Quarterly of the Horizon of Medical Sciences
Vol. 19, No. 1, Spr 2013
Pages: 1-6

Gene polymorphism of BCG vaccine strain using in Iran

Fallah F.[1] *PhD*, Goudarzi H.[2] *PhD*, Doustdar F.[2] *PhD*,
Zahraei S. M.[3] *PhD*, Mohammadzadeh A. R.* *MSc*

[*]Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[1]"Department of Microbiology, Faculty of Medicine" & "Pediatric Infections Research Center", Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[2]Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[3]Contagious Diseases Management Center, Ministry of Health, Care & Medical Education, Tehran, Iran

Abstract

Aims: The Bacille Calmette-Guérin (BCG) is the only vaccine available against tuberculosis. The BCG strain used in Iran as the vaccine is not specified. The purpose of the present study was to confirm and make a qualitative control for BCG vaccine in Iran and to determine the genetic polymorphism of the given strain.

Methods: Twenty eight lyophilized BCG vaccines (Pasteur Institute, Iran) with different batch numbers were collected over a year (2011-12) and transferred under the temperature condition of 4°C to the laboratory. Three strains of vaccine were selected randomly out of each batch number. The DNA was extracted using CTAB method. DNA samples were kept at -20°C. Of four primers, RD14 and DU1 genes were used for PCR. The sequence of RD16 region in BCG strains was determined using DNA analyzer ABI3730XL using Chromas and Mega4 software. VNTR typing was done for six genic positions.

Results: All strains were positive in terms of their culture on the medium. In all BCG strains under study, DU1 duplication in the bacteria's chromosome was observed. None of strains had RD14 gene. All RD16 regions had similar sequence with RD16 region in the genome of Pasture1173p2 strain. The number and size of repeated units for six gene positions including MIRU4, MIRU24, MIRU26, MIRU40, VNTR1895 and VNTR11b in 28 strains of different BCG in the vaccine samples were respectively (2×77)+122, (2×54)+393, (5×51)+285, (2×54)+354, (4×57)+281 and (3×69)+67.

Conclusion: BCG strain using in Iran is the very Pasteur 1173p2 and may be used as vaccine.

Keywords: BCG Vaccine, MIRU-VNTR Typing, Gene Polymorphism, PCR

[*]Corresponding Author: All requests Should be sent to alm13604@gmail.com
Received: 19 September 2012 Accepted: 4 March 2013

پلی‌مورفیسم ژنی سویه واکسن BCG مورد استفاده در ایران

فاطمه فلاح PhD
"گروه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی" و "مرکز تحقیقات عفونی اطفال"، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
حسین گودرزی PhD
گروه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
فرحنوش دوستدار PhD
گروه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
سید محسن زهرایی PhD
مرکز مدیریت بیماری‌های واگیر، وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی، تهران، ایران
علیرضا محمدزاده* MSc
گروه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

چکیده
اهداف: باسیل کالمت–گرین (BCG) تنها واکسن در دسترس علیه بیماری سل است. سویه BCG مورد استفاده به‌عنوان واکسن در ایران نامشخص است. هدف این مطالعه تایید و کنترل کیفی واکسن BCG مورد استفاده در ایران و تعیین پلی‌مورفیسم ژنی این سویه بود.
روش‌ها: ۲۸ واکسن BCG لیوفلیزه (انیستیتو پاستور؛ ایران) با شماره سریال‌های متفاوت طی یک سال (۹۱–۱۳۹۰) جمع‌آوری و تحت شرایط دمایی ۴°C به آزمایشگاه انتقال داده شدند. از هر شماره سریال ۳ سویه واکسن به‌صورت تصادفی انتخاب شد. استخراج DNA با روش CTAB انجام شد. نمونه‌های DNA در دمای ۲۰°C– نگهداری شدند. از ۴ پرایمر برای PCR ژن‌های RD14 و DU1 استفاده شد. تعیین توالی ناحیه RD16 در سویه‌های واکسن BCG توسط DNAآنالایزر ABI3730XL با نرم‌افزارهای Chromas و Mega 4 انجام شد. VNTR تایپینگ برای ۶ جایگاه ژنی صورت گرفت.
یافته‌ها: تمام سویه‌ها از نظر کشت روی محیط مثبت بودند. در همه سویه‌های BCG مورد بررسی مضاعف‌شدگی DU1 در کروموزوم باکتری‌ها مشاهده شد. هیچکدام از سویه‌ها دارای ژن RD14 نبودند. همه نواحی RD16 دارای توالی مشابه با ناحیه RD16 در ژنوم سویه Pasture1173p2 بودند. تعداد و اندازه واحدهای تکراری برای ۶ جایگاه ژنی MIRU4، MIRU24، MIRU26، MIRU40، VNTR1895 و VNTR11b در ۲۸ سویه BCG مختلف در نمونه‌های واکسن به‌ترتیب ۱۲۲+(۲×۷۷)، ۳۹۳+(۲×۵۴)، ۲۸۵+(۵×۵۱)، ۳۵۴+(۲×۵۴)، ۲۸۱+(۴×۵۷) و ۶۷+(۳×۶۹) بود.
نتیجه‌گیری: سویه BCG مورد استفاده در ایران، همان سویه Pasture1173p2 است و می‌توان از آن به عنوان واکسن استفاده نمود.
کلیدواژه‌ها: واکسن BCG، MIRU-VNTR تایپینگ، پلی‌مورفیسم ژنی، واکنش پلیمرازی زنجیره‌ای

