Research on Medicine *Original Article*

The Quarterly journal of School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences Vol.39; No.1; 2015

Molecular Characterization of Mycobacterium Strains Isolated from Children with BCG Induced Lymphadenitis

Fatemeh Shahi[1] , Fatemeh Fallah[1], Hossein Goudarzi[1] , Maryam Baniasad[2], Bahman Pourabbas[3], Alireza Mohammadzade[4], Farahnoosh Doustdar[1],[*]

1. Department of Microbiology,School of medicine, Shahid Beheshti University of Medical sciences, Tehran, Iran.
2. School of Pharmacy, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran.
3. Professor Alborzi Clinical Microbiology Research Center, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran
4. Department of Microbiology,School of medicine, Gonabad University of Medical sciences, Gonabad, Iran

(Received: 2015/4/29 Accept: 2016/9/30)

Abstract

Backgroundm: *In Iran vaccination with Bacillus Calmette-Guérin (BCG) is performed on all newborns within the first days of life for prevention of tuberculosis. It is a live attenuated vaccine and produced from genetically different vaccine strains of Mycobacterium bovis. This vaccine is safe but local adverse reactions such as administration site abscess and lymphadenitis occur in some healthy children vaccinated with this vaccine as the most common side effect of BCG vaccination. Disseminated BCG infections are very rare in immunocompetent children but lymphadenitis is very common in Iran and other countries. It is indicated that the vaccine strain and it's genetically variations are correlated with these side effects. Therefore, in this study we aimed to analyze the genetic characterizations of vaccine strains used in Iran.*

Materials and Methods: *Thirty infants showing lymphadenitis induced by BCG vaccination were chosen for this study. After aspiration from the lesions, they were subjected to acid fast staining and culture on Lowenstein Jensen medium. Subsequently, DNA was extracted from samples using Phenol–chloroform method. The genus of the isolates was characterized by primer for 16sRNA gene. Then using RD1, RD14 and DU1 primers and in the next step RD9, RD4Deleted, RD4Present and RD1Deleted primers the species and strains of the isolates were characterized.*

Results: *Performing 16sRNA PCR, all 30 samples of acid fast bacilli were confirmed as Mycobacterium genus. Then using RD1, RD14, DU1, RD9, RD4 Deleted, RD4 Present and RD1 Deleted primers all isolates were detected as Mycobacterium bovis BCG strain Pasteur.*

Conclusion: *In this study all of the strains isolated from the patients were detected as Mycobacterium bovis BCG strain Pasteur. Therefore, the other possible factors causing BCG complications including BCG overdose, faulty intradermal technique, and disturbance of cellular immunity should be considered as the other risk factors of causing lesions.*

Keywords: *Mycobacterium bovis, BCG vaccine, Lymphadenitis, Tuberculosis, Infants.*

• *Corresponding author: Farahnoosh Doustdar, Department of Microbiology,School of medicine, Shahid Beheshti University of Medical sciences, Tehran, Iran.*
Email: f_doustdar@yahoo.com

پژوهش در پزشکی
فصلنامه علمی پژوهشی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی
مقاله پژوهشی
دور۳۹، شماره ۱، ۱۳۹٤، صفحات ۳۰ تا ۳۵

بررسی مولکولی سویه مایکوباکتریوم‌های جدا شده از ترشحات لنفاوی کودکان مبتلا به لنفادنیت ناشی از واکسیناسیون با واکسن BCG

فاطمه شاهی[۱]، فاطمه فلاح[۱]،حسین گودرزی[۱]، مریم بنی اسد[۲]، بهمن پورعباس[۳]، علیرضا محمد زاده[۴]، فرحنوش دوستدار[۱]*

۱گروه میکروبیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.
۲ دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران.
۳ مرکز تحقیقات میکروب شناسی بالینی استاد البرزی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران.
۴ گروه میکروبیولوژی ، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گناباد، گناباد، ایران.

