Modares Journal of Biotechnology. 2018;9(2):267-275

Analysis of Housekeeping Genes in Bordetella pertussis Vaccine Strains by Multilocus Sequence Typing (MLST)

ARTICLE INFO

Article Type
Original Research

Authors
Noofeli M.* *PhD*,
Asadipour M[1] *MSc*,
Yari R.[2] *PhD*

How to cite this article
Noofeli M, Asadipour M, Yari R. Analysis of Housekeeping Genes in Bordetella pertussis Vaccine Strains by Multilocus Sequence Typing (MLST). Modares Journal of Biotechnology. 2018;9(2):267-275.

*Human Bacterial Vaccines Production & Research Department, Razi Vaccine & Serum Research Institute, Agricultural Research, Education & Extension Organisation (AREEO), Tehran, Iran
[1]Cellular & Molecular Biology Department, Science Faculty, Boroujerd Branch, Islamic Azad University, Borujerd, Iran
[2]Biology Department, Sciences Faculty, Borujerd Branch, Islamic Azad University, Borujerd, Iran

Correspondence
Address: Human Bacterial Vaccines Production & Research Department, Razi Vaccine & Serum Research Institute, Agricultural Research, Education & Extension Organisation (AREEO), Tehran, Iran. Postal Code: 3197619751
Phone: +98 (26) 34570038
Fax: -
noofeli1234@yahoo.com

Article History
Received: November 05, 2016
Accepted: December 16, 2017
ePublished: June 21, 2018

ABSTRACT

Aims *Bordetella pertussis* is a gram negative and obligated aerobic bacterium that causes pertussis disease and it is a specific pathogen in human. Pertussis is an acute respiratory infection and leads to death in infants. The aim of this study was to analyze housekeeping genes in *Bordetella pertussis* vaccine strains by multilocus sequence typing (MLST).

Materials & Methods In the present experimental study, 4 samples of 134 and 509 bacterial strains and 2 standard samples of Tohama I, and 18323 were collected. After biochemical tests, the samples were cultured and separated and the genomic purification of DNA was done by Phenol–chloroform technique and analyzed by MLST. After genome sequencing, the analysis was performed by standard software such as Clustalw 2, MEGA 5.04, and DNASIS Max 3. Sequence similarity of 16S rDNA gene nucleotides was performed, using BLAST software with sequences recorded in the GenBank genome database to compare and determine the sequences similarity.

Findings Regarding the created bands and the sequence of the game, the housekeeping genes in *Bordetella pertussis* vaccine strains were approved. The results of the PCR reaction for Pgm, Icd, Gly A, and Tyr B genes showed that all specimens have homogenous genes with a molecular weight of 500bp.

Conclusion Evaluating the housekeeping genes in *Bordetella pertussis* vaccine strains by MLST vaccine strains (Razi Institute; Iran) correspond with international standard series and no change or deviation has occurred in the studied genes.

Keywords Multilocus Sequence Typing; *Bordetella pertussis*; Housekeeping Gene; Vaccination

CITATION LINKS

[1] Challenges for licensure of new diphtheria, tetanus toxoid, acellular pertussis (DTaP) combination vaccines ... [2] Bordetella pertussis strains with increased toxin production associated with pertussis ... [3] The virulence factors of Bordetella pertussis ... [4] Large-scale comparative analysis of pertussis population dynamics: Periodicity, synchrony, and impact ... [5] Pertussis in the Netherlands: An outbreak despite high levels of immunization with ... [6] Adaptation of Bordetella pertussis to vaccination ... [7] Pertussis vaccines: ... [8] The seroepidemiology of Bordetella pertussis infection in ... [9] Genotypic variation in the Bordetella pertussis virulence factors pertactin and pertussis toxin in historical and recent clinical isolates in the ... [10] Multilocus sequence typing of Bordetella pertussis based on surface ... [11] Multilocus sequence typing of ... [12] Pearl kendrick, grace eldering, and the ... [13] Sequence variation and conservation in virulence-related genes of Bordetella pertussis isolates ... [14] Two methods for extraction of high-purity genomic DNA from mucoid ... [15] Pulsed-field gel electrophoresis, pertactin, pertussis toxin S1 subunit polymorphisms, and surfaceome analysis of vaccine and clinical ... [16] Multilocus sequence analysis of housekeeping genes and antigenic determinant genes in Bordetella ... [17] Comparison of serological and real-time PCR assays to diagnose Bordetella ... [18] BIGSdb: Scalable analysis of bacterial genome variation at the ... [19] Molecular evolution and host adaptation of Bordetella spp.: Phylogenetic analysis using multilocus enzyme electrophoresis and ... [20] Bordetella pertussis and pertussis ... [21] Role of PCR in the diagnosis of pertussis infection in infants: 5 years' experience of provision of a same-day real-time PCR service in England and ... [22] Polymorphism in Bordetella pertussis pertactin and pertussis toxin virulence factors in the ... [23] Polymorphism in the Bordetella pertussis virulence factors p.69/pertactin and pertussis toxin in the Netherlands: Temporal trends and ... [24] Antigenic variants in Bordetella pertussis strains isolated ... [25] Virulence factors variation among Bordetella pertussis isolates ... [26] Molecular epidemiology of Bordetella pertussis by pulsed-field gel electrophoresis ...

Copyright© 2018, TMU Press. This open-access article is published under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License which permits Share (copy and redistribute the material in any medium or format) and Adapt (remix, transform, and build upon the material) under the Attribution-NonCommercial terms.

بررسی ژن‌های خانه‌دار در سویه واکسینال بوردتلا پرتوسیس با تکنیک تایپینگ توالی چندلوکوسی

مجتبی نوفلی • PhD
گروه تولید و تحقیق واکسن‌های باکتریایی پزشکی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران
مریم اسدی‌پور MSc
گروه زیست‌شناسی سلولی و ملکولی، دانشکده علوم، واحد بروجرد، دانشگاه آزاد اسلامی، بروجرد، ایران
رضا یاری PhD
گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، واحد بروجرد، دانشگاه آزاد اسلامی، بروجرد، ایران

چکیده
اهداف: *بوردتلا پرتوسیس* باکتری گرم‌منفی و هوازی اجباری است که عامل بیماری سیاه‌سرفه و پاتوژن انحصاری انسان است. سیاه‌سرفه یک عفونت حاد تنفسی است و در نوزادان منجر به مرگ می‌شود. هدف این پژوهش، بررسی ژن‌های خانه‌دار در سویه واکسینال *بوردتلا پرتوسیس* با تکنیک تایپینگ توالی چندلوکوسی (MLST) بود.
مواد و روش‌ها: در پژوهش تجربی حاضر، چهار نمونه سویه واکسینال *بوردتلا پرتوسیس* ۱۳۴ و ۵۰۹ و دو نمونه استاندارد Tohama I و ۱۸۳۲۳ جمع‌آوری شدند. بعد از انجام آزمایش‌های بیوشیمیایی، کشت و جداسازی آنها، تخلیص DNA ژنومی با روش فنل- کلروفرم و آنالیز توسط روش MLST انجام شد. بعد از تعیین توالی، تجزیه و تحلیل توسط نرم‌افزارهای استاندارد Clustalw 2، MEGA 5.04 و DNASIS Max 3 صورت گرفت. شباهت توالی نوکلئوتیدهای ژن 16S rDNA سویه‌ها به کمک نرم‌افزار BLAST با توالی‌های ثبت‌شده در پایگاه اطلاعاتی ژنومی GenBank برای مقایسه و تعیین میزان تشابه توالی‌ها انجام شد.
یافته‌ها: با توجه به باندهای ایجادشده و همچنین ترادف بازی حاصله، ژن‌های خانه‌دار سویه‌های واکسینال *بوردتلا پرتوسیس* مورد تایید قرار گرفت. نتایج واکنش PCR برای ژن‌های Pgm، Icd، Gly A و Tyr B نشان داد که همه نمونه‌ها دارای ژن‌های خانه‌دار با وزن ملکولی حدود ۵۰۰جفت‌باز بودند.
نتیجه‌گیری: در بررسی ژن‌های خانه‌دار سویه واکسینال *بوردتلا پرتوسیس* با تکنیک MLST، سویه‌های واکسن سیاه‌سرفه (موسسه رازی؛ ایران) با سری‌های استاندارد جهانی مطابقت دارد و هیچ گونه تغییر یا انحرافی در ژن‌های مورد مطالعه رخ نداده است.
کلیدواژه‌ها: تایپینگ توالی چندلوکوسی، بوردتلا پرتوسیس، ژن خانه‌دار، واکسیناسیون