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۰۶/۲۹
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۱۲/۱۴
*نویسنده مسئول: alm13604@gmail.com

مقدمه
بیماری سل یکی از بیماری‌های مهم و رو به گسترش در دنیا است؛ به‌طوری‌که تخمین زده می‌شود در هر سال، ۸میلیون نفر به مبتلایان افزوده شده و ۲میلیون نفر از این بیماری بمیرند. همچنین، یک‌سوم جمعیت جهان به *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* مبتلا هستند [۱]. یکی از راه‌های کنترل بیماری سل، استفاده از واکسن باسیل کالمت–گرین (BCG) است. این واکسن سویه ضعیف‌شده *مایکوباکتریوم بویس* است که پس از پاساژهای متوالی (۲۳۱ پاساژ طی ۱۳ سال) توسط *کالمت* و *گرین* در انیستیتو پاستور فرانسه تولید شد [۲].

طی سال‌های ۶۱–۱۹۰۸، پاساژهای مکرر واکسن باعث ایجاد زیرسویه‌های مختلف شد که از نظر ژنتیکی با هم متفاوت بودند [۳]. در پاساژهای مکرر BCG از سال ۱۹۰۸ تا ۱۹۲۱ توسط *کالمت* و *گرین*، ناحیه RD1 از DNA گونه بیماریزای *مایکوباکتریوم بویس* حذف شد که نتیجه آن ایجاد سویه ضعیف‌شده BCG بود [۴]. حذف ناحیه RD2 طی ۳۱–۱۹۲۷ اتفاق افتاد و به دنبال این حذف در سال ۱۹۳۸ ناحیه RD14 طی پاساژهای مکرر از سویه BCG "Pasture1173p2 " حذف شد. این سویه تنها سویه فاقد ناحیه RD14 است [۳، ۵، ۶]. بنابراین از این خصوصیت می‌توان برای تشخیص و افتراق آن از سایر سویه‌های BCG استفاده نمود. به غیر از حذف‌هایی که در DNAی BCG رخ داد، ۳ مضاعف‌شدگی طی سال‌های ۶۱–۱۹۲۱ نیز صورت گرفت. مضاعف‌شدگی DU1 فقط در کروموزوم سویه BCG پاستور وجود دارد و می‌توان از این ویژگی در تشخیص آن استفاده کرد [۳، ۷].

علاوه بر تغییرات ژنتیکی یادشده، توالی‌های VNTR در DNAی BCG وجود دارد که می‌توان از آنها برای تفریق زیرسویه‌های آن استفاده کرد. حدود ۴۰ واحد MIRU در ژنوم *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* وجود دارد که ۱۲ واحد آن دارای اهمیت بیشتری هستند. یکی از واحدهای تکراری مهم در BCG، در ناحیه MIRU4 قرار دارد. این ناحیه دارای یک توالی تکراری ۷۷جفت‌بازی است که این توالی در جایگاه ژنی MIRU4، با توجه به نوع زیرسویه BCG حاوی ۱ (Prague BCG)، ۲ (BCG Pasture1173p2) یا ۳ (Merieux BCG) تکرار است [۸، ۹]. علاوه بر MIRU4، واحدهای تکراری دیگری هم در سویه‌های مختلف BCG وجود دارند که از این واحدهای تکراری می‌توان در افتراق سویه‌های BCG استفاده نمود [۱۰].