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۴/۲/۹ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۴/۷/۸

چکیده

سابقه و هدف: در ایران واکسیناسیون با باسیل کلمت و گرین(ب ث ژ) در نوزادان براي پیشگیري از بیماري سل در بدو تولد انجام مي‌شود. واکسن(ب ث ژ) یک واکسن زنده ضعیف شده است که از سویه‌های ژنتیکی مختلف مایکوباکتریوم بوویس تهیه می‌شود. این واکسن ایمن است اما به دنبال واکسیناسیون، واکنش‌های موضعی مانند آبسه در محل تزریق و لنفادنیت به عنوان شایع‌ترین عوارض واکسن در بعضی از کودکان سالم مشاهده می‌شود. عوارض شدید و سیستمیک در کودکان با سیستم ایمنی سالم به ندرت دیده می‌شود، ولی لنفادنیت در ایران و سایر کشورها با شیوع به نسبت زیادي در کودکان با سیستم ایمني سالم نیز دیده مي‌شود. ازآنجاکه تحقیقات نشان داده که میزان این عوارض با نوع سویه واکسن و تغییر ژنتیکي آن در ارتباط است، در این تحقیق سویه‌هاي مایکوباکتریوم جدا شده از کودکان مبتلا به لنفادنیت از لحاظ گونه و سویه باکتری بررسی شدند.

روش بررسی: ۳۰ نوزاد باعلائم لنفادنیت ناشی از واکسن (ب ث ژ) برای این تحقیق انتخاب شدند. پس از آسپیراسیون ترشحات از ضایعات مراحل رنگ‌آمیزی اسیدفست و کشت روی محیط لوون اشتاین جانسون انجام شد. سپس استخراج *DNA* از نمونه ها به روش فنل کلروفرم انجام وبا استفاده از *PCR* ژن *16sRNA* جنس باکتری مشخص شد. برای تعیین گونه و سویه باکتری ها از پرایمرهای *RD14*, *DU1* و *RD1* و در مرحله بعد از پرایمرهای *RD9*، *RD4Deleted*، *RD4Present* و *RD1Deleted* استفاده شد.

یافته‌ها: تمامی ۳۰ نمونه باسیل اسیدفست که از کودکان مبتلا به لنفادنیت ناشی از واکسن *BCG* جدا شده بودند با استفاده از روش *PCR* ژن *16sRNA* به عنوان جنس مایکوباکتریوم شناخته شدند.سپس با استفاده از *PCR* ژن‌های *RD4*, *DU1*, *RD14*, *RD9*, *RD1 Deleted*، *RD4Present* و *RD1Deleted* تمامی ۳۰ نمونه به عنوان مایکوباکتریوم بوویس *(BCG)* سویه پاستور شناسایی شدند.

نتیجه‌گیری: با توجه به اینکه ۱۰۰ درصد از نمونه‌های مایکوباکتریوم‌های جدا شده از لنفادنیت کودکان در این مطالعه به عنوان مایکوباکتریوم بوویس (ب ث ژ) سویه پاستور شناخته شدند،می‌توان این گونه نتیجه گیری کرد که ایجاد لنفادنیت در کودکان به دنبال واکسیناسیون با واکسن (ب ث ژ) بیشتر ناشی از عوامل دیگر از جمله مقدار واکسن مصرفی، روش تزریق و پاسخ‌های التهابی سیستم ایمنی این کودکان نسبت به واکسن ا.

واژگان کلیدی: بیماری سل، مایکوباکتریوم بوویس، واکسن *BCG*، لنفادنیت، نوزادان.

مقدمه

سل به عنوان یک مشکل بزرگ بهداشت عمومی جهانی به ویژه درکشورهای جهان سوم باقیمانده است.
مهم‌ترین عوارض آن درکودکان منتگوانسفالیت است که بامرگ ومیربالایی همراه است.(۱) واکسیناسیون با واکسن ب ث ژ یکی از فاکتورهای اساسی در کنترل این بیماری است.(۲) واکسن ب ث ژ یک واکسن زنده ضعیف شده است که ازیک سویه ازمایکوباکتریوم بوویس به دست آمده است.(۳) سازمان بهداشت جهانی وسازمان یونیسف واکسیناسیون ب ث ژ را درکشورهای درحال توسعه باشیوع بیشتراز یک درصد عفونت توصیه کرده است.(۴)
واکسیناسیون تمام نوزادان با این واکسن در ایران و دیگر کشورهای در حال

نویسنده مسئول: فرحنوش دوستدار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.
ایمیل: *f_doustdar@yahoo.com*

