

## Isolation, Identification and genomic pattern of *Mycobacterium tuberculosis* from tuberculin positive cattle from Qom province with RFLP method by PGRS probe

Sina Nimrooz

M.Sc Student of Microbiology, Islamic Azad university, Saveh, Iran, nimrooz1988@gmail.com

Nader Mosavari\*

Assistant professor of Reference Laboratory for Bovine Tuberculosis, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran n.mosavari@rvsri.ac.ir

Taghi Zahraei Salehi

Professor of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine University of Tehran, Iran, tsalehi@ut.ac.ir

### Abstract

**Introduction:** *Mycobacterium bovis* is the principal cause of bovine tuberculosis in bovids. In the present work, isolation, identification and genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTbC) isolates collected from slaughtered reactor (tuberculin-positive) cattle in Qom province using RFLP-PGRS are addressed.

**Materials and methods:** From January 2012 to February 2013, major head and trunk lymph nodes from a total of 30 carcasses originating from reactor cattle were collected at Qom abattoir. These were all cultured on glycerinated and pyruvated Lowenstein-Jensen slopes and incubation at 37°C 8-12 weeks. Slopes bearing acid-fast bacterial growth were subjected PCR-IS6110 in searching for MTbC isolates. The identified MTbC complex isolates were strain typed by RFLP-PGRS.

**Results:** Totally, PCR-IS6110 experiment detected MTbC in 21 specimens. Genotyping these by RFLP-PGRS resulted characterization of 3 different genotypes.

**Discussion and conclusion:** Isolation of MTbC bacteria from tuberculated cattle of Qom province raises public health concern due to the likely transmission of infection to human subjects. Identification of three RFLP-PGRS types between the 21 collected isolates from Qom is a reflection of co-existence of different MTbC strains and genetic diversity in the region, the extent of this diversity however, remains to be assessed by further epidemiological works. Taking the current level of genetic diversity between MTbC bacteria in Qom into account, re-consideration of the existing test-and-slaughter scheme seems necessary.

**Key words:** *Mycobacterium tuberculosis* complex, Genomic fingerprinting, RFLP, PGRS, Bovine tuberculosis

---

\* Corresponding author

**Received:** August 8, 2015/ **Accepted:** December 30, 2015

فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها  
سال ششم، شماره ۲۱، بهار ۱۳۹۶، صفحه ۵۲-۴۷  
تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۰۵/۱۷ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۱۰/۰۹

## جداسازی، تعیین هویت و تهیه الگوی ژنومی باکتری‌های عضو کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس از گاو‌های توبرکلین مثبت استان قم با روش RFLP PGRS

سینا نیم‌روز: دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساوه، ساوه، ایران، nimrooz1988@gmail.com  
نادر مصوری\*: استادیار میکروبیولوژی مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، کرج، ایران، n.mosavari@rvsri.ac.ir  
تقی زهرانی صالحی: استناد میکروبیولوژی دانشگاه تهران، گروه زیست‌شناسی، تهران، ایران، tsalehi@ut.ac.ir

### چکیده

**مقدمه:** مایکوباکتریوم بویس عامل اصلی ایجاد سل در گاوها است. در مطالعه حاضر یافته‌های مربوط به جداسازی، تعیین هویت و تهیه الگوی ژنومی باکتری‌های عضو کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس (MTbC) از گاوهای توبرکلین مثبت استان قم با روش RFLP با استفاده از پروب PGRS بررسی شده است.

**مواد و روش‌ها:** از دی ۱۳۹۱ تا بهمن ۱۳۹۲ غدد لنفاوی اصلی سر و تنه لاشه ۳۰ رأس گاو توبرکلین مثبت استان قم بر روی محیط لونشتاین - جانسون گلیسرینه و پیرووات دار کشت و ۸ تا ۱۲ هفته در  $37^{\circ}C$  نگهداری شدند. بر تمام لوله‌های کشت دارای رشد باکتریایی اسید فست، PCR-IS6110 اجرا شد و جدایه‌های عضو MTbC به روش RFLP-PGRS ژنوتایپ شدند.