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۸/۱۵
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۹/۲۵
*نویسنده مسئول: noofeli1234@yahoo.com

مقدمه
باکتری مولد بیماری سیاه‌سرفه (*بوردتلا پرتوسیس*)، کوکوباسیل گرم‌منفی کوچکی است که روی اپیتلیوم مخاطی مژک‌دار نازوفارنکس و نای انسان رشد می‌کند. طبق اعلام سازمان بهداشت جهانی (WHO) سالانه ۴۵میلیون مورد از این بیماری در جهان دیده می‌شود و در سال ۲۰۰۲ تعداد ۳۰۱۴۰۸ کودک در اثر ابتلا به سیاه‌سرفه فوت کرده‌اند[1]. در مرحله اولیه عفونت، علایم شبیه به سرماخوردگی به نظر می‌رسد و به‌دنبال آن علایم مشخصه سیاه‌سرفه مانند حملات سرفه (پاروکسیمال) و صدای بلند در تنفس دمی ایجاد می‌شود. پس از این مرحله، بیماران معمولاً با یک مرحله نقاهت طولانی همراه با سرفه بهبود می‌یابند[2]. با این حال برخی از بیماران ممکن است، علایم شدیدتر مانند ذات‌الریه، تشنج، آنسفالوپاتی، شکستگی دنده و حتی مرگ را به‌همراه داشته باشند[3]. بروز جهانی سیاه‌سرفه تا حد زیادی پس از معرفی واکسن کاهش یافته است. با این حال، بررسی‌های لازم در کنترل شیوع سیاه‌سرفه لازم است. از این بررسی‌ها می‌توان به بررسی شیوع بومی حتی در کشورهای پیشرفته با نرخ بالای واکسیناسیون نام برد[4]. همچنین انتقال عفونت از گروه سنی نوزادان تا بزرگسالان حایز اهمیت است. یکی از دلایل، تغییر آنتی‌ژن‌های سطحی ناشی از اثر واکسیناسیون است[5]. افزایش سن از دلایل دیگر ناشی از کاهش اثر ایمنی تزریق واکسن است[6]. اثربخشی واکسن پس از ۶ تا ۸ سال از تزریق آخرین دوز واکسن کاهش می‌یابد، بنابراین ایمنی واکسن برای سال‌های محدودی حفظ و سپس ایمنی به‌تدریج کاهش پیدا می‌کند[7]. تغییرات اپیدمیولوژی، نقص در انجام کامل واکسیناسیون و وجود سوش‌های پلی‌مورفیسم، جهش‌های ژنی در آنتی‌ژن‌های مرتبط با واکسن و کاهش ایمنی بدن با گذشت زمان پس از واکسیناسیون اغلب به‌عنوان توضیح عدم کارآیی واکسن در نظر گرفته شده است[8].

با توجه به موارد فوق، تجزیه و تحلیل افزایش گذرای بروز سیاه‌سرفه در سال ۲۰۰۹، به‌وضوح نیاز برای کنترل بهتر شیوع بیماری سیاه‌سرفه را می‌طلبید. یکی از روش‌ها، بررسی ژنوتیپ ژن‌های سطحی و ژن‌های خانه‌دار (Housekeeping) سویه‌های واکسینال *بوردتلا پرتوسیس* بود. سپس تغییرات ژنوتیپی با روش توالی‌یابی چندلوکوسی (MLST) مورد آنالیز قرار گرفت. راه‌های گوناگونی برای تشخیص بوردتلا یا شاخص‌های ایمونولوژیک عفونت وجود دارد که از جمله می‌توان به روش‌های کشت باکتری، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، استفاده از فلورسنت مستقیم برای یافتن میکروارگانیزم (DFA)، الایزا، واحدهای پشت سر هم‌تکرارشونده (VNTR)، چندشکلی طول قطعات حاصل از برش (RFLP)، روش الکتروفورز ژل میدان پالسی (PFGE) و روش تایپینگ توالی چندلوکوسی (MLST) اشاره کرد. در روش MLST سویه‌های واکسینال *بوردتلا پرتوسیس* جداسازی و بعد از کشت میکروارگانیزم، PCR انجام و سپس تعیین توالی می‌شود[9]. MLST یک روش مبتنی بر تایپینگ توالی برای شناسایی ایزوله‌ها بوده که در گروه توالی (ST) با یک مجموعه ژنوتیپ یکسان است[10]. از مزیت‌های عمده روش MLST در تایپینگ باکتری می‌توان گفت که این امکان را فراهم می‌کند تا نتایج سریع و روشنی به دست آید و همچنین مقایسه بین STها به‌آسانی صورت گیرد. معمولاً هفت هسته متابولیک ژن‌های خانه‌دار منشاگرفته از آنالیز الکتروفورز آنزیمی چندلوکوسی (MLEE) در تجزیه و تحلیل MLST مورد استفاده قرار می‌گیرد. با این حال، ژن‌های دیگر به‌غیر از ژن‌های خانه‌دار، به شرط این که تغییرات ژنتیکی کمی در این ژن‌ها وجود داشته باشد، مورد استفاده قرار می‌گیرند[11].

تنوع توالی به‌ندرت در ژن‌های خانه‌دار دیده می‌شود. با این حال گزارش‌های بسیاری در مورد تغییرات ژنوتیپی در ژن‌های تعیین‌کننده آنتی‌ژنیک وجود دارد[10]. محققان پیشنهاد نموده‌اند که به‌دلیل پیچیدگی سازگار با دستگاه تنفسی انسان که تحت فرآیند پاتوژنتیک و تکاملی است، سرعت بالای تکامل با توسعه واکسن و اثر حفاظتی آن در نظر گرفته می‌شود[3]. در سال ۱۹۴۲ میلادی اولین واکسن سلولی سیاه‌سرفه توسط *کندریک* با توکسوئیدهای دیفتری و کزاز ترکیب شد و با نام واکسن سه‌گانه (DTP) معرفی شد. این واکسن در سال ۱۹۴۹ میلادی در ایالات متحده مجوز ساخت را اخذ نمود و به‌طور گسترده در برنامه واکسیناسیون اطفال مورد استفاده قرار گرفت[12]. واکسن سیاه‌سرفه در دنیا به دو صورت واکسن سلولی سیاه‌سرفه (WCV) و واکسن بدون سلول (ACV) تهیه می‌شود. در نوع WCV از سلول

کامل کشته‌شده با حرارت یا فرمالدئید استفاده می‌شود و در نوع ACV سه تا پنج آنتی‌ژن مهم در ایمنی‌زایی واکسن مورد استفاده قرار می‌گیرد که در ایران واکسن WCV تولید و استفاده می‌شود[8]. در ایران سالهاست که پوشش واکسیناسیون با بهره‌گیری از واکسن سلولی سیاه‌سرفه تولیدشده در موسسه رازی صورت می‌گیرد. از آنجا که پاساژهای متوالی از سویه‌های واکسینال *بوردتلا پرتوسیس* استاندارد در فرآیند تولید این واکسن اجتناب‌ناپذیر است، لذا کنترل ژنومی سویه‌های استاندارد و بررسی جهش‌های احتمالی در سویه و مقایسه آن با استاندارد ضروری است. به‌منظور آنالیز تنوع ژنوتیپی سویه‌ها، ژن‌های خانه‌دار سویه‌های واکسینال *بوردتلا پرتوسیس* با روش MLST و تغییرات احتمالی ژنتیکی ایجادشده در سویه‌های واکسینال مورد استفاده در تهیه واکسن بررسی شد و همچنین این روش برای تولید داده‌های قابل اعتماد برای کنترل سیاه‌سرفه مورد استفاده قرار گرفت. در این پژوهش، تجزیه و تحلیل تغییرات ژنوتیپی هفت ژن خانه‌دار به‌منظور بررسی تنوع ژنی در سویه‌های جداشده در داخل ایران نیز مورد بررسی قرار گرفت. بنابراین هدف پژوهش حاضر، بررسی ژن‌های خانه‌دار در سویه واکسینال *بوردتلا پرتوسیس* با تکنیک تایپینگ توالی چندلوکوسی (MLST) بود.