توسعه یک روش استاندارد است و تمامی نوزادان این واکسن را در روز اول یا دوم بدو تولد دریافت می کنند (۵). این واکسن به طور کلی ایمن در نظر گرفته می شود اما عوارض نادر ممکن است در حدود ۱٫۹درصد از موارد رخ دهد. این عوارض شامل لنفادنوپاتی ناحیه ای، آبسه زیرجلدی، استئومیلیت، اگزمای واکسیناسیون، اسکار هایپرتروفیک و تشکیل کلوئید است که اغلب خودمحدودشونده هستند و نیازی به درمان ندارند. از سوی دیگر بیماری منتشر ب ث ژ عمدتا در کودکان مبتلابه بیماری نقص ایمنی شدید (SCID) بیماری گرانولوماتوز مزمن (CGD) وبزرگسالان مبتلا به ایدز دیده می شود.(۵) لنفادنیت حدود ۹۸درصد این عوارض رابه خوداختصاص داده است. دو نوع ازلنفادنیت وجوددارد؛لنفادنیت ساده و لنفادنیت غیرچرکی که معمولابعدازچندهفته خودبه خود بهبود می یابد.لنفادنیت مرتبط باواکسیناسیون بابزرگ شدن غددلنفاوی ناحیه‌ای بدون هیچ دلیلی برای لنفادنوپاتی مشخص می‌شود. عدم وجودتب،حساسیت به فشار ولمس و دیگرعلائم سیستمیک آن راازآدنیت چرکی متمایزمی‌کند. تمایزآن ازلنفادنیت سلی ممکن است سخت باشداما مواردسل جداشده ازغددلنفاوی زیربغل نادراست.(۱) درنوزادان اثرحفاظتی واکسن بین حدود۵۲ تا ۱۰۰درصد برای جلوگیری ازمننژیت سلی وسلارزنیو ۲درصد تا ۸۰درصدبرای جلوگیری ازسل ریوی تخمین زده شده است. دلایل بسیاری برای تغییراثرواکسن وجوددارد‌ازجمله کیفیت واکسن،سویه واکسن،ژنتیک میزبان،تغذیه وقرارگرفتن واکسن درمجاورت نورماوراء بنفش.(۷ و ۶)

به دلیل اینکه ب ث ژ باید هر چند هفته کشت مجدد شود و شرایط کشت استاندارد شده نیستند، زیرسویه‌های متفاوتی ازآن به وجود آمده‌اند. روش‌های کنترل ارائه شده ازسوی سازمان بهداشت جهانی برای تشخیص ب ث ژ واکسن، شامل انجام رنگ آمیزی اسید فست که فقط وجود مایکوباکتریوم را اثبات می کند، است. این روش نمی تواند زیرسویه‌های ب ث ژ را از همدیگر و از سایر اعضای کمپلکس مایکوباکتریوم متمایز کند. بنابراین استفاده از تکنیک‌هایی که از اسید نوکلئیک استفاده می‌کنند به عنوان یک روش جایگزین معرفی شده است. این تکنیک‌ها باید ارزان، اختصاصی، سریع و قابل تکثیر باشند.(۸) روش‌های مولکولی که برای شناسایی مایکوباکتریوم‌ها هستند به طور عمده بر اساسMultiplex PCR ، PCR یا VNTR-typing هستند.در پاساژهای مکرر BCG توسط کالمت و گرین، ناحیه RD1 از DNA گونه بیماریزای مایکوباکتریوم بوویس حذف شد که باعث به وجود آمدن سویه تضعیف شده BCG شد. به دنبال ان ناحیه RD14 نیز از سویه BCG Pasture1173p2” حذف شد(۹). مضاعف شدگی DU1 فقط در سویه پاستور وجود دارد و می توان از این خصوصیات برای تشخیص آن استفاده کرد(۸). بنابراین هدف این مطالعه شناسایی مایکوباکتریوم‌های جدا شده از کودکان مبتلا به لنفادنیت با روش ، PCR Multiplex PCR و با استفاده از پرایمرهای نواحی DU1، RD1 و RD14 است.