شرایط مختلف پاساژ واکسن BCG در آزمایشگاه‌های مختلف در سراسر دنیا در سال‌های ۱۹۲۱ تا ۱۹۶۱ منجر به ظهور سویه‌های BCG مختلف با تغییرات ژنتیکی شامل حذف‌ها، مضاعف‌شدگی‌ها و جهش‌های نقطه‌ای شد [۳]. این تغییرات ژنتیکی می‌تواند ایمنی‌زایی واکسن BCG را تحت تاثیر قرار دهد؛ به‌طوری‌که سیستم ایمنی بدن پاسخ مناسبی به واکسن ندهد. از این رو، ارزیابی

تغییرات ژنتیکی سویه‌های مختلف BCG در دوره‌های زمانی دارای اهمیت زیادی است. برای این منظور، روش‌هایی برای کنترل واکسن توسط سازمان جهانی بهداشت [۱۱] و سازمان دارویی اروپا (PhEur) [۱۲] توصیه شده است. این روش‌ها شامل بررسی میکروسکوپی باسیل‌ها در اسمیر رنگ‌آمیزی‌شده توسط رنگ‌آمیزی ذیل- نلسون (بیان خصوصیت اسیدفست‌بودن باکتری) و تعیین خصوصیات ظاهری کلنی‌های رشدیافته در محیط جامد هستند که فقط حضور باسیل در واکسن BCG را تایید نموده و دارای ویژگی اختصاصی بالایی برای BCG نیستند و با کمک این روش‌ها امکان افتراق سویه‌های BCG و دیگر اعضای گونه *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* وجود ندارد [۵، ۱۳]. برای افتراق سویه‌های BCG استفاده از تکنیک‌های مبتنی بر تکثیر اسیدنوکلئیک مفید است و می‌توان از روش‌های مولکولی مختلف برای افتراق سویه‌های BCG استفاده نمود [۱۳]. روش‌های مولکولی مورد استفاده برای تمایز زیرسویه‌های BCG، معمولاً روش‌هایی مبتنی بر PCR (Multiplex PCR یا VNTR تایپینگ) هستند [۵، ۱۰، ۱۶-۱۴]. به طور کلی و با توجه به موارد بیان‌شده در بالا می‌توان الگوی ژنتیکی زیرسویه‌های BCG را براساس نواحی RD، الگوی VNTRs و DU تعریف نمود [۸]. روش MIRU-VNTR تایپینگ، متکی به PCR است. در این روش با کمک پرایمرهای اختصاصی، جایگاه‌های ژنی تکراری تکثیر شده و اندازه محصول PCR که نشان‌دهنده تعداد تکرارهای تصادفی در هر جایگاه ژنی است، مشخص می‌شود [۱۷].

با توجه به معضل بیماری سل در ایران و افزایش مقاومت چندداروی سویه‌های *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* و ایجاد سویه‌های با مقاومت دارویی وسیع، استفاده از واکسن BCG نیازی مبرم است و کنترل کیفی واکسن‌ها برای اطمینان از کفایت ایمنی‌زایی BCG از اهمیت بالایی برخوردار است. همچنین، نتایج مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۹ صورت گرفت نشان می‌دهد که سویه BCG مورد استفاده در ایران، سویه‌ای نامشخص است [۱۸]. از این رو، هدف این مطالعه تایید و کنترل کیفی واکسن BCG مورد استفاده در ایران و تعیین پلی‌مورفیسم ژنی این سویه بود.