مواد و روش‌ها

در پژوهش تجربی حاضر، نمونه‌های مورد استفاده شامل سویه واکسینال ۵۰۹ با شماره سری ساخت EXB 51 و EXB 46، همچنین سویه ۱۳۴ با شماره سری ساخت EXB 97 و EXB 91 (موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی؛ ایران) که به‌طور معمول برای تولید واکسن سیاه‌سرفه مورد استفاده قرار می‌گیرد و همچنین دو سویه استاندارد جهانی TohamaI و *بوردتلا پرتوسیس* 18323 به‌عنوان سویه‌های کنترلی بودند. سویه‌ها روی محیط اختصاصی *بوردتلا پرتوسیس*، بورده ژانگو حاوی ۴/۵گرم عصاره سیب‌زمینی، ۱۰میلی‌گرم گلیسرول، ۵گرم هضم پانکراتیک کازئین، ۵گرم هضم پپتیک بافت حیوانی، ۵/۵گرم سدیم‌کلرید (NaCl)، ۲۵-۱۵% خون دفیبرینه گوسفند و ۲۰گرم آگار کشت داده شدند. سپس پلیت‌ها در دمای ۳۷°C به‌مدت ۴۸ ساعت در گرمخانه قرار داده شدند. پس از رشد و تکثیر باکتری، رسوب سلولی تهیه و تا زمان استخراج DNA (حداکثر یک هفته) در فریزر ۲۰°C نگهداری شد[13].

استخراج نوکلئیک‌اسید: برای بررسی مولکولی باکتری جداشده، DNA ژنومی به کمک روش استاندارد استخراج شد[19]. به‌طور خلاصه ابتدا ۵۰۰میکرولیتر سرم فیزیولوژی با رسوب باکتری تهیه‌شده مخلوط و سپس دیواره سلولی باکتری‌ها با دترجنت بافر لیزکننده که شامل تریس Nacl، سدیم‌دودسیل‌سولفات (SDS)، اتیلن‌دی‌آمین‌تترااستیک‌اسید (EDTA؛ مرک؛ آلمان) و آب مقطر بود، تخریب شد. به‌مدت ۱۰ تا ۲۰دقیقه درون ترموبلاک ۸۰°C قرار داده شد و ویال هر چند دقیقه سر و ته شد تا به عمل مخلوط‌شدن بافر و رسوب کمک شود. ۱۰میکرولیتر محلول پروتئیناز K با غلظت ۲۰میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اضافه و در انکوباتور ۳۷°C نگهداری و سپس از محلول فنل- کلروفرم- ایزوآمیل‌الکل (به نسبت ۱:۲۴:۲۵) برای حذف پروتئین‌ها و قندها استفاده شد. برای رسوب نوکلئیک‌اسید از محلول نمکی پلی‌اتیلن‌گلیکول و نیز برای شست‌وشو و حذف سایر ناخالصی‌ها از اتانول خالص استفاده شد[14].

DNA در فاز آبی با اتانول خالص سرد رسوب کرد و پس از شست‌وشو و خشک‌کردن در بافر TE حل‌شده برای آزمایش PCR مورد استفاده قرار گرفت. درستی استخراج نوکلئیک‌اسید با استفاده از الکتروفورز ژل آگاروز یک‌درصد و رنگ‌آمیزی‌شده با DNA safe stain بررسی شد[15].

پرایمرهای اختصاصی *بوردتلا پرتوسیس* و ژن‌های هدف به‌منظور تشخیص قطعی *بوردتلا پرتوسیس* در نمونه‌های واکسینال با استفاده از جفت پرایمرهای F و R که به‌طور اختصاصی برای ژن‌های Pgm، Icd، Gly A و Tyr B طراحی شده بودند، استفاده شد. کلیه طراحی‌های مربوط به پرایمرها با استفاده از رفرنس‌های موجود انجام پذیرفت[16].

شناسایی *بوردتلا پرتوسیس* با روش PCR: برای شناسایی به روش PCR، تهیه DNA ژنومیک *بوردتلا پرتوسیس* و طراحی پرایمرهای اختصاصی برای هر کدام از ژن‌های Pgm، Icd، Gly A و Tyr B انجام گرفت. سپس هر باکتری براساس حضور یا عدم حضور یک یا چند ژن فوق، به‌وسیله واکنش PCR و ارزیابی محصولات آن روی ژل الکتروفورز شناسایی شد (جدول ۱).

جدول ۱) ترادف پرایمرهای مورد استفاده برای تعیین نوع *بوردتلا پرتوسیس* به روش PCR

ژن	توالی پرایمر	اندازه ژن (جفت باز)	تقویت PCR
Pgm	F: CGC CCA TGT CAC CAG CAC CGA R: CGC CGT CTA TCG TAA CCA G	۱۳۸۳	۵۵°C
Icd	F: CTG GTC CAC AAG GGC AAC AT R: ACA CCT GGG TGG CGC CTT C	۱۲۵۷	۵۵°C
Gly A	F: CAA CCA GGG CGT GTA CAT GGC R: CCG CGA TGA CGT GCA TCA G	۱۲۴۸	۵۵°C
Tyr B	F: CGA GAC CTA CGC TTA TTA CGA T R: TGC CGG CCA GTT CAT TTT	۱۲۰۳	۵۵°C

نوع توالی MLST بوردتلا از پایگاه داده www.Pubmlst.org به دست آمد

واکنش PCR: محلول واکنش در حجم نهایی ۲۰میکرولیتر شامل مسترمیکس، منیزیم‌کلرید ($MgCl_2$)، پرایمرهای F و R با غلظت ۱۰پیکومول و آب مقطر به‌همراه یک‌میکرولیتر DNA ژنومیک (در هر واکنش یک تایپ به‌صورت مجزا) با استفاده از دستگاه ترموسایکلر Master cycler (اپندورف؛ آلمان) انجام گرفت. برنامه مورد استفاده برای واکنش PCR با پرایمرهای Pgm، Icd، Gly A و Tyr B شامل یک مرحله واسرشت ابتدایی در دمای ۹۵°C به‌مدت ۵دقیقه و متعاقب آن ۳۰ دور تکرار که هر دور شامل یک مرحله ۹۵°C به‌مدت ۳۰ثانیه (مرحله واسرشت‌شدن)، دمای ۵۵°C به‌مدت یک‌دقیقه (مرحله اتصال پرایمر) و دمای ۷۲°C به‌مدت یک‌دقیقه (مرحله طویل‌شدن) بود و در انتها مرحله طویل‌شدن نهایی برای تکمیل واکنش ساخت DNA شامل دمای ۷۲°C به‌مدت ۱۰دقیقه انجام شد. دستگاه در فاز نگهداری در دمای ۴°C تنظیم و در تمامی واکنش‌های PCR از DNA واکسن استاندارد به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

به‌منظور بررسی محصول PCR، ۶میکرولیتر از آن روی ژل آگاروز ۱% انتقال داده شد و با DNA safe stain در کنار مارکر وزنی ۱۰۰جفت‌بازی (فرمنتاز؛ ایالات متحده) بارگذاری و در ولتاژ ۸۵ به‌مدت یک ساعت الکتروفورز شد. سپس با استفاده از دستگاه ژل داک‌باندها مشاهده و با مارکر مقایسه شد[17]. تخلیص محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز به کمک کیت تخلیص GeneJet (ترموساینتیفیک؛ لیتوانی) انجام شد.