مواد و روش کار

با توجه به سختی و محدودیت‌های موجود در زمینه تهیه نمونه برای انجام این تحقیق، از نمونه ترشحات لنفاوی ۳۲ کودک مبتلا به لنفادنیت ناشی از واکسن ب ث ژ که طی سال ۱۳۹۰ به مراکز بهداشتی– درمانی شیراز مراجعه کرده بودند، استفاده شد. پس از تشخیص لنفادنیت ناشی از واکسن ب ث ژ در این کودکان از سوی پزشک متخصص، نمونه‌گیری به روش آسپیراسیون با سرنگ استریل از ترشحات لنفاوی انجام شد و نمونه‌ها در کنار یخ برای کشت به آزمایشگاه انتقال داده شدند. نمونه‌گیری از این کودکان برای تشخیص و درمان بیماری انجام گرفته بود، بنابراین برای تهیه نمونه این تحقیق، تماس مستقیم با بیمار وجود نداشت. مایکوباکتریوم توبرکلوزیس سویه H37Rv و مایکوباکتریوم بوویس (ب ث ژ) سویه پاستور 1173P2 به عنوان سویه استاندارد استفاده شدند.

مراحل کشت و رنگ‌آمیزی و استخراج DNA

مراحل رنگ آمیزی ذیل نلسون روی لام از ترشحات انجام و نمونه‌ها روی محیط لوون اشتاین– جانسون (AcumediaCode No. (7245A کشت داده شدند و به مدت چهار تا هشت هفته در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شدند.پس از مشاهده کلونی، استخراج DNA با روش فنل – کلروفرم انجام شد. به این ترتیب که ابتدا کلنی‌ها در لوله فالکون حاوی بیدهای شیشه‌ای سوسپانسیون شدند سپس لیزوزیم (25 mg; Roche, Germany)، (RNase A(50 µg; Roche, Germany و 1.5 mg of proteinase K (Roche, Germany) به باکتری‌ها اضافه شدند و نمونه‌ها به مدت ۱۶ ساعت در ۴۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. در مرحله بعد مخلوط فنل– کلروفرم وایزو آمیل الکل با نسبت حجم (۲۵/۲۴/۱) و به مدت دو ساعت در دمای محیط نگهداری شدند. سپس محلول رویی جدا شدد و این بار مخلوط کلروفرم– ایزو آمیل الکل به حجم (۲۴/۱) به نمونه ها اضافه و نمونه‌ها سانتریفیوژ شدند. نمونه‌های DNA با اضافه کردن سدیم استات ۳ مولار و ایزوپروپانل رسوب داده شدند و سپس با اتانل ۷۰ درصد شسته شده و پس از خشک شدن در بافر مناسب محلول شدند.(۱۰)

PCR

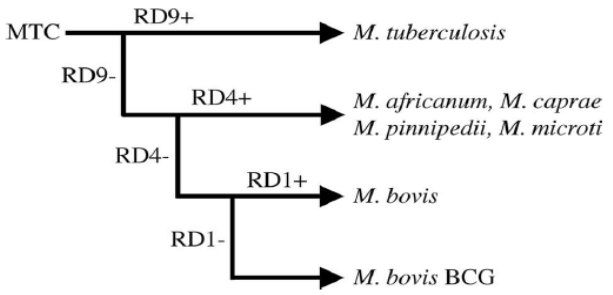
PCRدرحجم µL۲۵انجام‌شدکه‌شامل (Ampliqon)Mastermix، 10pmolاز هر کدام از پرایمرهای Revers و Forward و µL ۱ از DNA الگومی شد.

PCR نواحی 16srRNA مایکوباکتریال، RD1، DU1 و RD14:

پرایمرهای مورد استفاده در جدول شماره یک آمده است. برنامه دمایی واکنش‌ها،یک چرخه °C ۹۴ به مدت چهار دقیقه،۳۰ چرخه۹۴ °C به مدت۳۰ ثانیه، °C ۵۵ برای DU۱,RD۱۴,RD۱ و °C ۶۳برای ۱۶srRNA به مدت ۳۰ ثانیه، یک چرخه °C ۷۲ به مدت ۳۰ ثانیه و°C72 به مدت پنج دقیقه اعمال شد و محصولات PCR با استفاده از اگاروز ۱/۵ درصد بررسی شدند. نمونه‌هایی که با پرایمرهای ذکر شده مورد تایید قرار نگرفتند با پرایمرهای جدول دو بررسی شدند.