روش‌ها

باکتری‌ها: ۲۸ واکسن BCG لیوفلیزه (انیستیتو پاستور؛ ایران) با شماره سریال‌های متفاوت (۸۸۸۱، ۸۹۵۵، ۸۹۶۱، ۸۹۶۲، ۸۹۷۵، ۹۲۹۱، ۹۱۰۱، ۹۲۹۲، ۹۳۱۱، ۹۳۱۲، ۹۳۱۳، ۹۳۱۴، ۹۳۲۱، ۹۳۲۲، ۹۳۷۳، ۹۴۲۲، ۹۴۲۱، ۹۳۹۴، ۹۳۹۲، ۹۴۶۴، ۹۴۶۳، ۹۴۶۲، ۹۴۴۴، ۹۴۴۱، ۹۴۶۱، ۹۴۴۳، ۹۴۸۱ و ۹۴۴۲) طی یک سال (۹۱-۱۳۹۰) جمع‌آوری و تحت شرایط دمایی ۴°C به آزمایشگاه انتقال داده شدند. از هر شماره سریال ۳ سویه واکسن به‌صورت تصادفی انتخاب شد.

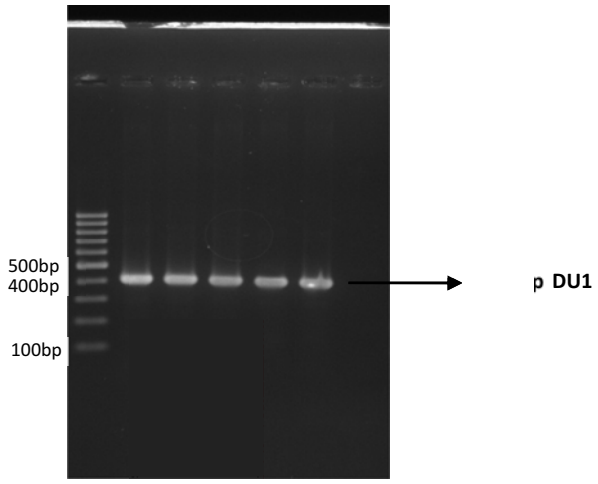
استخراج DNA: با روش CTAB انجام شد [۱۹، ۲۰]. تقریباً $CFU۲\times۱۰^{۹}$ از سویه باکتری در یک میلی‌لیتر بافر تریس-EDTA با pH ۷/۵، همراه با آنزیم لیزوزیم حل و به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷°C گرمخانه‌گذاری شد. پس از اضافه‌کردن ۱۰mg/ml پروتئیناز K و ۱۰٪ SDS مخلوط به‌مدت یک شب در دمای ۶۵°C قرار داده شد. ۱۰۰µl ۵ مولار به ۱۰۰µl از محلول CTAB اضافه شد و به‌مدت ۱۰ دقیقه در ۶۵°C قرار گرفت. سپس محلول با افزودن کلروفرم/ایزوآمیل‌الکل در ۱۲۰۰g به‌مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شد. مایع رویی به یک میکروتیوب جدید منتقل و ۴۵۰µl ایزوپروپانول اضافه شد تا DNA رسوب کند. نمونه یک شب در ۲۰°C- قرار گرفت و DNA رسوب‌کرده توسط میکروسانتریفوژ در ۱۲۰۰g برای ۱۵ دقیقه، با اتانول ۷۰٪ شسته و در ۵۰µl بافر TE حل شد. نمونه‌های DNA در دمای ۲۰°C- نگهداری شدند.

PCR ژن‌های RD14 و DU1: در این روش از ۴ پرایمر برای RD14 [۶] و DU1 [۷] استفاده شد. برنامه PCR و سایر شرایط تکثیر مشابه مطالعه *بدوال* و همکاران بود [۵]. PCR برای هر ژن، در حجم ۳۰µl با ۱۰۰ng DNA، ۱/۵mM $MgCl_2$، مخلوط dNTP ۰/۲mM، ۰/۴µM از هر یک از پرایمرها و ۱/۵واحد تکDNAپلیمراز انجام شد. برنامه PCR به‌صورت یک چرخه در ۹۴°C به‌مدت ۱۰ دقیقه، ۳۰ چرخه (۹۴°C به‌مدت ۱ دقیقه، ۵۵°C به‌مدت ۱ دقیقه و ۷۲°C به‌مدت ۲ دقیقه) و یک چرخه در ۷۲°C به‌مدت ۱۰ دقیقه بود. محصولات PCR توسط الکتروفورز افقی و ژل آگارز ۱/۵٪ با نردبان DNA ۱۰۰جفت‌بازی به‌عنوان نشانگر در بافر تریس- بوریک‌اسید-EDTA آنالیز شدند. نتایج PCR بعد از رنگ‌آمیزی ژل با اتیدیوم‌بروماید با کمک UVترانس‌لومیناتور بررسی شدند.