تعیین ترادف ژن: تعیین توالی محصول PCR قطعات تکثیرشده

ژن‌های Pgm، Icd، Gly A و Tyr B مربوط به نمونه‌های واکسن سیاه‌سرفه ۱۳۴ و ۵۰۹ و همچنین نمونه‌های استاندارد Tohama I و ۱۸۳۲۳ (ماکروژن؛ کره جنوبی) و با توجه به طول قطعات تولیدشده در دو جهت جلو (Forward) و معکوس (Reverse) انجام شد تا توالی کامل قطعات به دست آید. پس از به‌دست‌آمدن توالی نوکلئوتیدی هر ژن نمونه‌های واکسینال به‌طور جداگانه، توالی‌های مشابه آنها از بانک ژن استخراج و مورد مقایسه قرار گرفت.

تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیک: مقایسه توالی‌های نوکلئوتیدی و تجزیه و تحلیل تکاملی قطعات تعیین توالی‌شده به‌منظور ترسیم درخت فیلوژنی و تعیین میزان تشابه و اختلاف میان توالی‌های به‌دست‌آمده با استفاده از نرم‌افزارهای رایج استاندارد DNASIS Max 3، Artemis 2 و Clustalw 2 مجدداً بررسی شد. درخت فیلوژنی ژن‌های مربوطه با توالی حاصل از جست‌وجو در پایگاه اطلاعاتی Genbank به کمک نرم‌افزار MEGA 5.04 و با الگوریتم درست‌نمایی بیشینه (Maximum likelihood) و Neighbor joining Tree نیز رسم شد. بررسی اعتبار شاخه با الگوریتم آنالیز بوت‌استرپ (Bootstrap analysis) و با ۱۰۰۰ بار نمونه‌گیری صورت گرفت.

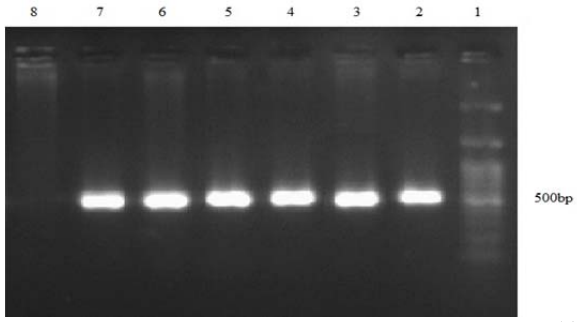
شباهت توالی نوکلئوتیدهای ژن 16S rDNA سویه‌ها به کمک نرم‌افزار BLAST با توالی‌های ثبت‌شده در پایگاه اطلاعاتی ژنومی GenBank برای مقایسه و تعیین میزان تشابه توالی‌ها انجام شد. به این ترتیب نزدیک‌ترین سویه‌ها با ترادف سویه‌های واکسینال و استاندارد تعیین شد[18].

یافته‌ها

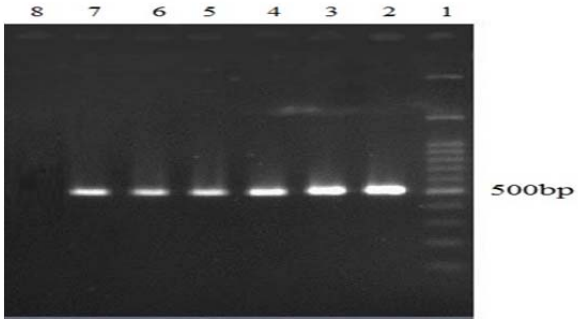
با توجه به باندهای ایجادشده و همچنین ترادف بازی حاصله، ژن‌های خانه‌دار سویه‌های واکسینال *بوردتلا پرتوسیس* مورد تایید قرار گرفت (جدول ۱).

نتایج واکنش PCR برای ژن‌های Pgm، Icd، Gly A و Tyr B نشان داد که همه نمونه‌ها دارای ژن‌های خانه‌دار با وزن ملکولی حدود ۵۰۰جفت‌باز بودند. ستون‌های ۲ تا ۵، باندهای ۴۹۹جفت‌بازی ژن Gly A مربوط به ناحیه بین ۴۰۲ تا ۹۰۱جفت‌بازی (شکل ۱)، ستون‌های ۲ تا ۵، باندهای ۴۸۷جفت‌بازی ژن TyrB مربوط به ناحیه بین ۴۶۲ تا ۹۴۹جفت‌بازی (شکل ۲)، ستون‌های ۳ تا ۶، وجود باندهای ۵۱۲جفت‌بازی ژن Icd مربوط به ناحیه بین ۷۰۴ تا ۱۲۱۶جفت‌بازی (شکل ۳) و ستون‌های ۲ تا ۵، وجود باندهای ۵۴۸جفت‌بازی ژن Pgm مربوط به ناحیه بین ۶۷۲ تا ۱۲۱۶جفت‌بازی را نشان داد (شکل ۴).

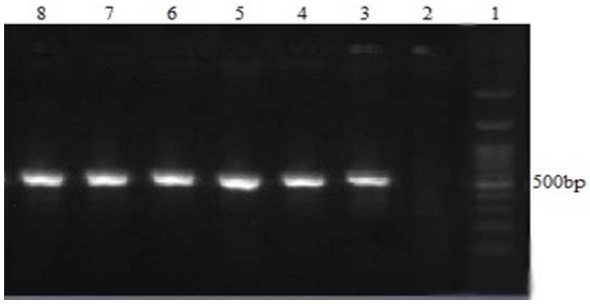
در تصویر درخت فیلوژنی تهیه‌شده مربوط به ژن Gly A (شکل ۵)، نمودار حاصل دارای دو شاخه اصلی بود که نمونه تحقیق حاضر در زیرشاخه نمونه‌های استاندارد Tohama I و ۱۸۳۲۳ دیده شد. همچنین ترادف بازی سویه‌ها، ۱۰۰% مشابه سویه‌های واکسینال جهانی *بوردتلا پرتوسیس* ثبت‌شده در بانک ژن بود. این مشابهت در ژن‌های TyrB (شکل ۶)، Icd (شکل ۷)، Pgm (شکل ۸) نیز به همان صورت قابل مشاهده بود. شکل‌های درخت فیلوژنی تهیه‌شده، *بوردتلا پرتوسیس* ۱۸۳۲۳ از انگلستان، Tohama I از ژاپن، ۱۳۷ از برزیل، CS از چین، B1917 و B1920 از هلند، BPD 420 از انگلستان، P200201 از چین و مابقی از کشورهای مختلف بودند.