**نتایج:** در ۲۱ نمونه در آزمایش PCR-IS6110 وجود MTbC تأیید شد و در RFLP-PGRS در مجموع سه تیپ ژنتیکی شناسایی شد.

**بحث و نتیجه‌گیری:** آلودگی گله‌های گاو در استان قم به MTbC اهمیت خطر احتمالی انتقال بیماری به میزبان‌های انسانی را نشان می‌دهد. شناسایی سه تیپ ژنتیکی در میان ۲۱ جدایه استان قم ضمن نشان دادن فعالیت سویه‌های مختلف MTbC در منطقه، وجود تنوع ژنتیکی این باکتری‌ها را در استان قم نشان می‌دهد که تعیین میزان گستردگی آن نیازمند به انجام پژوهش‌های تکمیلی خواهد بود. با در نظر گرفتن تنوع ژنتیکی حاضر در جمعیت MTbC در استان قم، به نظر می‌رسد برنامه در حال اجرای تست و کشتار در این استان نیازمند بازنگری و تقویت مبانی راهبردی در اجرا باشد.

**واژه‌های کلیدی:** مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، کمپلکس، سل گاوی، برنامه تست و کشتار، انگشت‌نگاری ژنومی، RFLP- PGRS

\* نویسنده مسئول مکاتبات، آزمایشگاه رفرانس مایکوباکتریوم‌های بیماری‌زای دام - مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان

تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی (تات)، کرج، ایران

## مقدمه

سل گاوی ناشی از مایکوباکتریوم بویس از قدیمی‌ترین و مهم‌ترین بیماری‌های شناخته‌شده مشترک بین انسان و دام است که قدمت آن را به اندازهٔ حیات بشریت می‌دانند (۱). این بیماری از تمام جهان به جز قطب جنوب گزارش شده است. در بسیاری از کشورهای جهان هر ساله مبالغ هنگفتی بودجه صرف اجرای برنامه‌های ریشه‌کنی سل گاوی در دام‌ها می‌شود. با معرفی دانش مولکولار اپیدمیولوژی و بهره‌گیری از تکنیک‌های ژنوتایپینگ جدایه‌های مایکوباکتریوم بویس امکان ارزیابی دقیق‌تر برنامه‌های کنترل بیماری، شناسایی ارتباط فیلوژنتیکی میان سویه‌ها، ارتباط میان میزبان‌های مختلف و نقش حیوانات ناقل و همچنین ردیابی منشأ آلودگی فراهم شده است (۱، ۲ و ۳). ایران با داشتن حدود ۸/۵ میلیون رأس گاو و اجرای بیش از ۱/۲ میلیون نوبت تست سل در هر سال، همچنان به‌عنوان بزرگ‌ترین کشور اجراکنندهٔ برنامهٔ تست و کشتار علیه سل گاوی در منطقهٔ خاورمیانه شناخته می‌شود (۱). با وجود اینکه فراوانی موارد گزارش سل گاوی در سطح گله‌ها و همچنین تعداد دام‌های مبتلا در هر گله، کاهش درخور توجهی داشته است، براساس گزارش‌های سالیانهٔ سازمان دامپزشکی کشور و در نتیجهٔ اجرای این برنامه، سل گاوی تقریباً در هیچ یک از مناطق جغرافیایی دامپروری مهم ایران ناپدید نشده است؛ علاوه بر این، مشاهدهٔ موارد سل سرتاسری در لاشه‌های گاو ذبح‌شده در برخی از واحدهای کشتارگاه کشور همچنان بر کافی‌نبودن اقدامات در حال انجام در کنترل بیماری اشاره دارد. نقل و انتقالات و خرید و فروش دام‌ها به‌صورت غیرمجاز بین واحدهای گاو‌داری، مراتع، بازارهای دام و کشتارگاه از جملهٔ اصلی‌ترین راه‌های

انتقال بیماری و شکست برنامهٔ کنترل سل در تمام جهان شناخته شده‌اند (۲-۴).

در این پژوهش با استفاده از تکنیک *RFLP-PGRS* تنوع ژنتیکی موجود در جمعیت جدایه‌های مایکوباکتریوم توبریکولوزیس کمپلکس جمع‌آوری‌شده از گاوهای توبریکولین مثبت استان قم بررسی شده است.