PCR نواحی RD4Present، RD4Deleted، RD9 و RD1Deleted:

پرایمرهای مورد استفاده در جدول دو آمده است.برنامه دمایی واکنش‌ها، یک چرخه °C۹۴ به مدت چهار۴ دقیقه، ۳۰ چرخه °C۹۴به مدت ۳۰ ثانیه، °C۵۹ به مدت ۳۰ ثانیه، یک چرخه°C۷۲ به مدت ۳۰ ثانیه و °C ۷۲ به مدت پنج دقیقه اعمال شد و محصولات PCR با استفاده از اگاروز ۱٫۵درصد بررسی شدند.



شکل ۱. الگوی ساده تکاملی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس که وجود یا عدم وجود نواحی RD را در گونه‌های مختلف نشان می دهد.(۱۱)

پس از انجام PCR برای ناحیه DU1 و RD1Deleted،تعیین توالی این نواحی از سوی شرکت Macrogene کره جنوبی انجام شد و توالی‌ها با نرم افزار Chromas آنالیز شد.

نتایج:

از مجموع ۳۰نمونه،۱۰نمونه مربوط به نوزادان دختر (۳۳/۳درصد) و ۲۰نمونه

جدول شماره ۱. پرایمرهای مورد استفاده برای تشخیص مایکوباکتریوم های جدا شده از نمونه های لنفادنیت در حد سویه و گونه

Target and primer name	Primer sequence (5–3)	Product lengths (bp)	Reference
RD 1 ET1 ET2 ET3	AAGCGGTTGCCGCCGACCGACC CTGGCTATATTCCTGGGCCCGG GAGGCGATCTGGCGGTTTGGGG	۱۹۶	(8)
RD14 RD14 L RD14 R	CAGGGTTGAAGGAATGCGTGTC CTGGTACACCTGGGGAATCTGG	–	(8)
DU1 DU1 F DU1 R	ACGGTCGGTGTCGTCTAAGT AGAACTGCAGGGGTGGTACA	۴۰۰	(10)
Mycobacterial 16S rRNA Genus Control F Genus Control R	CAACGCGAAGAACCTTACCT TGCACACAGGCCACAAGGGA	۷۸	(11)

جدول شماره ۲. پرایمرهای مورد استفاده در تایید مایکوباکتریومهای جدا شده از نمونه های لنفادنیت به عنوان BCG سویه پاستور

Target and primer name	Primer sequence (5–3)	Product lengths (bp)	Reference
RD9 present RD9 Present F RD9 Present R	TTTCGAGCCGTAAATTACTGTG GAGCATTCTCGCTCCGAAT	۵۱	(11)
RD1 deleted RD1 Deleted F RD1 Deleted R	GGATTTGACGTCGTGCTTCT TTCAACGGGTTACTGCGAAT	۲۲۶	(11)
RD4 present RD4 Common F RD4 Deleted R	AGAAGCGCAACACTCTTGGA CATGCGCCCTATTTGATCTC	۵۵	(11)
RD4 deleted RD4 Common F RD4 Deleted R	AGAAGCGCAACACTCTTGGA TTGCTGAAAAATGGCTATTGA	۹۴	(11)

مربوط به نوزادان پسر(۶۶/۶درصد) بودند. سن بیماران در زمان مراجعه به پزشک بین دو تا ۲۴ ماه بود که بیشترین تعداد بیماران در محدوده سنیدو تا هفت ماه بودند (با میانگین سنی: ۶/۵۴ وانحراف معیار: ۵/۱۰).۲۰ نفر (۶۶/۶درصد)از بیماران فقط مبتلا به لنفادنیت و فاقد علامت بالینی دیگر بودند. سایر بیماران دارای علائمی مانند تب، سرفه، هپاتومگالی، اسپلینومگالی، تنگی نفس، آسیت، راش پوستی و آبسه ریوی بودند.بیشترین علامت بیماران به ترتیب سرفه (۱۵/۶۲۵درصد)، تب (۹/۳۷۵درصد) و هپاتومگالی (۹/۳۷۵درصد) بود. دو نفر (۶/۶۶درصد) از کودکان به بیماری منتشر ب ث ژیوزیس با علائم هپاتومگالی، اسپلینومگالی، آسیت و راش پوستی مبتلا شدند که به فوت آن‌ها منجر شدکه این دو کودک دارای نقص سیستم ایمنی بودند. در مجموع از این بیماران ۳۰ نمونه باسیل اسید فست جدا شد.