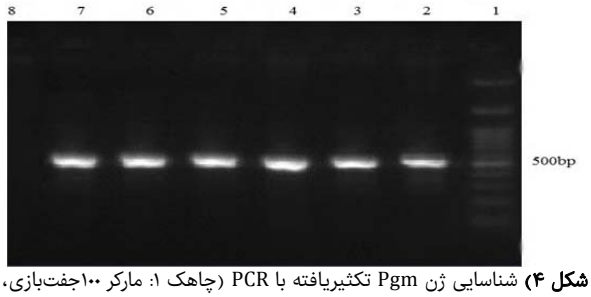
شکل ۱) شناسایی ژن Gly A تکثیریافته با PCR (چاهک ۱: مارکر ۱۰۰جفت‌بازی، چاهک‌های شماره ۲ الی ۵: نمونه‌های واکسینال، چاهک‌های ۶ و ۷: کنترل مثبت، شماره ۸: کنترل منفی؛ ژنوم سویه‌های *بوردتلا پرتوسیس* به‌عنوان الگو مورد استفاده قرار گرفت)



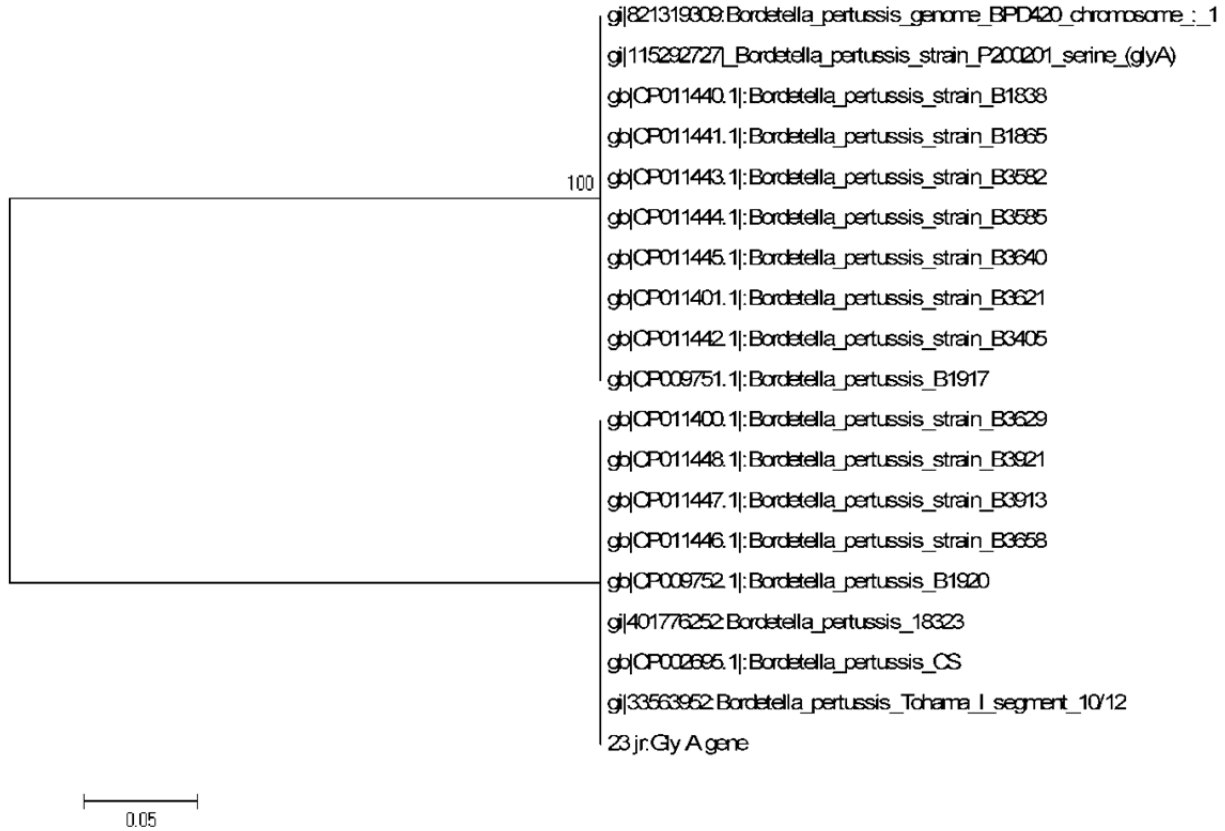
شکل ۲) شناسایی ژن Tyr B تکثیریافته با PCR (چاهک ۱: مارکر ۱۰۰ جفت‌بازی، چاهک‌های ۲ الی ۵: نمونه‌های واکسینال، چاهک‌های ۶ و ۷: کنترل مثبت، شماره ۸: کنترل منفی؛ ژنوم سویه‌های *بوردتلا پرتوسیس* به‌عنوان الگو مورد استفاده قرار گرفت)



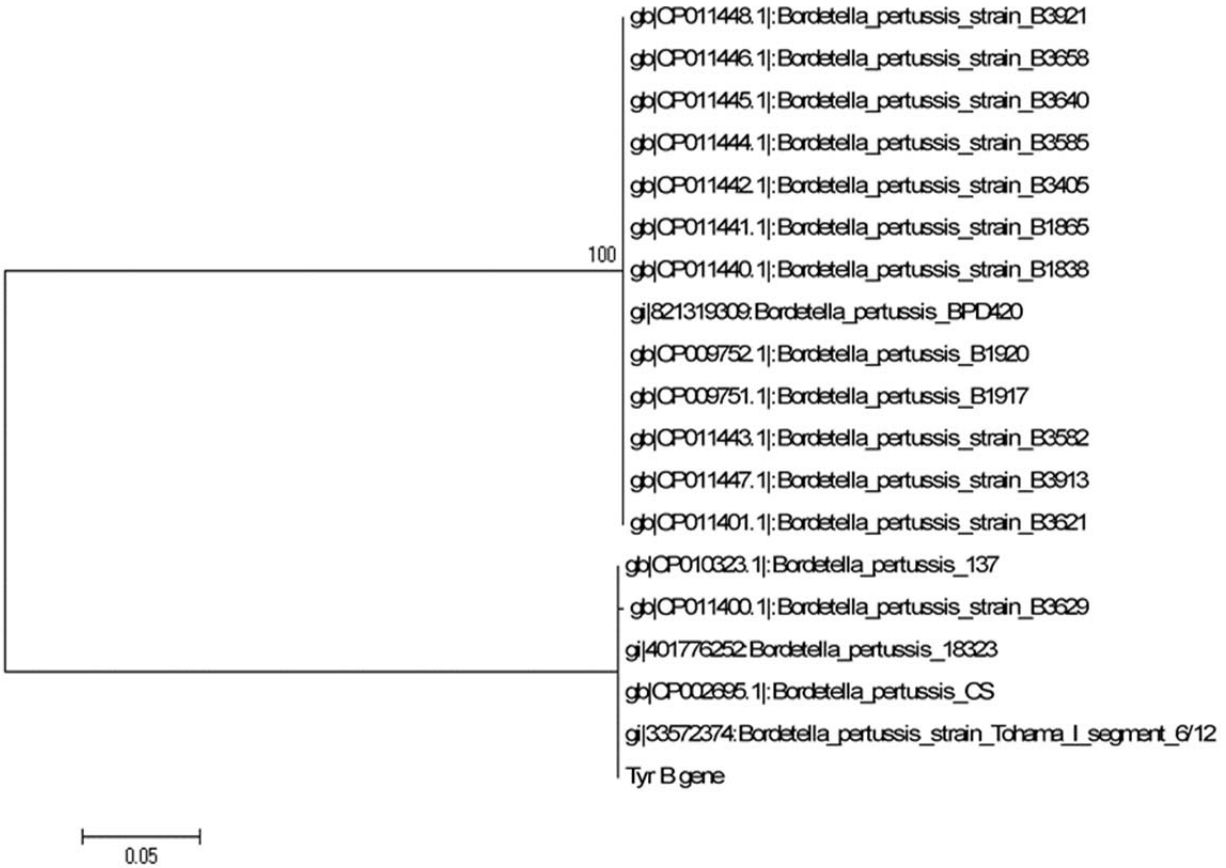
شکل ۳) شناسایی ژن Icd تکثیریافته با PCR (چاهک ۱: مارکر ۱۰۰جفت‌بازی، چاهک‌های شماره ۳ الی ۶ نمونه‌های واکسینال، چاهک‌های ۷ و ۸: کنترل مثبت، شماره ۲: کنترل منفی؛ ژنوم سویه‌های *بوردتلا پرتوسیس* به‌عنوان الگو مورد استفاده قرار گرفت)