## مواد و روش‌ها

**جمع‌آوری نمونه:** در مطالعهٔ حاضر تعداد ۳۰ جدایه جمع‌آوری شده از غدد لنفاوی و نمونه‌های پاتولوژیک لاشهٔ گاو توبریکولین مثبت کشتار شده در استان قم بررسی شد. این دام‌ها به‌دنبال اجرای عملیات توبریکولیناسیون در ۴ واحد گاوداری در شهرستان قم به‌عنوان دام راکتور (توبریکولین مثبت) شناسایی شدند و در بازهٔ زمانی دی ۱۳۹۱ تا بهمن ۱۳۹۲ به دو واحد کشتارگاه در سطح استان اعزام و ذبح گردیدند. عقده‌های سر (رتروفارنژیال)، لنفاوی تنه (مدیاستینال، برونشیال، مزانتریک) و نمونه‌های پاتولوژیک نظیر ضایعات احتمالی در ریه و کبد و طحال (در صورت مشاهده) در کشتارگاه جمع‌آوری شدند و پس از بسته‌بندی در ظرف نمونه‌برداری مناسب و ثبت مشخصات با رعایت زنجیرهٔ سرد به مؤسسه رازی کرج انتقال داده شدند.

**کشت میکروبی بر روی محیط اختصاصی:** در آزمایشگاه با استفاده از مواد و وسایل استریل، ابتدا همهٔ نمونه‌های مربوط به هر لاشه به‌صورت مجتمع توسط هاون آزمایشگاهی و ماسه بادی، سلايه و یکنواخت شد و سپس با استفاده از محلول آلودگی‌زدای هم‌حجم نمونه، شامل: مخلوط ان‌استیل‌ال‌سیستین (۵/۰ درصد)، هیدروکسید سدیم (۳/۵ مولار) و سیترات سدیم (۰/۰۵

هریک از دو پرایمر 5'CGT GAG GGC INS-1 و 3'GCG INS-2 و ATC GAG GTG GC 3' و 1/25, TAG GCG TCG GTG ACA AA 3' واحد آنزیم DNA پلیمراز، ۲ میکرولیتر نمونه DNA template و تا سقف ۱۰ میکرولیتر از آب مقطر باشد. برنامه حرارتی اجرای PCR شامل یک مرحله گرمایش مقدماتی (94°C / 3 m) و ۳۵ چرخه آمپلیفیکاسیون سه مرحله‌ای مشتمل بر گرمایش اول (94°C / 1 m)، گرمایش دوم (65°C / 1 m) و گرمایش سوم (72°C / 1 m) بود که در پایان با یک مرحله گرمایش در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۴ دقیقه خاتمه می‌یافت.

**آزمایش RFLP-PGRS:** استخراج ژنوم باکتری و اجرای RFLP براساس روش ون سولینگن صورت گرفت. به‌طور خلاصه، توده رشد یافته بر روی ۳-۵ لوله کشت لונشتاین-جانسون متناسب با میزان رشد باکتری، در یک میکروفیوژ مجهز به واشر ضدنشست<sup>۴</sup> جمع‌آوری و توسط بن ماری محتوی آب مقطر در حال جوش غیرفعال شد. سوسپانسیون غیرفعال شده باکتری سپس تحت تأثیر لیزوزیم<sup>۵</sup> و پروتکیناز K<sup>۶</sup> و CTAB<sup>۷</sup> قرار گرفت. ماده ژنتیکی توسط کلروفورم استخراج شد. در مورد RFLP، ژنوم باکتری تحت تأثیر آنزیم PvuII در طول شب و در دمای 8°C 37 هضم شد. قطعات به‌دست آمده حاصل از هضم ژنوم توسط ژل الکتروفورز تفکیک شدند و به سطح یک غشای نایلون دارای شارژ مثبت منتقل و تثبیت شدند. برای هیبریدیزاسیون از پروب نشاندار 5' CGG PGRS (5' CCG TCG CCG TTG CCG CCG TTG CCG CCG TTG) با دیگ اکسژنه<sup>۸</sup> استفاده شد که این مرحله در آون مخصوص هیبریدیزاسیون و درون