تعیین توالی DNA: تعیین توالی ناحیه RD16 در سویه‌های واکسن BCG صورت گرفت. برای آماده‌سازی DNA ناحیه RD16 برای تعیین توالی، این ناحیه با کمک پرایمرهای اختصاصی [۶] و با روش PCR مشابه حالت مربوط به ناحیه RD14 تکثیر شد. تعیین توالی ناحیه RD16 توسط DNAآنالایزر ABI3730XL (Bioneer؛ کره‌جنوبی) انجام شد و توالی‌ها با نرم‌افزارهای Chromas و Mega 4 آنالیز شدند.

VNTR تایپینگ: در این روش از ژن‌های MIRU4، MIRU40، MIRU26، MIRU24، VNTR1895 و VNTR11b استفاده شد. پرایمرهای VNTR-PCR به‌کاررفته مشابه پرایمرهای بیان‌شده توسط *سوپلای* و همکاران بود [۲۱]. PCR ژن‌های مورد نظر به‌صورت یک چرخه در ۹۴°C به‌مدت ۴ دقیقه، ۳۰ چرخه ترکیبی (۹۴°C به‌مدت ۳۰ ثانیه، دمای آنیلینگ برای ژن‌ها متفاوت به‌مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲°C به‌مدت ۳۰ ثانیه) و یک چرخه در ۷۲°C به‌مدت ۵ دقیقه بود (دمای آنیلینگ برای

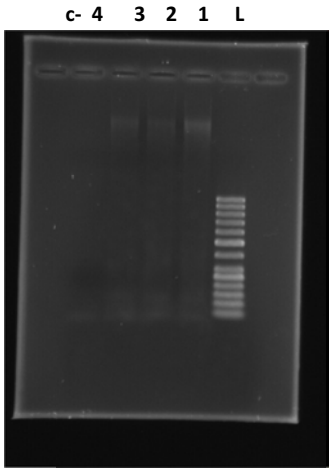
MIUR4 ۵۵°C، MIUR40 ۵۵/۶°C، MIUR24 ۶۱/۶°C، MIUR26 ۶۲/۸°C، VNTR1895 ۵۶/۱°C و VNTR11b ۶۶/۷°C بود). محصولات PCR توسط آگارز ژل الکتروفورز و سپس UVترانس‌لومیناتور آنالیز شدند.



شکل ۱) PCR ژن DU1 در سویه‌های BCG. ۱ تا ۵ سویه‌های BCG با شماره سریال‌های مختلف؛ L: نشانگر ۱۰۰جفت‌بازی

نتایج

تمام سویه‌ها از نظر کشت روی محیط مثبت بودند. همه سویه‌های BCG مورد بررسی یک محصول ۴۰۰bp داشتند که نشان‌دهنده حضور ناحیه مضاعف‌شدگی DU1 در کروموزوم باکتری‌ها بود (شکل ۱). هیچکدام از سویه‌ها دارای باند ۲۵۲bp که مشخص‌کننده حضور ژن RD14 است، نبودند (شکل ۲). تعیین توالی ناحیه RD16 در سویه‌های واکسن BCG نشان داد که همه نواحی RD16 دارای توالی مشابه با ناحیه RD16 در ژنوم سویه Pasture1173p2 بودند.



شکل ۲) PCR ژن RD14 در سویه‌های BCG. ۱ تا ۴ سویه‌های BCG با شماره سریال‌های مختلف؛ L: نشانگر ۱۰۰جفت‌بازی

تعداد و اندازه واحدهای تکراری برای ۶ جایگاه ژنی MIRU4، MIRU24، MIRU26، MIRU40، VNTR1895 و VNTR11b در ۲۸ سویه BCG مختلف در نمونه‌های واکسن به‌ترتیب ۱۲۲+(۲×۷۷)، ۳۹۳+(۲×۵۴)، ۲۸۵+(۵×۵۱)، ۳۵۴+(۲×۵۴)، ۲۸۱+(۴×۵۷) و ۶۷+(۳×۶۹) بود.