شکل ۴) شناسایی ژن Pgm تکثیریافته با PCR (چاهک ۱: مارکر ۱۰۰جفت‌بازی، چاهک‌های شماره ۲ الی ۵: نمونه‌های واکسینال، چاهک‌های ۶ و ۷: کنترل مثبت، شماره ۸: کنترل منفی؛ ژنوم سویه‌های *بوردتلا پرتوسیس* به‌عنوان الگو مورد استفاده قرار گرفت)

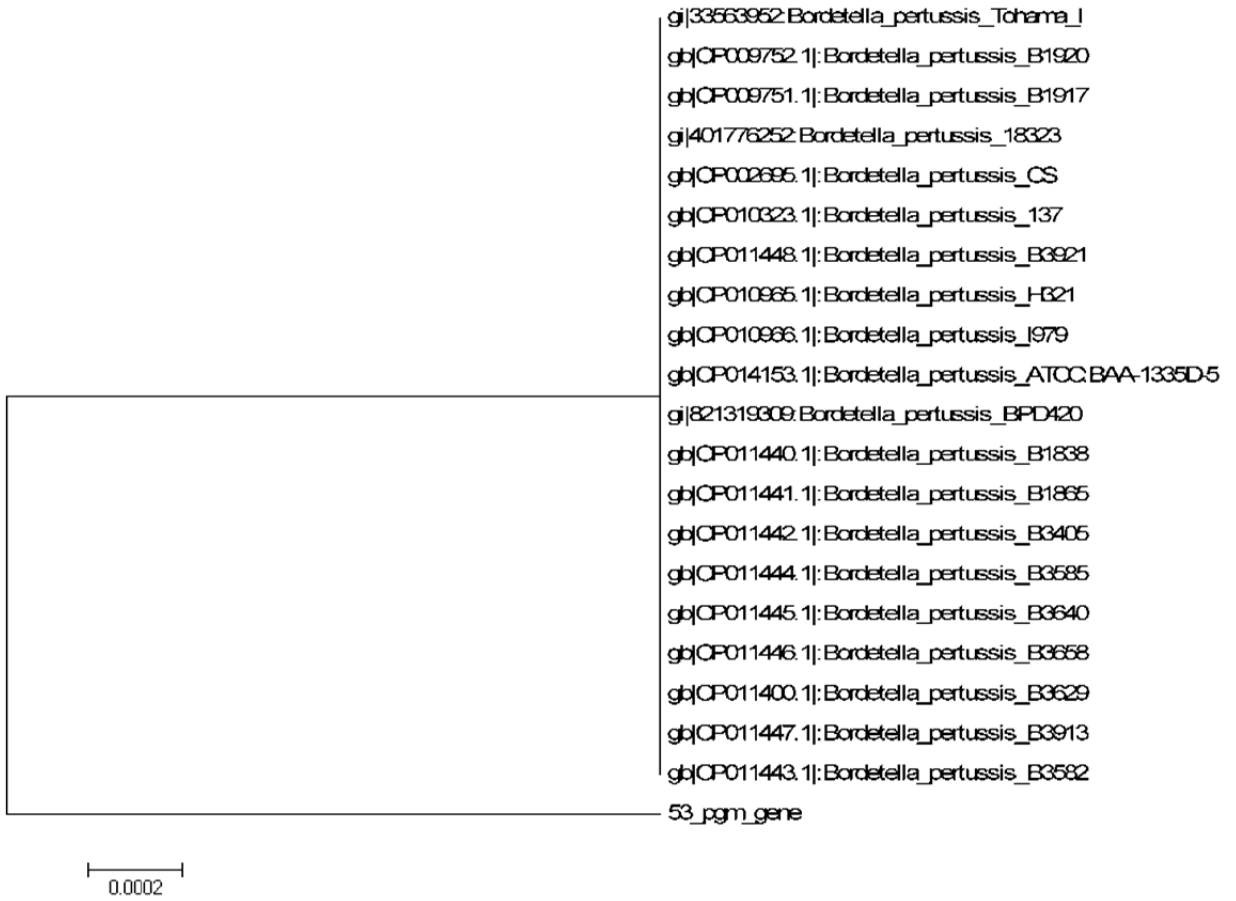


شکل ۵) درخت فیلوژنی براساس آنالیز توالی ژن Gly A نمونه‌های این مطالعه با سایر مطالعات ثبت‌شده در بانک ژن با روش Neighbor Joining Tree



شکل ۶) درخت فیلوژنی براساس آنالیز توالی ژن Tyr B نمونه‌های این مطالعه با سایر مطالعات ثبت‌شده در بانک ژن با روش Neighbor Joining Tree

شکل ۷) درخت فیلوژنی براساس آنالیز توالی ژن Icd نمونه‌های این مطالعه با سایر مطالعات ثبت‌شده در بانک ژن با روش Neighbor Joining Tree



شکل ۸) درخت فیلوژنی براساس آنالیز توالی ژن Pgm نمونه‌های این مطالعه با سایر مطالعات ثبت شده در بانک ژن با روش Neighbor Joining Tree

بحث

پژوهش حاضر با هدف بررسی ژن‌های خانه‌دار در سویه واکسینال *بوردتلا پرتوسیس* با تکنیک MLST انجام شد. سیاه‌سرفه در حال حاضر یکی از ده علل شایع مرگ‌ومیر ناشی از بیماری‌های عفونی در سراسر جهان شناخته شده است. با وجود دردسترس‌بودن واکسن، سیاه‌سرفه به شکل یک بیماری بومی باقی مانده است. بحث‌های متعددی درباره تجدید حیات سیاه‌سرفه در جمعیت واکسینه‌شده از جمله ارتقای نظارت، تغییر در تعاریف و روش‌های تشخیص وجود دارد[9]. شناسایی ژن‌های پلی‌مورفیسم در باکتری‌ها با تجزیه و تحلیل توالی نوکلئوتیدی می‌تواند در نظارت اپیدمیولوژیک پاتوژن‌های باکتریایی مفید باشد. ظهور کتابخانه‌های شناسایی به‌دست‌آمده از سیستم‌های مبتنی بر تعیین توالی استفاده‌شده از ژن‌های خانه‌دار غیرانتخابی مانند روش MLST توانایی شناسایی و ردیابی گونه‌های خاص را در طول زمان تسهیل نموده است. همچنین دیگر نشانه‌هایی که ممکن است تحت فشار تکامل انتخابی قرار گیرد، شامل آنتی‌بیوتیک‌های کدکننده مقاومت پروتئین‌های سطحی است[16].

با توجه به افزایش گذرای بروز بیماری سیاه‌سرفه در کره جنوبی در سال ۲۰۰۹، به‌منظور ارزیابی شیوع بیماری، ژنوتیپ‌های ژن‌های تعیین آنتی‌ژنیک و ژن‌های خانه‌دار در سویه‌های *بوردتلا پرتوسیس* واکسینال شناسایی شدند و پس از آن تغییرات ژنوتیپ با MLST مورد بررسی قرار گرفت[11]. مکانیزم ظهور تنوع دقیقاً شناخته نشده است. با این حال، به نظر می‌رسد دو راه عمده برای ظهور آن وجود دارد، یکی این است که سویه‌های موجود با ایجاد جهش، ژنوتیپ و فنوتیپ‌های مختلفی به دست آورده باشند، دوم این که سویه‌های توزیع‌شده در جامعه توسط عواملی مانند واکسیناسیون انتخاب شده باشند. از این دو عامل، علت اصلی مشخص نیست. در مورد گونه *بوردتلا پرتوسیس* به‌صورت یک جمعیت همگن با الگوی آنالیز MLEE شناخته شده است[19].

