Archive of SID

پلی مورفیسم ژن های پرتاکتین (prn) و فیمبریه (fim) در سویه های بوردتلا پرتوسیس جدا شده از بیماران ایرانی مشکوک به سیاه سرفه

نازنین جان نثاراحمدی[۱] ،مریم حسین پور[۲] ،وجیه سادات نیک بین[۲] ،معصومه نخست لطفی[۱] ،فرشته شاهچراغی[۳]*

۱- کارشناس ارشد بیوتکنولوژی میکروبی-بخش میکروب شناسی انستیتو پاستور ایران
۲- کارشناس ارشد میکروبیولوژی- بخش میکروب شناسی انستیتو پاستور ایران
۳- استاد –رییس بخش میکروب شناسی انستیتوپاستور تهران

***نشانی برای مکاتبه:** برای مکاتبه:shahcheraghifereshteh@yahoo.com ، تلفن و نمابر ۰۲۱۶۶۴۰۵۵۳۵

دریافت مقاله: بهمن نود و سه پذیرش برای چاپ: خرداد نود و چهار

چکیده

سابقه و هدف: *سیاه سرفه یک عفونت حاد وکاملا مسری است که عامل آن بوردتلاپرتوسیس، باکتری گرم منفی ومنحصراً در انسان ایجاد بیماری می نماید. به رغم پوشش بالای واکسیناسیون در کشورهای توسعه یافته و درحال توسعه علیه بیماری سیاه سرفه،افزایش بروز این بیماری در بسیاری از این کشورها ازجمله ایران،مشاهده شده است. یکی ازفاکتورهای احتمالی دخیل در شیوع مجدد سیاه سرفه،پلی مورفیسم ژن های فاکتورهای ویرولانس باکتری می باشد. پرتاکتین و فیمبریه ازجمله فاکتورهای ویرولانس مهم باکتری می باشند. هدف ازاین مطالعه، تعیین پلی مورفیسم ناحیه ۱ ژن prn و ژن fim۳ در سویه های در گردش جامعه و مقایسه آن با سویه واکسن می باشد.*

روش کار: *در این مطالعه،۳۵ سویه بوردتلا پرتوسیس جداشده ازبیماران سیاه سرفه ازسراسر ایران،که مورد تائید آزمایشگاه مرجع سیاه سرفه انستیتو پاستور ایران بودند، بررسی شد. ناحیه ۱ ژن prn و ژن fim۳ توسط PCR تکثیر شد ومحصولات PCR آنها برای تشخیص آلل ژن ها،تعیین توالی شد. .هم چنین سویه استاندارد واکسن (۱۳۴) نیز بررسی شد.*

یافته ها: *تمامی سویه های بوردتلاپرتوسیس مورد بررسی جز ۱ سویه، دارای آلل prn 2 و fim 3-2 بودند. درحالی که آلل های سویه واکسن prn1 و fim3-1 بود.*

نتیجه گیری : *در بررسی هایی که دربسیاری ازکشورهای اروپایی وآمریکایی باپوشش واکسیناسیون بالاصورت گرفته است،نتیجه ای مشابه نتیجه این تحقیق بدست آمده است و همگی آنها،آلل های غالب prn 2 و fim 3-2 را نشان داده اند.با توجه به اهمیت پلی مورفیسم ژن های کدکننده فاکتورهای ویرولانس وایمونوژن باکتری بوردتلا پرتوسیس،استفاده از سویه های بومی دارای آلل های غالب این فاکتورها درتهیه واکسن موثر علیه پرتوسیس بسیار حائز اهمیت بوده و بنابراین تحقیقات گسترده تری دررابطه باسایر فاکتورهای ویرولانس در سویه های در گردش جامعه لازم می باشد.*

واژگان کلیدی: بوردتلاپرتوسیس، پرتاکتین، فیمبریه، پلی مورفیسم

مقدمه

باکتری بوردتلا پرتوسیس عامل ایجاد کننده سیاه سرفه ,کوکوباسیل گرم منفی، هوازی مطلق و پاتوژن انحصاری انسان می باشد.به دنبال جداسازی بوردتلا پرتوسیس در سال ۱۹۰۶،توسط ژول بوردت و اکتاو ژنگو، کار بر روی توسعه واکسن شروع شد (۱) و در سال ۱۹۴۲ الدرینگ و پرل کندریک، دو محقق آمریکایی موفق شدند تا اولین واکسن سلولی سیاه سرفه را که با توکسوئیدهای دیفتری و کزاز ترکیب شده بود و موسوم بود به واکسن سه گانه (DTP) ، تولید کنند(۲).

