Corresponding Author:**
Parissa Farnia, PhD. Mycobacteriology Centre, NRITLD/WHO, Shahid Beheshti University (Medical Campus), Tehran, Email: pfarnia@hotmail.com