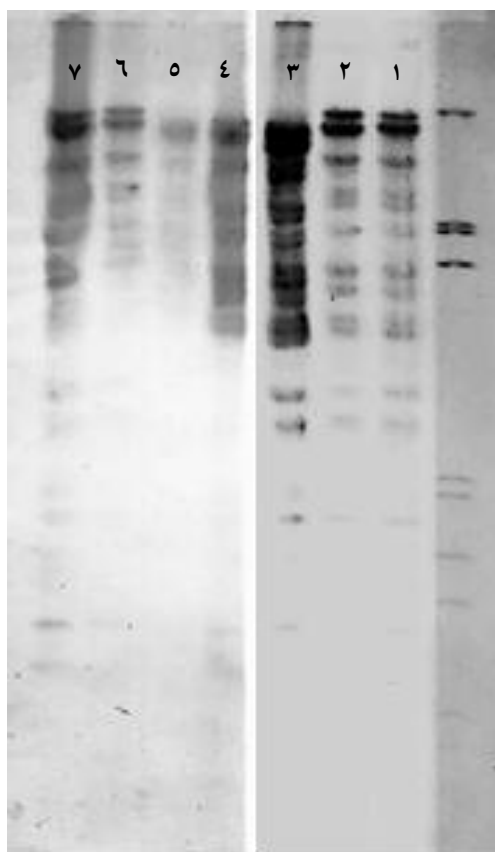
مولار) به مدت ۱۵ دقیقه آلودگی زدایی شدند (۵). حدود ۵ میلی‌لیتر از بخش فوقانی مایع موجود در هاون به یک لوله یونیورسال منتقل شد و با استفاده از اسید کلریدریک خنثی گردید و سپس در ۳۵۰۰ rpm به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. از رسوب به‌دست آمده برای تلقیح یک لوله کشت لونشتاین-جانسون گلیسرین دار و یک لوله کشت لونشتاین-جانسون پیرووات دار استفاده شد. لوله‌های کشت شده در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد برای ۱۲ هفته به دور از نور نگهداری شدند.

**آزمایش میکروسکوپی:** از تمام لوله‌های کشت در پایان دوره انکوباسیون گسترش میکروسکوپی تهیه شد و پس از رنگ آمیزی به روش اسید فست، رنگ آنها بررسی شد.

ویژگی‌های رشد بر روی محیط کشت اختصاصی، مدت زمان لازم برای مشاهده نخستین پرگنه‌های رشد و برخورداری از خصوصیت اسید فست بودن، به‌عنوان مؤلفه‌های مؤید هویت احتمالی جدایه‌های جمع‌آوری شده به‌عنوان اعضای مایکوباکتریوم تویرکولوزیس کمپلکس در نظر گرفته شدند (۶).

**تعیین هویت:** برای اطمینان از هویت جدایه‌ها از نشانگر اختصاصی IS6110 به روش PCR-IS6110 و بر مبنای روش پیشنهادی ونسولینگن<sup>۲</sup> استفاده شد (۶). در این روش تولید یک قطعه به طول ۲۴۵ bp در نتیجه آمپلیفیکاسیون ژنوم باکتری تحت بررسی نشان‌دهنده هویت آن به‌عنوان جدایه مایکوباکتریوم تویرکولوزیس کمپلکس است.

**آزمایش PCR-IS6110:** حجم هر واکنش PCR به میزان ۲۵ µl به گونه‌ای تنظیم شد که شامل ۱۵ µl محلول آماده مصرف<sup>۳</sup> (مرک آلمان)، ۱ میکرولیتر از



شکل ۱- در تصویر فوق الگوی ۱ با ۲ و ۶، و الگوی ۳ با ۴ و ۵ شباهت دارند و الگوی ۷ منحصر به فرد است.

### بحث و نتیجه‌گیری

از سه ژنوتیپ شناسایی شده در مطالعه حاضر، فراوان‌ترین آنها تیپ شناخته شده‌ای است که به جهت اشتراک آن با تیپ ژنتیکی سویه واکسینال BCG به نام تیپ شبیه BCG<sup>۱۳</sup> شهرت دارد. مطالعات انجام شده قبلی که مصوری<sup>۱۴</sup> (۷) بر جدایه‌های گاوای مایکوباکتریوم توبریکولوزیس کمپلکس در ایران نشان داده‌اند در RFLP-PGRS تیپ ژنتیکی شبیه BCG در تمام ایران به صورت مشخص فراوان‌تر از تمام تیپ‌های دیگر یافت می‌شود. فراوانی مطلق یک یا تعداد محدودی از سویه‌های مایکوباکتریوم توبریکولوزیس کمپلکس با توجه به نبود طبیعی انتقال ژنتیکی عرضی<sup>۱۵</sup> در میان این پاتوژن‌ها (۸-۹) به عنوان تجلی پدیده تشکیل

بطری‌های ویژه در دمای ۶۵°C انجام شد. پس از هیبریدیزاسیون غشا در معرض آنزیم الکالین فسفاتاز گونژوگه با دیگ آنتی‌بادی قرار گرفت و به دنبال آن با افزودن BCIP/NBT به عنوان سوبسترای آنزیم، سیگنال‌های نوری حاصل احتمالی ظاهر شدند و تصاویر به دست آمده توسط یک اسکنر<sup>۱۰</sup> تصویربرداری و ضبط شدند.