از آنجایی که پاساژهای متوالی از سویه *بوردتلا پرتوسیس* استاندارد در فرآیند تولید واکسن *پرتوسیس* امری اجتناب‌ناپذیر است، بدیهی است در صورت ایجاد تنوع و برخی تغییرات ژنتیکی در باکتری مورد استفاده، احتمال استحصال آنتی‌ژن‌های مورد نیاز در فرآورده کاهش یابد، لذا کنترل ژنومی سویه‌های واکسینال به‌صورت دوره‌ای و بررسی تغییرات احتمالی در سویه‌ها و مقایسه آنها با استاندارد ضروری است. بر این اساس با کمک بررسی ویژگی‌های ژنوتیپی سیاه‌سرفه مورد استفاده در تولید واکسن می‌توان با تشخیص الگوی جدید یا غیرمعمول به تغییرات احتمالی در سویه‌ها پی برد[20]. هدف از مطالعات تایپینگ سویه‌های یک باکتری خاص، فراهم‌آوردن شواهد آزمایشگاهی برای ارتباط ژنتیکی سویه‌های جداشده طی یک شیوع بیماری است. این اطلاعات برای دانستن و کنترل انتشار بیماری در محیط بیمارستان و جامعه مفید است. نتایج تایپینگ سویه‌ها در کنترل عفونت دارای کاربردهای زیر خواهد بود:

۱- ایزوله‌هایی که طی یک دوره شیوع، الگوی ژنومی یکسانی نشان می‌دهند، زاده‌های اخیر یک جد یا جد مشترک هستند.

۲- این ایزوله‌ها ژنوتیپ یکسانی خواهند داشت.

۳- ایزوله‌های غیرمرتبط از نظر اپیدمیولوژیک، ژنوتیپ غیرمشابه خواهند داشت، اما اگر تنوع ژنتیکی بین یک گونه یا زیرگونه کم باشد، ژنوتیپ‌های غیرمرتبط می‌توانند مربوط به ایزوله‌های شبیه به هم یا متفاوت از یکدیگر باشند[13].

تکنیک PCR و MLST که امروزه از آنها به‌طور وسیعی در مهندسی ژنتیک و تشخیص طیف گسترده‌ای از عوامل بیولوژیک استفاده می‌شود، روش‌های بسیار اختصاصی و در عین حال حساس برای شناسایی انواع ژن‌ها و عوامل بیولوژیک هستند. این تکنیک‌ها ضمن سادگی می‌توانند به‌طور گسترده‌ای در آزمایشگاه‌های تشخیص طبی برای شناسایی عوامل بیماری‌زا مورد استفاده قرار گیرند[21]. اخیراً در بسیاری از مطالعات در سراسر جهان نشان داده شده است که تنوع آللی در فاکتورهای بیماری‌زای *بوردتلا پرتوسیس* در جمعیت‌های بعد از واکسیناسیون رخ داده است. بررسی‌ها نشان داده است که این تغییرات ممکن است به‌علت سازگاری سویه‌ها باشد. این سازگاری در دوره واکسیناسیون به‌طور قابل ملاحظه‌ای در اثر جهش تک‌نوکلئوتیدی به نام پلی‌مورفیسم تک‌نوکلئوتیدی (SNP) ایجاد می‌شود. به نظر می‌رسد که واکسیناسیون برای انتخاب سویه‌ها با استفاده از فشار انتخابی و تغییر تعادل رقابتی بین سویه‌ها عمل کرده است[22]. بنابراین چنین استنباط می‌شود که ظهور انواع ژنوتیپ در ژن‌های تعیین‌کننده آنتی‌ژنیک، فرآیند فعال *بوردتلا پرتوسیس* برای جلوگیری از اثر حفاظتی واکسیناسیون باشد. این تغییرات ژنوتیپ یک الگوی انتقال با توجه به واکسن را نشان می‌دهد. در هلند، انگلستان، سوئد، تایوان و ژاپن [6, 10, 23] گزارش شده است که به‌تدریج در انواع توالی‌های عمده قبل از شناسایی واکسن، تغییراتی مشاهده شده است. به همین خاطر سویه‌های در گردش شامل ژنوتیپ واکسن پس از واکسیناسیون به‌تدریج کاهش یافته است، در حالی که گونه‌های دیگر با ژنوتیپ‌های مختلف ظاهر شده‌اند[24].

در بسیاری از کشورها، ژنوتیپ‌های مختلف باکتری براساس توالی ژن‌های بیماری‌زا نسبت به سویه‌های مورد استفاده در تولید واکسن سیاه‌سرفه مقایسه می‌شوند. یکی از مزایای استفاده از این روش سهولت در مشاهده فرآیند انتقال باکتریایی در درازمدت است. مثلاً آنالیز ایزوله‌های کره‌ای، یک الگوی انتقالی در ژن‌های تعیین‌کننده آنتی‌ژنیک را نشان داده است. اولین انتقال در ایزوله‌های سال ۱۹۹۹، بدین صورت بود که در ژنوتیپ ژن‌های Ptx S1 و Fim3 تغییراتی مشاهده شد و علاوه بر این، ST عمده ژن‌های خانه‌دار از HST1 به HST2 تغییر یافته بود. انتقال دوم نیز در سال ۲۰۰۹ مشاهده شده است. در آن زمان، بروز سیاه‌سرفه تا حد زیادی در مقایسه با متوسط دهه گذشته افزایش یافته بود. به‌خصوص تغییر ژنوتیپ ژن PRN برای اولین بار در ایزوله‌های کره‌ای تایید و همچنین ST جدید مشاهده شد[16].

نتایج حاصل از مطالعات پیشین در ایران نشان داده است که تیتر آنتی‌بادی پایین در سرم کودکان واکسینه‌شده با واکسن *بوردتلا پرتوسیس* وارداتی می‌تواند پایین‌بودن دوره پوشش ایمنی در ایران را پیشنهاد کند. با این حال در حال حاضر نیاز به بررسی بیشتر حفاظت توسط این واکسن در ایران است[25]. با وجود مطالعات بسیاری در جهان، اطلاعات تنوع گونه *بوردتلا پرتوسیس* در کشورهای آسیایی بسیار نادر است. از آنجایی که تنوع ژنومی و ژنتیکی سویه‌های باکتریایی *بوردتلا پرتوسیس* منجر به تفاوت‌هایی در سطح رونویسی و ترجمه می‌شود، لذا تایپینگ در سطح ژنومی با روش PFGE صورت گرفته و تغییرات کوتاه‌مدت *بوردتلا پرتوسیس* مطالعه و بررسی شده است[26]. با این حال ترکیب واکسن‌های مختلف ممکن است در جمعیت *بوردتلا پرتوسیس* در حال گردش تاثیر بگذارد. اگر چه هیچ مدرکی وجود

ندارد که نسل جدید واکسن سیاه‌سرفه، کنترل بهتری بر بیماری نسبت به WCV دارد، اما از اهداف عمده برای طراحی واکسن‌های جدید، تطبیق پروتئین‌های در حال گردش موجود باکتری در جامعه در واکسن است. باید در نظر داشت که چنین طرحی نیاز به جمع‌آوری منظمی از باکتری‌های جداشده موجود در جمعیت دارد[25]. تغییرات ژنوتیپ‌های سویه‌های در گردش هنوز هم در حال پیشرفت است. اگر چه وضعیت پلی‌مورفیسم ایزوله‌های کره‌ای نسبتاً کمتر از سایر کشورها بود، اما شواهد کافی برای هشدار از خطر شیوع سیاه‌سرفه وجود دارد. به همین دلیل، ساز و کار مناسب در یک سیستم نظارت کارآمد و مستمر برای تشخیص ظهور انواع ژنوتیپ مورد نیاز است[16]. با توجه به انجام تست MLST روی نمونه‌های واکسینال موسسه رازی و همچنین مشاهده و بررسی چند ژن خانه‌دار و مقایسه آنها با نمونه‌های استاندارد و آنالیز توالی‌یابی این نمونه‌ها تغییری در این ژن‌ها مشاهده نشد.