ایمونیزاسیون با واکسن های تمام سلولی پرتوسیس به طور معناداری شیوع پرتوزیس را در کشور های زیادی کاهش داد. با این حال ، نگرانی به خاطر اثرات جانبی این واکسن و هم چنین نیاز به ایمونیزاسیون تقویت کننده در بزرگ سالان، منجر به توسعه واکسن های پرتوزیس بدون سلولی در دهه ۱۹۸۰ شد. در سال ۲۰۰۶ WHO گزارش کرد که ۷۹٪ جمعیت جهانی هدف(۱۰۲میلیون بچه)، با ۳ دوز واکسن دیفتری – تتانوس و پرتوزیس بدون سلولی (DTaP) یا دیفتری – تتانوس و پرتوزیس تمام سلولی (DTwP) واکسینه شده اند(۳).

واکسیناسیون علیه سیاه سرفه در ایران، از دهه ی ۱۹۵۰ با استفاده از واکسن تهیه شده توسط موسسه رازی (Razi – DTwp) که توسط کمیته واکسیناسیون ملی ایران تائید شده، انجام شده و توان مندی و تاثیر آن توسط مطالعات قبلی بررسی و تائید شده است. با شروع واکسیناسیون سیر ابتلا به بیماری سیاه سرفه کاهش یافت و به سطح پایداری رسید. اما

www.SID.ir

Archive of SID

طی چندسال اخیر بروز مجددی در بیماری سیاه سرفه مشاهده شد وابتلا به پرتوسیس افزایش یافت(۴). طبق گزارش WHO میزان بروز پرتوسیس در ایران در سال ۲۰۰۴ ، ۹۸ مورد و در سال ۲۰۰۵ ، ۱۲۵ مورد و در سال ۲۰۱۱ ، ۶۵۰ بوده است(۵،۶).

دلایل متعددی از جمله : کاهش ایمنی بدن پس از واکسیناسیون با گذشت زمان، نقص در انجام کامل واکسیناسیون، وجود سوش های جهش یافته بر اثر جهش های ژنی و یا کارایی پایین واکسن، افزایش سطح آگاهی در رابطه با بیماری وگزارش دهی کشور برای این روند افزایش شیوع بخصوص در جمعیت های زیر ۶ ماه و بیش از ۱۰ سال، می تواند وجود داشته باشد(۷).

تغییرات ژنتیکی در ژن های فاکتورهای ویرولانس از جمله*ptx، fha* ، *fim، prn* باعث پیدایش آللهای متعددی از این ژن ها شده است. پلی مورفیسم مشاهده شده در این ژن ها در بسیاری از کشورها از جمله آمریکا ،استرالیا ،کانادا وهلند نیز بررسی شده است. به نظر می رسد این پلی مورفیسم ارتباط مستقیمی با بازپدیدی بیماری سیاه سرفه در جهان دارد(۱۱-۸).

بوردتلا پرتوسیس دارای چندین فاکتور ویرولانس، از جمله پرتاکتین و فیمبریه است، که نقش مهمی در بیماری زایی باکتری دارند. پرتاکتین پروتئینی بسیار ایمونوژن است که در ابتدا تحت عنوان پروتئین ۶۹ کیلودالتونی(Dk ۶۹) شناخته شده بود. پس از بررسی و مطالعه ساختار ژن ، ۲ ناحیه پلی مورفیک ژن، ناحیه ۱ و ناحیه ۲، شناسایی شد(۹). ناحیه ۱ شامل تکرار های محتوی ۵ آمینواسید (GGXXP) و نزدیک موتیف RGD قرار دارد(۱۲). ناحیه ۲ شامل تکرار های PQP می باشد(۱۳). در نهایت با تکثیر ناحیه ۱ و تعیین توالی آن مشخص شد که پرتاکتین شامل ۱۳ آلل مختلف در ناحیه ۱ می باشد (۱۴).

فیمبریه های ۲ و ۳ (FIM2 – FIM3) از فاکتورهای مهم ویرولانس باکتری بوردتلا پرتوسیس می باشند که از زیر واحد هایی با اندازه مولکولی به ترتیب ۲۲/۵ و ۲۲ کیلودالتون ساخته شده اند(۹) وبه منزله ایمونوژن های مهم بوردتلا پرتوزیس تلقی می شوند که سبب ایجاد پاسخ ایمنی اختصاصی به سروتیپ های مشخص می شوند(۱۵). در فیمبریه نیز طی تحقیقات و بررسی ها مشخص شد که ژن ۳ *fim* شامل ۴ آلل *fim3-1* ، *fim3-2*، *fim3- 3*، *fim3-4* می باشد(۸).