۳۰ مورد (۱۰۰درصد) از۳۰نمونه باسیل اسید فستی که از ترشحات لنفادنیت جداسازی شدندبااستفاده از ژن 16srRNA به عنوان جنس مایکوباکتریوم شناخته شدند.این نمونه‌ها با پرایمرهای جدول شماره یک بررسی شدند.تمامی نمونه‌ها فاقد ناحیه RD14 بودند. دو نمونه(۶۶/۶درصد) (نمونه‌های شماره ۸ و۱۳) فاقد ناحیه RD1، ۳ نمونه (۱۰درصد) (نمونه‌های شماره ۱۳،۲۸و۳۳) فاقد ناحیه DU1 بودند. بنابراین به طور کلی ۲۵ نمونه با این پرایمرها به عنوان BCG سویه پاستور تایید شدند. پنج نمونه باقی مانده با استفاده از پرایمرهای جدول ۲بررسی شدند. این نمونه‌ها در بررسی بااستفاده از پرایمر RD9 و RD4Present باندی نشان ندادند و با استفاده از پرایمرهای RD4Deleted و RD1Deleted به ترتیب باندهای 94bp و 226bp را تشکیل دادند و به عنوان BCG سویه پاستور تایید شدند. همچنین نتایج تعیین توالی ناحیه RD1 و DU1 جدا شده از نمونه ها پس از بلاست در NCBI با مایکوباکتریوم بوویس سویه پاستور 1173p2 مطابقت داشت.

بحث

واکسن‌های BCG، واکسن‌های زنده‌ای هستند که از سویه‌ای از مایکوباکتریوم بوویس گرفته شده‌اند که نخستین بار از سوی کالمت و گرین در انیستیتو پاستور فرانسه غیر فعال شدند. این واکسن نخستین بار در سال ۱۹۲۱ برای انسان استفاده شد.(۵) عوارض جانبی واکسن BCG با عنوان بیماری BCG شامل عوارض موضعی و منتشر است.عوارض منتشر به ندرت در کودکان با سیستم ایمنی سالم دیده می‌شود و بیشتر در کودکان با نقایص ایمنی دیده می‌شود، ولی عوارض موضعی در کودکان با سیستم ایمنی سالم نیز با درصد نسبتا بالایی دیده می‌شود. فراوان‌ترین عوارض موضعی شامل لنفادنیت و آبسه‌های موضعی است.(۱۲) شیوع لنفادنیت ناشی از واکسن BCG به فاکتورهای مانند تغییر ژنتیکی واکسن، نژاد مورد استفاده در واکسن، باقی ماندن ویرولانس زیرسویه‌های واکسن، نسبت باسیل زنده به مرده در محصول نهایی واکسن، قرار گرفتن واکسن در برابر اشعه، دوز واکسن، سن واکسیناسیون (تزریق واکسن در دوره نوزادی با افزایش احتمال ابتلا با لنفادنیت مرتبط است)و پاسخ ایمونولوژیک فرد به واکسن بستگی دارد. حتی مهارت افرادی که واکسن را به صورت داخل پوستی تزریق می کنند نیز می‌تواند به عنوان یک فاکتور خطر مهم محسوب شود. (۱۴و ۱۳) بر اساس گزارش‌های WHO، مدرکی موجود نیست که نشان دهد روش‌های مختلف تهیه واکسن آثار مختلفی را نشان می دهد، ولی بروز واکنش‌های جانبی ناشی از واکسن در ارتباط با روش‌های تهیه واکسن بوده است. همچنین در بعضی از تحقیق‌ها افزایش عوارض بعد از استفاده از واکسن حاوی نژاد جدید مورد توجه قرار گرفته است.(۱۵) در اتریش بعد از سال ۱۹۹۰ به دنبال افزایش عوارض ناشی از واکسن بخصوص لنفادنیت از ۰/۳درصد به ۷/۵ درصد، استفاده از واکسن سویه پاستور متوقف شد.(۴) در مالزی در سال ۱۹۹۰ بعد از تغییر سویه واکسن از سویه Japanese به سویه Pasteur یک اپیدمی لنفادنیت BCG در نوزادان مشاهده شد.(۱۶)

