

پلی مورفیسم ژن های پرتاکتین (prn) و فیمبریه (fim) در سویه های بوردتلا پرتوسیسی 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-رئیس بخش میکروب شناسی انستیتوپاستور تهران

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

پذیرش برای چاپ: خرداد نود و چهار

دریافت مقاله: بهمن نود و سه

چکیده

سابقه و هدف: سیاه سرفه یک عفونت حاد و کاملاً مسری است که عامل آن بوردتلاپرتوسیسی، باکتری گرم منفی و منحصراً در انسان ایجاد بیماری می نماید. به رغم پوشش بالای واکسیناسیون در کشورهای توسعه یافته و در حال توسعه علیه بیماری سیاه سرفه، افزایش بروز این بیماری در بسیاری از این کشورها از جمله ایران، مشاهده شده است. یکی از فاکتورهای احتمالی دخیل در شیوع مجدد سیاه سرفه، پلی مورفیسم ژن های فاکتورهای ویروانس باکتری می باشد. پرتاکتین و فیمبریه از جمله فاکتورهای ویروانس مهم باکتری می باشند. هدف از این مطالعه، تعیین پلی مورفیسم ناحیه ۱ ژن *prn* و ژن *fim3* در سویه های در گردش جامعه و مقایسه آن با سویه واکسن می باشد.

روش کار: در این مطالعه، ۳۵ سویه بوردتلا پرتوسیسی جدا شده از بیماران سیاه سرفه از سراسر ایران، که مورد تأیید آزمایشگاه مرجع سیاه سرفه انستیتو پاستور ایران بودند، بررسی شد. ناحیه ۱ ژن *prn* و ژن *fim3* توسط PCR تکثیر شد و محصولات PCR آنها برای تشخیص آلل ژن ها، تعیین توالی شد. هم چنین سویه استاندارد واکسن (۱۳۴) نیز بررسی شد.

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

نتیجه گیری: در بررسی هایی که در بسیاری از کشورهای اروپایی و آمریکایی با پوشش واکسیناسیون بالا صورت 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 ویروانس و ایمونوژن باکتری بوردتلا پرتوسیسی، استفاده از سویه های بومی دارای آلل های غالب این فاکتورها در تهیه واکسن موثر علیه پرتوسیسی بسیار حائز اهمیت بوده و بنابراین تحقیقات گسترده تری در رابطه با سایر فاکتورهای ویروانس در سویه های در گردش جامعه لازم می باشد.

واژگان کلیدی: بوردتلا پرتوسیسی، پرتاکتین، فیمبریه، پلی مورفیسم

مقدمه

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 (۱۰۲ میلیون بچه)، با ۳ دوز واکسن دیفتی - تتانوس و پرتوزیس بدون سلولی (DTaP) یا دیفتی - 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 تأیید شده، انجام شده و توان مندی و تاثیر آن توسط مطالعات قبلی بررسی و تأیید شده است. با شروع واکسیناسیون سیر ابتلا به بیماری سیاه سرفه کاهش یافت و به سطح پایداری رسید. اما

باکتری بوردتلا پرتوسیسی عامل ایجاد کننده سیاه سرفه، کوکوباسیل گرم منفی، هوازی مطلق و پاتوژن انحصاری انسان می باشد. به دنبال جداسازی بوردتلا پرتوسیسی 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 دیفتی و کزاز ترکیب شده بود و موسوم بود به واکسن سه گانه (DTP)، تولید کنند (۲).

ایمونیزاسیون با واکسن های تمام سلولی پرتوسیسی 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

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 سکناس های ژن بوردتلا پرتوسیس در دسترس قرار گرفت و مکان های پلی مورفیک شناسایی شد ، مطالعه پلی مورفیسم فاکتور های ویروانس 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 در گردش جامعه جدا شده طی چندین سال اخیر و مقایسه الل غالب جامعه با سویه واکسن بود.

روش کار

از ۳۲۰۵ نمونه ی نازوفارنکس و نزال 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 (40 µg/ml) (Sigma Chemical co, USA) و انجام تست های بیوشیمیایی با استفاده از کیت API20E و تست اسلاید آگلوتیناسیون بوسيله آنتی سرم بوردتلا پرتوسیس (Difco, BBL) ، تأیید 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 Roche (pure PCR kit, Roche Applied Science) *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).

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 و گزارش 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 ویروانس از جمله *ptx*، *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 و هلند نیز بررسی شده است. به نظر می رسد این پلی مورفیسم ارتباط مستقیمی با بازپدیدي بیماری سیاه سرفه در جهان دارد (۱۱-۸).