از زمانی که سکانس های ژن بوردتلا پرتوسیس در دسترس قرار گرفت و مکان های پلی مورفیک شناسایی شد ، مطالعه پلی مورفیسم فاکتور های ویرولانس باکتری مورد توجه قرار گرفت. از این رو در مطالعه حاضر، برای اولین بار در ایران با استفاده از دو تکنیک PCR و DNA Sequencing سویه های کلینیکی سیاه سرفه جمع آوری شده از کل کشور را، برای ارزیابی پلی مورفیسم ژن *prn* و *fim3* مورد بررسی قرار دادیم. هدف از این مطالعه، تعیین تغییرات آللیک این دو ژن در سویه های درگردش جامعه جدا شده طی چندین سال اخیر و مقایسه الل غالب جامعه با سویه واکسن بود.

روش کار

از ۳۲۰۵ نمونه ی نازوفارنکس و نازال بیماران مشکوک به سیاه سرفه که از استان های مختلف کشور طی سال های ۹۱-۱۳۸۸ به آزمایشگاه مرجع کشوری سیاه سرفه بخش میکروب شناسی انستیتو پاستور ایران ارسال شدند،تعداد ۳۵ نمونه کشت مثبت انتخاب شد. کلیه سویه های انتخابی بعد از شناسایی با روش کشت بر روی محیط رگان لو دارای ۱۰ ٪ خون دفیبرینه شده اسب ویا گوسفند بدون سفالکسین و حاوی سفالکسین(Sigma Chemical co, USA) (40 μg/ml) و انجام تست های بیوشیمیایی با استفاده از کیت API20E وتست اسلاید آگلوتیناسیون بوسیله آنتی سرم بوردتلا پرتوسیس (Difco,BBL) ، تائید نهایی شد.

در تمامی مراحل آزمایش از سویه *Bordetella pertussis* ATCC 9797 به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید. سویه مورد استفاده در واکسن تمام سلولی سیاه سرفه در ایران (134) نیز بررسی شد.

ابتدا DNA سویه های مورد مطالعه با استفاده از کیت، طبق دستورالعمل کیت pure PCR kit,Roche Applied Science (Roche hightemplate preparation)استخراج شد. برای بررسی پلی مورفیسم ژن های *prn* و *fim3* ، ابتدا با استفاده از جفت پرایمرهایی که در جدول ۱ ذکر شده است، PCR انجام گردید(۸،۹).

جدول ۱- پرایمر های اختصاصی *prn* و *fim 3*

Gene	Forward primer	Reverse primer
prn	CAATGTCACGGTCCAA	CCCTGTCGATCACCTTGC
fim 3	CCCCCGGACCTGATATTCTGATG	ATCTTGTCCTTCAGCACGCTCAGC

برای واکنش PCR از دستگاه master cycler ependorff PCR استفاده شد. برای حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر انجام گرفت. هر واکنش شامل ۱۲/۵ میکرولیتر taq polymerase 2x master mix (red(Ampliqon aps,Denmark، ۶/۵ میکرولیتر آب مقطر تزریقی (DDW)، ۲ میکرولیتر از هر پرایمر و ۲ میکرولیتر از نمونه های ژنومی استخراج شده ، بود. PCR برای هر ژن طبق برنامه های جدول ۲ انجام شد. برای اطمینان از تکثیر قطعه مورد نظر و مشاهده باند اختصاصی ژن ، محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز سپس با اتیدیوم برماید رنگ آمیزی شد. جهت تعیین توالی ژن ، محصولات PCR به همراه پرایمرهای اختصاصی به شرکت Macrogen Research seoul کره ارسال گردید. پس از دریافت نتایج ، سکانس ها توسط نرم افزارهای *chromas* و *Mega 4* بررسی شد.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۲- شرایط PCR برای ژن های *prn* و *fim 3*

مراحل PCR	دما	زمان
	prn / *fim3*	*prn* / *fim3*
Initial denaturation	95°c	3 min
Denaturation	95°c	30 s
Annealing	57°c / 62 °c	30 s
Extension	72°c	1 min
Final extention	72°c	10 min
تعداد سیکل	35 Cycle	