واکسیناسیون با BCG دارای کارایی متفاوتی در پیشگیری از سل دارد. به نظر می‌رسد که بعضی از این تفاوت‌ها ناشی از تفاوت بین سویه‌های موجود درواکسن‌هاست. برای بررسی این موضوع نوزادان در مکزیک با یکی از سه نژاد مختلف BCG-Brazil[BBCG], BCG-Denmark [DBCG], or BCG-Japan [JBCG] واکسینه شدند. یک سال بعد از واکسیناسیون منوسیت‌های خون محیطی این نوزادان از لحاظ پاسخ به پروتئین‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس بررسی شد. کودکانی که با BBCG و DBCG واکسینه شده بودند پاسخ سایتوکاینی بالاتری در ارتباط با پاسخ ایمنی adaptive نشان دادند در حالی که نوزادان واکسینه با JBCG پاسخ سایتوکاینی مرتبط با پاسخ‌های پیش التهابی را القا کرد. بنابراین نژادهای مختلف BCG می‌توانند مسیرهای ایمنی متفاوتی را القا کنند که روی کارایی واکسن و عوارض جانبی آن موثر باشد.(۱۷) همه زیرسویه‌های BCG مورد استفاده از یک منبع مشترک منشا گرفته‌اند، اما در نواحی حذف شده ژنی، میزان بیان آنتی ژن، ایمنی زایی و آثار حفاظتی با یکدیگر متفاوتند. بررسی‌های ژنومیک واکسن‌های BCG نشان داد که تفاوت‌های ژنتیکی متفاوتی شامل پلی مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی، تکرار و حذف ژنی بین نژادهای واکسن وجود دارد.(۱۸)

در ایران انجام واکسیناسیون BCG در دوران نوزادی انجام و لنفادنیت ناشی از واکسن در ایران با فراوانی زیادی دیده می‌شود.(۱) نژادی از واکسن که در ایران استفاده می‌شود سویه مایکوباکتریوم بوویس BCG Pasteur 1173P2 است.درتحقیقی که در ایران توسط فلاح و همکاران برای بررسی پلی مورفیسم ژنی واکسن BCG سویه پاستورمورد استفاده در ایران در مرحله تولید و قبل از تزریق انجام شد، مشخص شد که تمامی سویه‌ها دارای ناحیه DU1 و فاقد ناحیه RD1 و RD14 بودند و پروفایل VNTR-Typing آن مطابق با BCG سویه پاستور 1173p2 بود و در سویه واکسن تغییر ژنتیکی مشاهده نشد.(۹)

در تحقیق حاضر از مجموع ۳۲ بیمار، تعداد ۳۰ نمونه مایکوباکتریوم با روش رنگ‌آمیزی و کشت از نمونه‌های لنفادنیت جدا شدند.سپس این نمونه‌ها با استفاده از سه پرایمر RD1 RD14 and DU1 و تکنیک PCR برای تایید اینکه ب ث ژ سویه پاستور هستند بررسی شدند که ۲۶ مورد (۸۶/۶۶درصد) از آنها به عنوان سویه پاستور تایید شدند.در تحقیقی که در ایراناز سوی منجم زاده و همکاران روی ۲۱ کودک مبتلا به لنفادنیت انجام شد از ۱۵ مورد باسیل اسید فست جدا شده از نمونه‌ها ۱۲ مورد (۸۰درصد) BCG شناسایی شدکه با نتایج این تحقیق همخوانی دارد.(۵)

همچنین با توجه اینکه در تحقیق حاضر در ۵مورد (۱۶/۶۶درصد) نمونه عدم حضور باندهای RD1 و DU1 مشاهده شد می‌توان نتیجه‌گیری کرد که ممکن است این تغییرات در فاصله بین تولید تا تزریق یا پس از تزریق واکسن در این سویه‌ها ایجاد شده باشد.در نهایت با توجه به اینکه ۱۰۰درصد از نمونه‌های مایکوباکتریوم‌های جدا شده از لنفادنیت کودکان در این مطالعه به عنوان مایکوباکتریوم بوویس BCG سویه پاستور شناخته شدند می‌توان اینگونه نتیجه‌گیری کرد که ایجاد لنفادنیت در کودکان به دنبال واکسیناسیون با واکسن BCG بیشتر ناشی از عوامل دیگر از جمله مقدار واکسن مصرفی، روش تزریق و پاسخ‌های التهابی سیستم ایمنی این کودکان نسبت به واکسن است و کمتر می توان آن را با تغییر ژنتیکی سویه باکتری موجود در واکسن مرتبط دانست.