بحث

سازمان جهانی بهداشت در سال ۲۰۱۱ اعلام کرد که در این سال میزان بروز بیماری سل ۸/۷میلیون مورد بوده و طی این سال یک میلیون مورد مرگ به دلیل بیماری سل بین افرادی که مبتلا به HIV نبودند و ۰/۴۳میلیون مورد مرگ در افرادی که به‌طور همزمان به سل و HIV مبتلا بودند، رخ داده است [۲۲]. شیوع بیماری سل براساس مناطق جغرافیایی متغیر است و در ایران به عنوان یک کشور در حال توسعه، میزان بروز این بیماری نسبت به کشورهای اروپایی و آمریکای شمالی بیشتر است [۲۲]. در ایران بروز بیماری سل در نواحی مختلف متفاوت است. به عنوان مثال در منطقه جنوب شرقی ایران ۱۳۲ مورد در هر یک میلیون نفر گزارش شده است [۲۳]. هم‌مرزبودن ایران با افغانستان، پاکستان و عراق دلیلی عمده برای بالابودن میزان بیماری سل به‌خصوص در مناطق مرزی است.

گسترش جهانی سویه‌های *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* با مقاومت چندداروییو سویه‌های با مقاومت دارویی وسیع و همچنین عفونت همزمان *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* با HIV در بسیاری از بخش‌های دنیا، نیاز مبرم به کنترل بیماری سل را می‌طلبد [۱، ۲۴]. واکسن BCG (حاوی سویه ضعیف‌شده *مایکوباکتریوم بویس*) تنها واکسن در دسترس علیه بیماری سل است [۲۴] و از سال ۱۹۲۱ این واکسن برای میلیاردها نفر استفاده شد [۱]. تخمین‌زده‌شده که بیش از ۳میلیارد نفر با واکسن BCG ایمن شده‌اند و بیش از ۱۰۰میلیون دوز از این واکسن هرساله مورد استفاده قرار می‌گیرد [۲۵]. طبق یک گزارش، در بیشتر کشورهای توسعه‌یافته از یک سویه BCG به‌عنوان واکسن استفاده می‌شود. از طرف دیگر، در بسیاری از کشورهای با شیوع بالای بیماری سل، واکسن توسط یونیسف/سازمان جهانی بهداشت و اتحادیه جهانی برای واکسن‌ها و ایمنی‌زایی تامین می‌شود. با توجه به این مطالعه، ایران از یک سویه BCG تولیدشده در داخل استفاده نموده که نوع این سویه BCG مشخص نیست [۱۸].

با توجه به نتایج این بررسی، ناحیه حذفی RD14 در هیچ یک از سویه‌های مورد مطالعه وجود نداشتند. از طرف دیگر سویه Pasture1173p2 تنها زیرسویه‌ای است که فاقد ناحیه RD14 بوده و توسط این خصوصیت از سایر سویه‌های BCG قابل افتراق است [۵، ۶]. بنابراین با توجه به این مطلب، تمام سویه‌های این مطالعه به‌عنوان سویه‌های Pasture1173p2 تشخیص داده

شدند. همچنین در این مطالعه، نتایج PCR ناحیه مضاعف‌شدگی DU1 نمونه‌های BCG مشخص نمود که تمام نمونه‌ها دارای این ناحیه هستند و مطالعات مختلف نشان می‌دهند سویه Pasture1173p2 تنها سویه بین سویه‌های BCG است که دارای ناحیه DU1 است [۷، ۸، ۲۶]. این مطلب با نتایج ما همخوانی داشته و بنابراین سویه‌های مورد بررسی سویه‌های BCG Pasture1173p2 هستند.

در بسیاری از مطالعاتی که صورت گرفته از روش MIRU-VNTR تایپینگ به‌عنوان روش تایپینگ مولکولی قابل اعتماد و مناسب برای افتراق ایزوله‌های مختلف مایکوباکتریوم‌های کلینیکی استفاده شده است. در برخی از این مطالعات با کمک این روش و بر اساس ۱۲ جایگاه ژنی حاوی VNTR، نمونه‌های *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* ژنوتایپینگ شده‌اند [۲۱، ۲۷]. در مطالعات دیگری که انجام گرفته، از روش MIRU-VNTR تایپینگ برای تعیین الگوی مولکولی نمونه‌های *مایکوباکتریوم بویس* با استفاده از جایگاه‌های ژنی مختلف VNTR استفاده شده است [۱۰، ۲۸] و باید توجه داشت که باکتری BCG در حقیقت سویه ضعیف‌شده *مایکوباکتریوم بویس* بوده و توالی ژنوم این دو باکتری مشابه هم است. در مطالعه‌ای که توسط *استفانووا* و همکاران صورت گرفت، پروفایل VNTR سویه Sofia براساس ۶ جایگاه ژنی VNTR تعیین شد [۲۹].