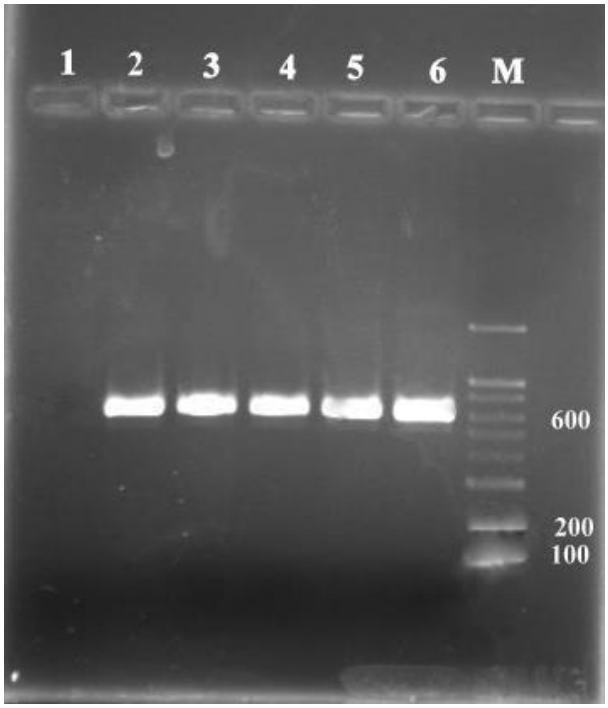
یافته ها

از ۳۲۰۵ نمونه ارسال شده به انستیتوپاستور ایران طی سال های ۹۱-۱۳۸۸ ، ۳۵ ایزوله بررسی شد که از این تعداد ۸ سویه جداشده مربوط به سال های ۹۰-۸۸ و ۲۷ سویه مربوط به سال ۹۱ بود. ۱۳ مورد مربوط به افراد زیر ۲ ماه ، ۱۸ مورد مربوط به افراد ۲ ماه تا ۶ سال و ۴ مورد مربوط به افراد بالای ۶ سال بود. از ۳۵ نمونه مورد بررسی ،۱۹ نفر واکسیناسون با واکسن سه گانه (DTP) را انجام داده بودند. ۱۱ نفر واکسینه نشده بودند و ۵ نفر وضعیت واکسیناسیون آنها مشخص نبود.

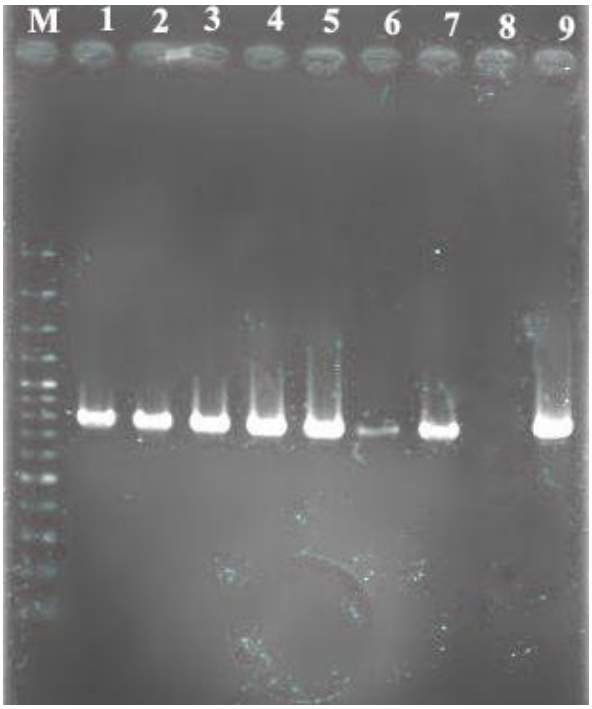
نتیجه PCR نمونه ها با دو جفت پرایمر ،برای ناحیه ۱ ژن های *prn* و *fim* 3 به ترتیب اندازه ۶۰۰ و ۸۰۰ جفت باز نشان داد(شکل ۱ و ۲).