بوردتلا پرتوسیس دارای چندین فاکتور ویروانس، 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 (۶۹ Dk) 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 ویروانس باکتری بوردتلا پرتوسیس می باشند که از زیر واحد هایی با اندازه مولکولی به ترتیب ۲۲/۵ و ۲۲ کیلودالتون ساخته شده اند (۹) و به منزله ایمونوژن های مهم بوردتلا پرتوسیس تلقی می شوند که سبب ایجاد پاسخ ایمنی اختصاصی به سروتیپ های مشخص می شوند (۱۵). در فیمبریه نیز طی

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

Gene	Forward primer	Reverse primer
<i>prn</i>	CAATGTCACGGTCCAA	CCCTGTCGATCACCTTGC
<i>fim 3</i>	CCCCCGGACCTGATATTCTGATG	ATCTTGTCTTCAGCACGCTCAGC

شد. برای اطمینان از تکثیر قطعه مورد نظر و مشاهده باند اختصاصی ژن ، محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز سپس با اتیدیوم برآمید 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 ، سکناس ها توسط نرم افزارهای *Mega 4* *chromas* بررسی شد.

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 (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

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

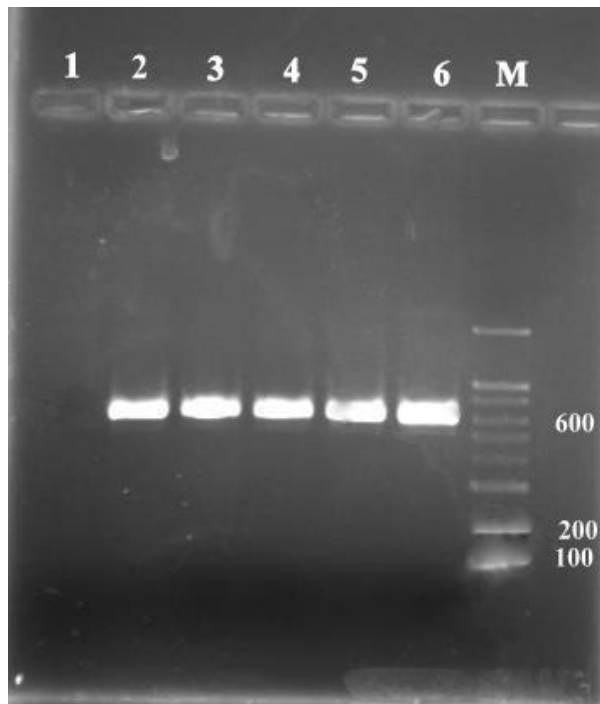
مراحل PCR	دما		زمان	
	<i>prn</i>	<i>fim3</i>	<i>prn</i>	<i>fim3</i>
Initial denaturation	95° c		3 min	
Denaturation	95° c		30 s	
Annealing	57° c		30 s	
Extension	72° c		1 min	
Final extention	72° c		10 min	
تعداد سیکل	35 Cycle			

یافته ها

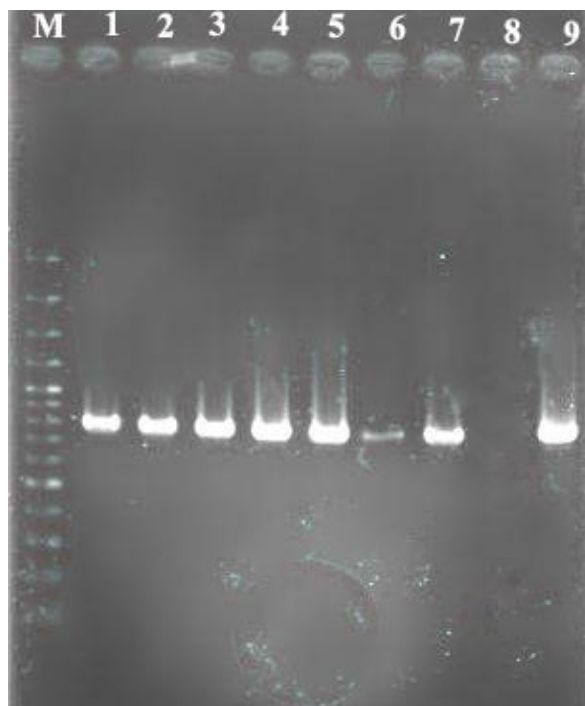
انجام داده بودند. ۱۱ نفر واکسینه نشده بودند و ۵ نفر وضعیت واکسیناسیون آنها مشخص نبود.

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).

از ۳۲۰۵ نمونه ارسال شده به انستیتوپاستور ایران طی سال های ۹۱-۱۳۸۸ ، ۳۵ ایزوله بررسی شد که از این تعداد ۸ سویه جدا شده 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 واکسیناسیون با واکسن سه گانه (DTP) را



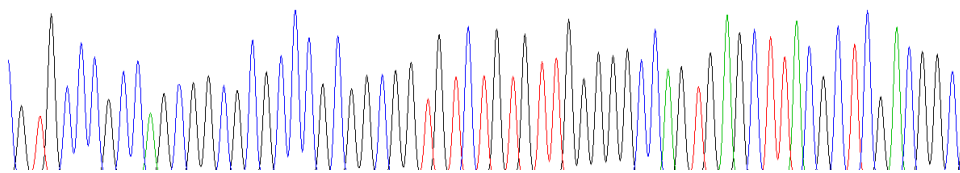
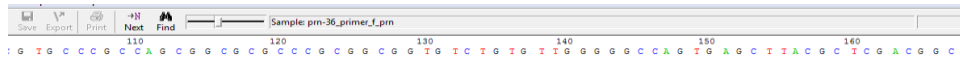
شکل ۱- نتایج PCR ژن *prn* (ردیف M)، 100 bp Ladder (Fermentas)؛ ردیف ۱ نمونه کنترل منفی؛ ردیف ۲ کنترل مثبت بوردتلا پرتوسیسی (ATCC 9797) و ردیف ۱ تا ۶ نتایج سویه های بیمارانی



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

آلل *prn1* و *fim 3-1* را نشان می دهند. آلل های سویه استاندارد واکسن ۱۳۴ شامل *Prn1* و *Fim3-1* بود.