### نتایج

**کشت میکروبی:** در کشت میکروبی و بررسی میکروسکوپی رشد مایکوباکتریایی در ۲۱ مورد از ۳۰ نمونه تأیید شد.

نتایج تعیین هویت به روش PCR-IS6110: همه ۲۱ جدایه جمع آوری شده در این آزمایش با موفقیت قطعاتی به طول 245bp تولید کردند و بدین ترتیب هویت آنها به عنوان جدایه‌های کمپلکس مایکوباکتریوم توبریکولوزیس تأیید شد.

**RFLP:** اجرای آزمایش RFLP-PGRS بر ۲۱ جدایه سبب شناسایی ۳ تیپ ژنتیکی شد (تصویر ۱). در بین این ۳ ژنوتیپ دو مورد از نوع خوشه‌ای<sup>۱۱</sup> بودند به طوری که در مورد تیپ ۱ تعداد ۱۵ (۷۱/۴۳ درصد) جدایه و در مورد تیپ ۲ تعداد ۵ (۳۳/۸۱ درصد) جدایه تیپ ژنتیکی یکسانی را از خود نشان دادند. تیپ ژنتیکی سوم فقط در یک جدایه مشاهده شد و بر همین اساس، به عنوان یک تیپ منحصر به فرد<sup>۱۲</sup> شناخته شد. تیپ یک، فراوان‌ترین تیپ مشاهده شده در این پژوهش بود؛ در عین حال در مورد سویه فرانسوی *Mycobacterium bovis* BCG 17162P2 واکسینال BCG مورد استفاده در ایران نیز مشاهده شد (شکل ۱).

## References

- ساختارهای کلونال<sup>۱۶</sup> شناخته شده است (۱۰). این ساختارها در واقع سویه‌هایی هستند که به صورت مشترک از یک سلول باکتریایی که حد مشترک همه آنها محسوب می‌شود اشتقاق و تکامل یافته‌اند. اگرچه مطالعات جدید در حال انجام وجود هیچ‌یک از سه ساختار کلونال شناخته شده مایکوباکتریوم بویس حال حاضر در جهان شامل European 1 و African 1 و همچنین African 2 (تدین، اطلاعات منتشر نشده)<sup>۱۷</sup> فضای جغرافیایی ایران نشان نداده‌اند، غلبه بلامنازع سویه‌های شبیه BCG در ایران و از جمله در استان قم بنا بر احتمال بسیار زیاد از وجود یک و یا تعداد بیشتری ساختارهای کلونال در این کشور حکایت دارد که وجود آنها هنوز به اثبات نرسیده است.
- موقعیت جغرافیایی استان قم در مجاورت استان تهران به گونه‌ای است که این استان را به یکی از مراکز اصلی نقل و انتقالات دام برای واحدهای گاو‌داری در کشور تبدیل کرده است. بدین ترتیب مشاهده تپ‌های ژنتیکی متفاوت با سه نوع گزارش شده در این پژوهش در صورت انجام مطالعات مشابه و مشارکت واحدهای دامپروری بیشتر، خارج از انتظار نخواهد بود. در بین روش‌های مولکولار ژنوتایپینگ<sup>۱۸</sup> م. بویس REA، RFLP<sup>۱۹</sup>، اسپولیگوتایپینگ<sup>۲۰</sup> و در سال‌های اخیرتر MIRU-VNTR<sup>۲۱</sup> عمومیت بیشتری دارند (۱۲). توانایی و قدرت تشخیص افتراقی RFLP-PGRS در شناسایی تپ‌های ژنتیکی م. بویس حتی بالاتر از توانایی روش MIRU-VNTR شناخته شده است (۱۳). به نظر می‌رسد استفاده از روش‌های MIRU-VNTR و اسپولیگوتایپینگ بر نمونه‌های باکتری‌های جدا شده در این پژوهش بتواند اطلاعات بهتری را درباره ساختار ژنتیک جمعیت این پاتوژن‌ها در استان قم فراهم کند.
- (1) Tadayon K., Mosavari N., Feizabadi M. An epidemiological perspective on bovine tuberculosis spotlighting facts and dilemmas in Iran. *Iranian Journal of Microbiology*. 2013; 5(1): 1-13.
  - (2) Wright D.M, Reid N., Montgomery W.I., Allen A.R., Skuce R.A., Kao R.R. Herd-level bovine tuberculosis risk factors: assessing the role of low-level badger population disturbance. *Scientific reports* 2015; 5: 13062.
  - (3) Vial F., Miguel E., Johnston WT., Mitchell A., Donnelly CA. Bovine Tuberculosis Risk Factors for British Herds Before and After the 2001 Foot-and-Mouth Epidemic: What have we Learned from the TB99 and CCS2005 Studies. *Transboundary and Emerging Diseases*. 2015; 62(5):505-515.
  - (4) More SJ., Radunz B., Glanville RJ. Lessons learned during the successful eradication of bovine tuberculosis from Australia. *The Veterinary record* 2015; 177(9): 224-232.
  - (5) Goyal M., Lawn S., Afful B., Acheampong JW., Griffin G., Shaw R. Spoligotyping in molecular epidemiology of tuberculosis in Ghana. *Journal of Infection* 1999; 38(3): 171-175.
  - (6) McLernon J., Costello E., Flynn O., Madigan G., Ryan F. Evaluation of *mycobacterial* interspersed repetitive-unit-variable-number tandem-repeat analysis and spoligotyping for genotyping of *Mycobacterium bovis* isolates and a comparison with restriction fragment length polymorphism typing. *Journal of Clinical Microbiology*. 2010; 48(12): 41-45.
  - (7) Mosavari N., Feizabadi M., Jamshidian M., Shahpouri M., Forbes K., Pajoochi R., et al. Molecular genotyping and epidemiology of *Mycobacterium bovis* strains obtained from cattle in Iran. *Veterinary Microbiology* 2011; 151(1-2): 148-152.