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۱ –نتایج PCR ژن *prn* (ردیف M، 100 bp Ladder (Fermentas); ردیف ۱ نمونه کنترل منفی ; ردیف ۲ کنترل مثبت بوردتلاپرتوسیس (ATCC 9797)و ردیف ۱ تا ۶ نتایج سویه های بیماران)

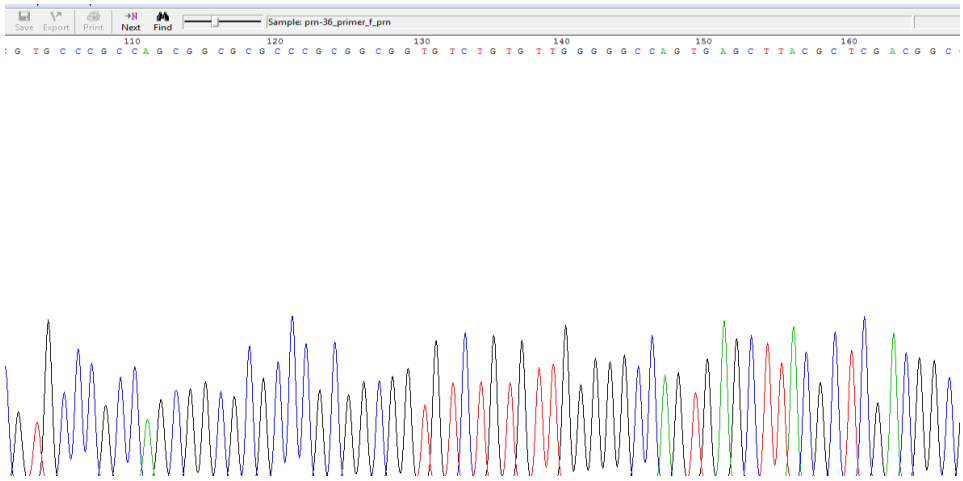


شکل ۲- نتایج PCR ژن *fim3* (ردیف M، 100 bp Ladder (Fermentas); ردیف ۱ تا ۷ نتایج سویه های بیماران; ردیف ۸ نمونه کنترل منفی و ردیف ۹ کنترل مثبت بوردتلاپرتوسیس (ATCC 9797))

www.SID.ir

Archive of SID

نتایج تعیین توالی نمونه ها با استفاده از نرم افزار های chromas , ۴ Mega در شکل ۳ نشان داده شده است. پس از بررسی نهایی مشخص شد که ۳۴ ایزوله مورد آزمایش آلل *prn 2* و *fim* 3-2 و فقط ۱ ایزوله آلل *prn1* و *fim* 3-1 را نشان می دهند. آلل های سویه استاندارد واکسن ۱۳۴ شامل Prn1 و Fim3-1 بود.



شکل ۳ – توالی تمونه ها با نرم افزار chromas

بحث

سیاه سرفه به عنوان یک بیماری عفونی حاد در انسان شناخته شده است . بر اساس آمار برآورده شده توسط سازمان بهداشت جهانی ، سالانه حدود ۵۰ میلیون مورد بیماری رخ می دهد(۳،۱۶). با استفاده گسترده از واکسن سیاه سرفه، بروز این بیماری به طور چشم گیری کاهش یافته است. با این حال، در دهه اخیر، بروز سیاه سرفه در نوزدان، نوجوانان و بزرگ سالان در بسیاری از کشور هایی که در آنها واکسیناسیون سیاه سرفه انجام شده است، به طور گسترده افزایش یافته اس (۱۶،۱۷). امروزه پوشش واکسیناسیون در کشور ایران برطبق آمار مرکز مدیریت بیماری های واگیر وزارت بهداشت و درمان کشور ۹۹ درصد می باشد ولی در ایران نیز به رغم پوشش بالای واکسیناسیون ، آمار میزان بیماری در سال های اخیر افزایش یافته است(۱۸). مراکز کنترل بیماری در ایران گزارش دادند که بروز پرتوسیس در ایران در سال ۲۰۰۷، ۰/۱۹ مورد در هر ۱۰۰۰۰۰ جمعیت بوده است در حالی که بروز این بیماری در سال ۲۰۰۸ به ۰/۵ مورد در هر ۱۰۰۰۰۰ جمعیت افزایش یافته است(۵،۱۶).

در آمریکا در دهه ۱۹۸۰ میزان شیوع بیماری ۶۳/۴ در صدهزارنفر و در دهه ۱۹۹۰ ، ۸۸/۷ در صدهزارنفر و دهه ۲۰۰۰ بالاترین میزان شیوع ۹۸/۲ در صدهزارنفر را در نوزادان زیر ۶ ماه داشته که در مقایسه با نوزادان ۱۱-۶ ماهه که ۱۲/۳ در صدهزارنفر بوده است چشم گیر تر است(۱۸،۱۹).