منابع

1. Behjati M, Ayatollahi J. Post BCG lymphadenitis in vaccinated infants in Yazd, Iran. Iranian Journal of Pediatrics. 2008;18(4):351-6.

2. Hematyar M, Chohdari A. Prevalence of BCG adenitis in infants vaccinated at birth. J Qazvin Univ. 2006;9:1-6.

3. Zeid AFA, Dahabreh MM. Bacille Calmette-Guerin Lymphadenitis: A Single Center Experience. JOURNAL OF THE ROYAL MEDICAL SERVICES. 2010;17(4):64.

4. Word I. Surgical Management of BCG Vaccine-Induced Regional Lymph Nodes Adverse Effects. Annals of Pediatric Surgery. 2009;5(3):187-93.

5. Monajemzadeh M, Shahsiah R, Zarei A, Alamooti AA, Mahjoub F, Mamishi S, et al. Frequency of bacille calmette-guerin (bcg) and mycobacterium tuberculosis in tissue biopsy specimens of children vaccinated with bcg. American journal of clinical pathology. 2010;133(1):102-6.

6. Jeena PM, Chhagan MK, Topley J, Coovadia HM. Safety of the intradermal Copenhagen 1331 BCG vaccine in neonates in Durban, South Africa. Bulletin of the World Health Organization. 2001;79(4):337-43.

7. Wu B, Huang C, Garcia L, de Leon AP, Osornio JS, Bobadilla-del-Valle M, et al. Unique gene expression profiles in infants vaccinated with different strains of Mycobacterium bovis bacille Calmette-Guerin. Infection and immunity. 2007;75(7):3658-64.

8. Markey K, Ho MM, Choudhury B, Seki M, Ju L, Castello-Branco LR, 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(43):6964-9.

9. FallahF, Goudarzi H, Doustdar F, Zahraei S, Mohammadzadeh A. Gene polymorphism of BCG vaccine strain using in Iran. The Horizon of Medical Sciences. 2013;19(1):1-6.

10. Warren R, de Kock M, Engelke E, et al. Safe Mycobacterium tuberculosis DNA Extraction Method That Does Not Compromise Integrity. Journal of Clinical Microbiology. 2006;44(1):254-256.
11. Pinsky BA, Banaei N. Multiplex real-time PCR assay for rapid identification of Mycobacterium tuberculosis complex members to the species level. Journal of clinical microbiology. 2008;46(7):2241-6.
12. Bolger T, O'Connell M, Menon A, Butler K. Complications associated with the bacille Calmette-Guérin vaccination in Ireland. Archives of disease in childhood. 2006;91(7):594-7.
13. Brosch R, Gordon SV, Garnier T, Eiglmeier K, Frigui W, Valenti P, et al. Genome plasticityof BCG and impact on vaccine efficacy. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2007;104(13):5596-601.
14. Shann F. Editorial Commentary: Different Strains of Bacillus Calmette-Guérin Vaccine Have Very Different Effects on Tuberculosis and on Unrelated Infections.Clin Infect Dis. 2015;61(6):960-2.
15. Hengster P, Schnapka J, Fille M, Menardi G. Occurrence of suppurative lymphadenitis after a change of BCG vaccine. Archives of disease in childhood. 1992;67(7):952-5.
16. Hooi LN1, Athiyah SO.An outbreak of BCG related lymphadenitis in Malaysian infants.Med J Malaysia. 1994;49(4):327-35.
17.Ritz N1, Dutta B, Donath S, et al.The influence of bacille Calmette-Guerin vaccine strain on the immune response against tuberculosis: a randomized trial.Am J Respir Crit Care Med. 2012;185(2):213-22.
18. Akhtar P, Singh S, Bifani P, Kaur S, Srivastava BS, Srivastava R. Variable-number tandem repeat 3690 polymorphism in Indian clinical isolates of Mycobacterium tuberculosis and itsinfluence on transcription. Journal of medical microbiology. 2009;58(6):798-805.