طی این مطالعه، ۶ جایگاه ژنی VNTR در نمونه‌های واکسن BCG بررسی شد و الگوی VNTR به صورت ۲- ۴- ۳- ۲- ۲- ۵ بود. یکی از توالی‌های تکراری مهمی که در کروموزوم BCG وجود داشته و برای افتراق سویه‌های مختلف BCG از یکدیگر استفاده می‌شود، در ناحیه MIRU4 قرار داشته و تعداد تکرار این توالی ۷۷جفت‌بازی در سویه‌های مختلف BCG متفاوت است. با توجه به یافته‌های این مطالعه تعداد تکرار این توالی در همه سویه‌های مورد مطالعه ۲ بود و سویه Pasture1173p2، سویه‌ای است که دارای ۲ تکرار از این توالی است و این نتیجه با نتایج سایر مطالعات همخوانی دارد [۸، ۲۶]. همچنین الگوی سایر نواحی VNTR در واکسن‌های مورد بررسی مشابه نتایج مطالعات دیگر بوده و الگوی VNTR به‌دست‌آمده در این مطالعه با الگوی سویه Pasture1173p2 یکسان است [۱۰]. در این مطالعه برای تایید نهایی سویه مورد استفاده به‌عنوان واکسن در ایران، ناحیه RD16 در ژنوم سویه‌ها تعیین توالی شد و نتایج این تعیین توالی، بیان‌کننده این مطلب بود که سویه واکسن BCG ایران، همان سویه Pasture1173p2 است.

از جمله مشکلات این مطالعه می‌توان به محدودیت و صرف زمان طولانی در جمع‌آوری نمونه‌های واکسن BCG (با توجه به اینکه تولید هر واکسن BCG با شماره سریال جدید نیاز به زمان طولانی دارد) اشاره نمود.

نتیجه‌گیری

سویه BCG مورد استفاده در ایران، همان سویه Pasture1173p2 است و می‌توان از آن به عنوان واکسن استفاده نمود.

تشکر و قدردانی: نویسندگان مراتب سپاس خود را از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی و همچنین آقایان صدرایی و زمانی که در تهیه واکسن‌های BCG نقش بسزایی داشتند، اعلام می‌دارند.

منابع

1- Behr MA. BCG-different strains, different vaccines. Lancet Infect Dis. 2002;2(2):86-92.
2- Herr H, Morales A. History of Bacillus calmette-guerin and bladder cancer: An immunotherapy success story. J Urol. 2008;179:53-6.
3- Behr MA. Comparative genomics of BCG vaccines. Tuberculosis. 2001;81(1/2):165-8.
4- Pym A, Brodin P, Brosch R, Huerre M, Cole S. Loss of RD1 contributed to the attenuation of the live tuberculosis vaccines Mycobacterium bovis BCG and Mycobacterium microti. Mol Microbiol. 2002;46(3):709-17.
5- Bedwell J, Kairo SK, Behr MA, Bygraves JA. Identification of substrains of BCG vaccine using multiplex PCR. Vaccine. 2001;19:2146-51.
6- Behr MA, Wilson MA, Gill WP, Salamon H, Schoolnik GK, Rane S, et al. Comparative genomics of BCG vaccines by whole-genome DNA microarray. Science. 1999;284:1520-3.
7- Brosch R, Gordon S, Garnier T, Eiglmeier K, Frigui W, Valenti P, et al. Genome plasticity of BCG and impact on vaccine efficacy. Proc Natl Acad Sci. 2007;104(13):5596-601.
8- Knezevic I, Corbel MJ. WHO discussion on the improvement of the quality control of BCG vaccines. Pasteur Institute, Paris, France, 7 June 2005 (Meeting report). Vaccine. 2006;24(18):3874-7.
9- Magdalena J, Supply P, Locht C. Specific differentiation between Mycobacterium bovis BCG and virulent strains of the Mycobacterium tuberculosis complex. J Clin Microbiol. 1998;36(9):2471-6.
10- Roring S, Scott AN, Hewinson RG, Neill SD, Skuce RA. Evaluation of Variable Number Tandem Repeat (VNTR) loci in molecular typing of Mycobacterium bovis isolates from Ireland. Vet Microbiol. 2004;101(1):65-73.
11- European Pharmacopoeia Commission. BCG vaccine, freeze dried. European pharmacopoeia. 6th ed. Strasbourg: Council of Europe; 2008.
12- Donikian R, Gheorghiu M, Jablokova TB. Requirements for dried BCG vaccine. WHO Tech Rep Ser. 1987:60-92
13- Markey K, Hoa MM, Choudhurya B, Sekib M, Juc L, Castello-Brancod L RR, et al. Report of an international collaborative study to evaluate the suitability of multiplex PCR as an identity assay for different sub-strains of BCG vaccine. Vaccine. 2010;28:6964-9.
14- Okazaki T, Ebihara S, Takahashi H, Asada M, Sato A, Seki M, et al. Multiplex PCR-identified cutaneous