ایمونیزاسیون بر علیه دیفتری – کزاز و سیاه سرفه در ایران ، با استفاده از واکسن تمام سلولی سیاه سرفه وتوکسویید دیفتری وکزاز انجام می شود ، اما به رغم نقش این واکسن در کاهش مرگ و میر این بیماری ها ، عوارض موضعی و سیستماتیک جدی به این واکسن به خصوص در بزرگ سالان ، نسبت داده شده است(۴). از این رو محقق فرانسوی پیش بینی کرد که همانند استفاده از واکسن غیر سلولی دیفتری، استفاده از واکسن غیر سلولی پرتوسیس در همه گروه های سنی منجر به کاهش گردش بوردتلا پرتوسیس و بنابراین کنترل بیشتر پرتوسیس می شو (۲۰).

با توجه به علل ذکر شده در رابطه با بازپدیدی سیاه سرفه ، پلی مورفیسم ژن های ویرولانس یکی از این علل به شمار می رود. در ایران نیز با توجه به استفاده از سویه های *B.pertussis* قدیمی جهت تهیه واکسن (از حدود ۶۰ سال پیش)، بررسی تفاوت آللیک سویه های بالینی جداشده از بیماران و تفاوت آن با سویه واکسن، هم چنان که در کشورهای دیگر جهان انجام شده است، ضروری به نظر می رسد. در این پژوهش پلی مورفیسم ژن های ویرولانس ناحیه ۱ ژن *prn* و *fim 3* در سویه های جدا شده ، بررسی شد.

مطالعات زیادی در کشور های مختلف(۱۰،۱۱)از قبیل هلند، فرانسه،ژاپن و آمریکا در این زمینه انجام شده است و با توجه به نتایج آنها و اینکه پرتاکتین (P.69) و فیمبریه از جمله فاکتور های ویرولانس مهم و پلی مورفیک بوردتلاپرتوسیس می باشند، مطالعه تغییر آنتی ژنی آنها ، حائز اهمیت می باشد . نتایج بدست آمده از این کشورها هم چون نتیجه بدست

www.SID.ir

Archive of SID

آمده در ایران ، مشخص کرد که شیفت آللیک در ژن های *prn و fim* اتفاق افتاده است و آلل غالب کشورها از prn ۱ به prn ۲ و fim۳-۱ به fim ۲-۳ تغییر یافته است (۱۱،۱۴،۲۱،۲۲).

می توان حدس زد که تغییرات نوکلئوتیدی مشاهده شده بر سطح این پروتئین ها، نشانه توانایی باکتری برای سازگار شدن و فرار از سیستم ایمنی باشد و در نتیجه باعث افزایش شیوع سیاه سرفه شود(۱۴). متاسفانه از دوران قبل از واکسیناسیون در ایران ،هیچ سویه بالینی در دسترس نیست،درنتیجه درمورد وقوع پلی مورفیسم در ایران دقیقا نمی توان نظر دارد اما باتوجه به مطالعات انجام شده در رابطه باسازگاری وفرار از سیستم ایمنی باکتری می توان گفت که سویه های درگردش جامعه،احتمالا با سویه هایی که در دوران شروع واکسیناسیون درجامعه بوده اند،از لحاظ آنتی ژنی متفاوت هستند.

سویه ۱۳۴ برای تولید واکسن در ایران استفاده می شود که حاوی آلل های prn1 و fim ۳-۱ می باشد .با مقایسه این آلل ها با آلل های غالب جامعه، می توان پیش بینی کرد که ممکن است تفاوت آللی سویه واکسن با سویه در گردش جامعه باعث کاهش اثر واکسن و شیوع مجدد سیاه سرفه ، شده باشد.

با وجود برنامه واکسیناسیون سیاه سرفه در ایران در سنین ۲ ، ۴ ، ۶ ، ۱۸ ماهگی و ۶ سالگی،و اطلاعات حاصل که نشان میدهد بیشترین تعداد بیماران مبتلا ، مربوط به گروه سنی ۲ ماه تا ۶ سال می باشند میتوان نتیجه گرفت که دلیل این مورد کامل نشدن دوره واکسیناسیون و ایمنی زایی افراد می باشد (۲۳).

کودکان زیر ۱۸ ماه بدلیل عدم واکسیناسیون کامل احتمال ابتلا به سیاه سرفه را دارند و کاملا طبیعی میباشد .با در نظر گرفتن دز بوستر واکسن در سن ۶ سالگی و تکمیل ایمنی بدن انتظار میرود بدن توانایی مقابله با باکتری را تا حداکثر ۱۰ سال پس از واکسیناسیون دارا می باشد، البته با فرض اینکه واکسن به درستی عمل کند. از طرفی در افراد بزرگ سال بالای ۱۶ سال، به مرور زمان ایمنی بدن کمتر می شود و بروز بیماری در این سنین، در اثر کاهش ایمنی بدن است(۲۴،۲۵).