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



شکل ۳ - توالی نمونه ها با نرم افزار *chromas*

ایمونیزاسیون بر علیه دیفتری - کزاز و سیاه سرفه در ایران ، با استفاده از واکسن تمام سلولی سیاه سرفه و توکسوئید دیفتری و کزاز 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 بازپدید سیاه سرفه ، پلی مورفیسم ژن های ویروانس 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 جدا شده 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 ویروانس ناحیه ۱ ژن *prn 3* و *fim 3* در سویه های جدا شده ، بررسی شد.

مطالعات زیادی در کشورهای مختلف (۱۱، ۱۰) 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 ویروانس مهم و پلی مورفیک بوردتلا پرتوسیس می باشند، مطالعه تغییر آنتی ژنی آنها ، حائز اهمیت می باشد . نتایج بدست آمده از این کشورها هم چون نتیجه بدست

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 (۱۶، ۳). 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 (۱۷، ۱۶). امروزه پوشش واکسیناسیون در کشور ایران بر طبق 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 (۱۶، ۵).

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

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 و به همین علت این بیماری چه از سوی خود بیمار و چه 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، در نتیجه 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 و باعث 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، احتمالاً عواملی دیگر (همانطور که قبلاً 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 از ایران و سایر کشورهای اروپایی و آمریکایی، می توان گفت که بازپدید سیاه سرفه یک پدیده جهانی است. در نتیجه پیشنهاد می شود که سایر ژن های ویروالانس مهم باکتری (ptxp - act - fim_۲ - 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 میکروبیشناسی انستیتو پاستور تهران و همکاران انستیتو سرم و واکسن سازی رازی و مرکز مدیریت بیماری های قابل پیشگیری با واکسن به خاطر همکاری در انجام این مطالعه تشکر و قدردانی می نمایم.

آمده در ایران ، مشخص کرد که شیفت آللیک در ژن های *fim* و *prn* اتفاق افتاده است و آلل غالب کشورها از *prn* ۱ به *prn* ۲ و *fim* ۳ 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). متأسفانه از دوران قبل از واکسیناسیون در ایران، هیچ سویه بالینی در دسترس نیست، در نتیجه در مورد وقوع پلی مورفیسیم در ایران دقیقاً نمی توان نظر دارد اما با توجه به مطالعات انجام شده در رابطه با سازگاری و فرار از سیستم ایمنی باکتری می توان گفت که سویه های در گردش جامعه، احتمالاً با سویه هایی که در دوران شروع واکسیناسیون در جامعه بوده اند، از لحاظ آنتی ژنی متفاوت هستند.

سویه ۱۳۴ برای تولید واکسن در ایران استفاده می شود که حاوی آلل های *prn* ۱ 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 آلی 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 کاملاً 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

REFERENCES

References

1. Gelach ,G., von Wintzingerode, F. ., et al. (2001). Evolutionary trends in the genus *Bordetella* *Microb 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.weeklyepidemiol record. 80(4):31-9.
4. Zharaei , S.M. and doosti ,. F. (2008) Distribution of pertussis in Iran in 2007 . The 17 th Iranian 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-Oct1-2013
7. WOODN and McIhtyreP.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 Caesele/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. Cassidy 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

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 14 April, 2008, from http://www.int/immunization_monitoring/en/globalsummary/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 kong CH, Tan T, caro J, plotkin S. Prevention of Pertussis : recommendations derived from the second Global Pertussis Initiative roundtable meeting. *Vaccine* 2007;25:2634-42.
21. Christianweber, Caroline Boursaux-Eude, Gilberte Coralie, Valerie Caro, Nicole Guiso. 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 clin Microbiol.* 2001 December ; 39(12):4396-4403.
22. Kodama Atsuko , Kazunari Kamachi, Yoshinobu Horiuchi, Toshifumi Konda, and Yoshichika Arakawa. Antigenic Divergence Suggested by Correlation between Antigenic Variation and Pulsed-Field Gel Electrophoresis Profiles of *Bordetella pertussis* Isolates in Japan. *J Clin Microbiol.* 2004 December; 42(12): 5453–5457.
23. Nikbin, VS; Shahcheraghi, F; Nakhost Lotfi, 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, van Rie A, Salmaso S et al, Duration of immunity against Pertussis after natural infection or vaccination *Pediatr Infect Dis J* 2005; 24: 558-561.

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,Grimprel 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