tuberculosis evoked by Mycobacterium bovis BCG vaccination in a healthy baby. J Clin Microbiol. 2005;43(1):523-5.
15- Kim SH, Kim SY, Eun BW, Yoo WJ, Park KU, Choi EH, et al. BCG osteomyelitis caused by the BCG Tokyo strain and confirmed by molecular method. Vaccine. 2008;26:4379-81.
16- Talbot E, Williams D, Frothingham R. PCR identification of Mycobacterium bovis BCG. J Clin Microbiol. 1997;35(3):566-9.
17- Allix C, Supply P, Fauville-Dufaux M. Utility of fast mycobacterial interspersed repetitive unit-variable number tandem repeat genotyping in clinical mycobacteriological analysis. Clin Infect Dis. 2004;39(6):783-9.
18- Ritz N, Curtis N. Mapping the global use of different BCG vaccine strains. Tuberculosis. 2009;89:248-51.
19- Ausubel F, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, et al. Short protocols in molecular biology. 5th ed. New York: John Wiley and Sons; 2002.
20- Somerville W, Thibert L, Schwartzman K, Behr MA. Extraction of Mycobacterium tuberculosis DNA: A question of containment. J Clin Microbiol. 2005;43(6):2996-7.
21- Supply P, Allix C, Lesjean S, Cardoso-Oelemann M, Rusch-Gerdes S, Willery E. Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of Mycobacterium tuberculosis. J Clin Microbiol. 2006;44(12):4498-510.
22- World Health Organization. Global TB database. Geneva: World Health Organization; 2012. Available from: http://www.who.int/tb/country/global_tb_database/en/;2012
23- Khazaei HA, Rezaei N, Bagheri GhR, Dankoub MA, Shahryari Kh, Tahai A. Epidemiology of tuberculosis in the southeastern Iran. Eur J Epidemiol. 2005;20:879-83.
24- Liu J, Tran V, Leung A, Alexander D, Zhu B. BCG vaccines: Their mechanisms of attenuation and impact on safety and protective efficacy. Hum Vac. 2009;5(2):70-8.
25- World Health Organization. BCG vaccine. WHO position paper. Wkly Epidemiol Rec. 2004;79:27-38.
26- Brosch R, Gordon S, Buchrieser C, Pym A, Garnier T, Cole S. Comparative genomics uncovers large tandem chromosomal duplications in Mycobacterium bovis BCG Pasteur. Yeast. 2000;17(2):111-23.
27- Cowan LS, Mosher L, Diem L, Massey JP, Crawford JT. Variable-number tandem repeat typing of Mycobacterium tuberculosis isolates with low copy numbers of IS6110 by using mycobacterial interspersed repetitive units. J Clin Microbiol. 2002;40(5):1592-602.
28- Duarte E, Domingos M, Amado A, Cunha M, Botelho A. MIRU-VNTR typing ads discriminatory value to groups of Mycobacterium bovis and Mycobacterium caprae strains defined by spoligotyping. Vet Microbiol. 2010;143(2-4):299-306.
29- Stefanova T, Chouchkova M, Hinds J, Butcher P, Inwald J, Dale J, et al. Genetic composition of Mycobacterium bovis BCG substrain Sofia. J Clin Microbiol. 2003;41(11):5349.