علایم سیاه سرفه در بزرگ سالان بسیار خفیف است وبه همین علت این بیماری چه از سوی خود بیمار وچه از سوی پزشک نادیده گرفته می شود،به طوریکه بیماری سیاه سرفه ممکن است با علایم سرماخوردگی یا بیماری های ویروسی دیگر اشتباه گرفته شود،درنتیجه نه تنها از بیمار نمونه ای گرفته نمی شود،گزارشی نیز از سوی پزشک ارایه نمیگردد، لذا این بزرگ سالان می توانند ناقل بیماری بوده وباعث انتقال به نوزادان شوند(۲۶). در نتیجه در صورت بروز سیاه سرفه در افراد بین ۶-۱۶ سال که واکسیناسیون آن ها کامل می باشد،احتمالا عواملی دیگر(همانطور که قبلا ذکر شد) دخالت دارد; که یکی از آن ها، تغییر آنتی ژنی سویه ها می باشد که در این تحقیق به بررسی آن پرداخته ایم(۷).

نتیجه گیری

با توجه به اطلاعات بدست آمده ازایران و سایر کشورهای اروپایی و آمریکایی، می توان گفت که بازپدیدی سیاه سرفه یک پدیده جهانی است.در نتیجه پیشنهاد می شود که سایر ژن های ویرولانس مهم باکتری (ptxp -act -fim۲ -ptx) نیز از لحاظ تنوع آللیک مورد بررسی قرار گیرند و از سویه بومی در گردش جامعه جهت تهیه واکسن (سلولی – غیرسلولی) استفاده شود.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از همکاران بخش میکروبشناسی انستیتو پاستور تهران و همکاران انستیتو سرم وواکسن سازی رازی ومرکز مدیریت بیماری های قابل پیشگیری با واکسن به خاطر همکاری در انجام این مطالعه تشکر وقدردانی می نمایم.

www.SID.ir

Archive of SID

REFERENCES

References

1.Gelach ,G., von Wintzingerode, F. ., et al. (2001). Evolutionary trends in the genus BordetellaMicrob Infect 3(1):61-72.

2.Crowcraft , N. and pebody , R (2006). " Recent Developments in Pertussis ." Lancet 367:1926-1936.

3.World Health Organization .(1999) pertussis vaccines.WHO position paper.weeklyepidemial record. 80(4):31-9.

4.Zharaei , S.M. and doosti ,. F. (2008) Distribution of pertussis in Iran in 2007 . The 17 th Iranians congress on Infection diseases and tropical medicine. Tehran, Iran. 129.

5.Zarai ,S, Jeddi-Tehrani , M., et al . (2009). Primary Immunization with a triple diphtheria-tetanus-whole cell pertussis vaccine in Iranian Infant : an analysis of antibody response. Iran J Ailergy Asthma Immunol 8(2):85-93.

6. World Health Organization Immunization(WHO)- Vaccines And Biologicals_ Vaccine preventable diseases Vaccines monitoring system 2013 Global Summary Reference Time Series DTP. 20-Octl-2013

7.WOODN and MclhtyreP.National Center for ImmonisationResearch,Surveillance of Vaccine preventable Diseases. The children's Hospital at west mead and the university of Sydney,New South Wales,Australia Pediatric Respiratory Reviews 2008;9:201-212.

8. Tsang .Raymond S.W/Allan K.H.Lau/Michelle L.Sill/Scott A.Halperin Paul Van Caeseele/Frances Jamieson/Irene E.Martin .Polymorphisms of the Fimbria fim3 Gene of Bordetella Pertussis Strains Isolated in Canada. *J elinMic 2004 Nov : 5364-5367.

9.MooiFR,VanOirschotH,Heuvelmank,van der HeideHGJ,GaastraW,willemsRJL.polymorphism in the Bordetella pertussis virulence factors p.69/pertactin and pertussis toxin in the Netherlands: temporal trends and evidence for vaccine-driven evolution. Infect Immun.1998;66:670-675.