- (8) Behr MA. Evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. *Advances in experimental medicine and biology* 2013; 783: 81-91.
- (9) Smith NH., Gordon S. de la Rúa-Domenech R, Clifton-Hadley R, Hewinson R. Bottlenecks and broomsticks: the molecular evolution of *Mycobacterium*. *Nature reviews Microbiology* 2006, 9(4): 670- 681.
- (10) Smith NH., The global distribution and phylogeography of *Mycobacterium bovis* clonal complexes. *Infect Genet Evol Journal* 2012; 12(4): 857-865.
- (11) Smith NH., Berg S., Dale J., Allen A., Rodriguez S., Romero B., et al. European 1: a globally important clonal complex of *Mycobacterium bovis*. *Infect Genet Evol Journal* 2011; 11(6): 1340-1351.
- (12) Ribeiro-Lima J., Enns E., Thompson B., Craft M., Wells S. From network analysis to risk analysis--An approach to risk-based surveillance for bovine tuberculosis in Minnesota, US. *Preventive Veterinary Medicine* 118(4): 328-340.
- (13) Michel AL., Hlokwe T., Coetzee M., Maré L., Connoway L., Rutten V., et al. High *Mycobacterium bovis* genetic diversity in a low prevalence setting. *Veterinary Microbiology Journal* 2008; 126(1-3): 151-159.
- 
- <sup>1</sup>- N-acetyl-L-cysteine  
<sup>2</sup>- Vansolinger  
<sup>3</sup>- PCR master mix  
<sup>4</sup>- O-ring  
<sup>5</sup>- lysozyme  
<sup>6</sup>- Proteinase K  
<sup>7</sup>- Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide  
<sup>8</sup>- Digoxigenin  
<sup>9</sup>- Dig antibody  
<sup>10</sup>- (Cannon Laser BaseMF3110, Japan)  
<sup>11</sup>- Clustered  
<sup>12</sup>- Orphan  
<sup>13</sup>- BCG-like  
<sup>14</sup>- Mosavari  
<sup>15</sup>- Horizontal gene transfer  
<sup>16</sup>- Clonal complexes  
<sup>17</sup>- Tadayon (no information)  
<sup>18</sup>- Restriction Endonuclease  
<sup>19</sup>- Restriction Fragment Length Polymorphism  
<sup>20</sup>- Analysis Spoligotyping  
<sup>21</sup>- Mycobacterial Interspersed Repetitive-unit-Variable-Number Tandem-Repeat (MIRU-VNTR) typing