10.ByrneShane , Andrew T Slack,(2006) . Analysis of *Bordetella pertussis* pertactin and pertussis toxin types from Queensland, Australia, 1999–2003;*BMC Infectious Diseases*2006, 6:53

11.Cassiday Pamela, Gary Sanden, KeesHeuvelman, Frits Mooi , Kristine M. Bisgard, and TanjaPopovic. Polymorphism in *Bordetella pertussis* Pertactin and Pertussis Toxin Virulence Factors in the United States, 1935–1999, TheJournal of Infectious Diseases 2000;182:1402–8

www.SID.ir

Archive of SID

12.Leininger,E.,C.A.Ewanowich,A.Bhargava,M.S.Peppler,J.G.kenimer,and M.J. Bernnan.1992. Comparative roles of the Arg-Gly-Asp sequence present in the Bordetella pertussis adhesions pertactin and Filamentous hemagglutinin. Infect. Immun. 60:2380-2385

13.Robertson,B.D.,and T.F.Meyer.1992.Genetic variation in pathogenic bacteria. Trends Genet . 8:422-427.

14.Mooi FR , T. VAN DER maas and H. E. DE MELKER.REVIEW ARTICLE Pertussis resurgence: waning immunity and pathogen adaptation – two sides of the same coin.2013;Epidemiol. Infect., Page 1 of 10

15.Mooi, F.R., Hallander, H., et al .(2000). Epidemiological typing of Bordetella pertussis isolates : recommendations for a standard methodology . Eyr .Clin Infect Dis J 19:174-181 .

16.World Health Organization . (2007) . Vaccine Preventable Diseases Monitoring System , Global summary , Retrieved 14April, 2008, from http://www.int/immunization_monitoring /en/glob alsummary / countryprofileselect.cfm

17.Bass, J. W., and R. R. Wittler. 1994. Return of epidemic pertussis in the United States. Pediatr. Infect. Dis. J. 13:343–345

18. **18.** shahcheraghi,F. Nakhost lotfi,M. Parzadeh,M. Nikbin,VS. Shouraj,F. Zahraei,SM.(2012). Isolation of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* from clinical specimens at different provinces of Iran**.** J Mazandaran Univ Med Sci. 2012; 22 (88) :2-8

19.CDC pertussis- United States,2001-2003,MMWR 2005;54:1283-1286.

20.Forsyth KD,Wirsing von kongCH,TanT,caroJ,plotkinS.Prevention of Pertussis : recommendations derived from the second Global Pertussis Initiative roundtable meeting. Vaccine 2007;25:2634-42.

21.Christianweber,CarolineBoursaux-Eude,GilberteCoralie,ValerieCaro,NicoleGuiso. Polymorphism of Bordetella pertussis Circulating for the last 10 years in France ,where a single Effective whole-cell vaccine Has Been Used for more than 30 years. I clinMicrobiol. 2001 December ; 39(12):4396-4403.

22.KodamaAtsuko ,KazunariKamachi,YoshinobuHoriuchi,ToshifumiKonda, and Yoshichika Arakawa.Antigenic Divergence Suggested by Correlation between Antigenic Variation and Pulsed-Field Gel Electrophoresis Profiles of *Bordetella pertussis* Isolates in Japan.J ClinMicrobiol. 2004 December; 42(12): 5453–5457.

23.Nikbin,VS; Shahcheraghi, F; NakhostLotfi, M; Zahraei, SM; Parzadeh, M; 2013; Comparison of culture and real-time PCR for detection of *Bordetella pertussis* isolated from patients in Iran. *Iran J Microbiol.* 5(3): 209–214.

24.wendelboe A,vanRieA,Salmaso S et al,Duration of immunity against Pertussis after natural infection or vaccination Pediatr Infect Dis J 2005; 24: 558-561.

www.SID.ir

Archive of SID

AguasR,GoncalvesG,GomesMG.Pertussis : increasing disease as a consequence of reducing transmission. Lancet Infect Dis J 2006; 6:112-117.

25.Baron S,Njamkepo E,Grimpre1 E,BegueP,Desenclos J C ,OruckerJ,GuisoN.Epidemiology of pertussis in French hospital in 1993 and 1994 : thirty years after a routine use of vaccination. Pediatr Infect Dis J. 1998;17:412-418.

26.Broder . K. R ., Cortese , M.M., et al . (2006). Preventing tetanus , diphtheria and pertussis among adolescents : use of tetanus toxoid , reduced diphtheriatoxoidacellular pertussis vaccines recommendations of the advisory committee on immunization Practices (ACIP) . MMWR recomn Rep 55(3):1-34

www.SID.ir