پژوهش حاضر، محدودیتی نداشت. پیشنهاد می‌شود بررسی‌های بیشتر آنتی‌ژن دترمینانت در سویه‌های واکسینال و مقایسه آنها با سویه‌های جداشده از کلینیک صورت گیرد تا مکانیزم شیفت آنتی‌ژنیک یا انتخاب کلونال در سویه‌های در گردش را واضح‌تر نماید که می‌تواند یکی از علل شیوع مجدد سیاه‌سرفه در جامعه باشد و نهایتاً امکان استفاده از سویه‌های غالب در گردش را در ساخت واکسن با رعایت الزامات موجود محتمل‌تر می‌نماید.

نتیجه‌گیری

در بررسی ژن‌های خانه‌دار سویه واکسینال *بوردتلا پرتوسیس* با تکنیک MLST، سویه‌های واکسن سیاه‌سرفه (موسسه رازی؛ ایران) با سری‌های استاندارد جهانی مطابقت دارد و هیچ گونه تغییر یا انحرافی در ژن‌های مورد مطالعه رخ نداده است.

تشکر و قدردانی: از موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی کرج برای حمایت‌های مالی و مشاوره علمی تشکر و قدردانی می‌شود.

تاییدیه اخلاقی: موردی از سوی نویسندگان ذکر نشده است.

تعارض منافع: موردی از سوی نویسندگان ذکر نشده است.

سهم نویسندگان: مجتبی نوفلی (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/روش‌شناس/پژوهشگر اصلی/نگارنده بحث (۳۵%)؛ مریم اسدی‌پور (نویسنده دوم)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر اصلی/تحلیلگر آماری (۳۵%)؛ رضا یاری (نویسنده سوم)، روش‌شناس/نگارنده بحث (۳۰%).

منابع مالی: موردی از سوی نویسندگان ذکر نشده است.

منابع

1- Edwards KM, Decker MD. Challenges for licensure of new diphtheria, tetanus toxoid, acellular pertussis (DTaP) combination vaccines: counterpoint. pediatr Infect Dis J. 1996;15(12):1070-3.

2- Mooi FR, Van Loo IHM, Van Gent M, He Q, Bart MJ, Heuvelman KJ, et al. Bordetella pertussis strains with increased toxin production associated with pertussis resurgence. Emerg Infect Dis. 2009;15(8):1206-13.

3- Smith AM, Guzmán CA, Walker MJ. The virulence factors of Bordetella pertussis: A matter of control. FEMS Microbiol Rev. 2001;25(3):309-33.

4- Broutin H, Guégan JF, Elguero E, Simondon F, Cazelles B. Large-scale comparative analysis of pertussis population dynamics: Periodicity, synchrony, and impact of vaccination. Am J Epidemiol;161(12):1159-67.

5- De Melker HE, Conyn-van Spaendonck MA, Rümke HC, Van Wijngaarden JK., Mooi FR, Schellekens JF. Pertussis in the Netherlands: An outbreak despite high levels of immunization with whole-cell vaccine. Emerg Infect Dis. 1997;3(2):175-8.

6- Mooi FR, Van Loo IH, King AJ. Adaptation of Bordetella pertussis to vaccination: A cause for its reemergence?. Emerg Infect Dis. 2001;7(Suppl 3):526-8.

7- World Health Organization. Pertussis vaccines: position paper. Wkly Epidemiol Rec. 2005;80(4):385-400.

8- Pebody RG, Gay NJ, Giammanco A, Baron S, Schellekens J, Tischer A, et al. The seroepidemiology of Bordetella pertussis infection in Western Europe. Epidemiol Infect. 2005;133(1):159-71.

9- Fry NK, Neal S, Harrison TG, Miller E, Matthews R, George RC. Genotypic variation in the Bordetella pertussis virulence factors pertactin and pertussis toxin in historical and recent clinical isolates in the United Kingdom. Infect Immun. 2001;69(9):5520-8.

10- Van Loo IH, Heuvelman KJ, King AJ, Mooi FR. Multilocus sequence typing of Bordetella pertussis based on surface protein genes. J Clin Microbiol. 2002;40(6):1994-2001.

11- Larsen MV, Cosentino S, Rasmussen S, Friis C, Hasman H, Marvig RL, et al. Multilocus sequence typing of total-genome-sequenced bacteria. J Clin Microbiol .2012;50(4):1355-61.

12- Shapiro-Shapin CG. Pearl kendrick, grace eldering, and the pertussis vaccine. Emerg Infect Dis. 2010;16(8):1273-5.

13- Packard ER, Parton R, Coote JG, Fry NK. Sequence variation and conservation in virulence-related genes of Bordetella pertussis isolates from the UK. J Med Microbiol. 2004;53(Pt 5):355-65.

14- Xiao X, Zhang J, Zhang Q, Wang L, Tan Y, Guo Z, et al. Two methods for extraction of high-purity genomic DNA from mucoid Gram-negative bacteria. Afr J Microbiol Res. 2011;5(23):4013-8.

15- Bottero D, Gaillard ME, Fingermann M, Weltman G, Fernández J, Sisti F, et al. Pulsed-field gel electrophoresis, pertactin, pertussis toxin S1 subunit polymorphisms, and surfaceome analysis of vaccine and clinical Bordetella pertussis strains. Clin Vaccine Immunol. 2007;14(11):1490-8.

16- Jung SO, Moon YM, Kim SH, Sung HY, Kwon SJ, Kang YH, et al. Multilocus sequence analysis of housekeeping genes and antigenic determinant genes in Bordetella pertussis strains isolated in Korea. Osong Public Health Res Perspect. 2011;2(2):115-26.

17- André P, Caro V, Njamkepo E, Wendelboe AM, Van Rie A, Guiso N. Comparison of serological and real-time PCR assays to diagnose Bordetella pertussis infection in 2007. J Clin Microbiol. 2008;46(5):1672-7.

18- Jolley KA, Maiden MC. BIGSdb: Scalable analysis of bacterial genome variation at the population level. BMC Bioinformatics. 2010;11:595.

19- Van Der Zee A, Mooi F, Van Embden J, Musser J. Molecular evolution and host adaptation of Bordetella spp.: Phylogenetic analysis using multilocus enzyme electrophoresis and typing with three insertion sequences. J Bacteriol. 1997;179(21):6609-17.

20- Guiso N. Bordetella pertussis and pertussis vaccines. Clin Infect Dis. 2009;49(10):1565-9.

21- Fry NK, Duncan J, Wagner K, Tzivra O, Doshi N, Litt DJ, et al. Role of PCR in the diagnosis of pertussis infection in infants: 5 years' experience of provision of a same-day real-time PCR service in England and Wales from 2002 to 2007. J Med Microbiol. 2009;58(Pt 8):1023-9.

22- Cassiday P, Sanden G, Heuvelman K, Mooi F, Bisgard KM, Popovic T. Polymorphism in Bordetella pertussis pertactin and pertussis toxin virulence factors in the United States, 1935-1999. J Infect Dis. 2000;182(5):1402-8.

23- Mooi FR, Van Oirschot H, Heuvelman K, Van Der Heide HG, Gaastra W, Willems RJ. Polymorphism in the Bordetella pertussis virulence factors p.69/pertactin and pertussis toxin in the Netherlands: Temporal trends and evidence for vaccine-driven evolution. 1998;66(2):670-5.

24- Mastrantonio P, Spigaglia P, van Oirschot H, van der Heide HG, Heuvelman K, Stefanelli P, et al. Antigenic variants in Bordetella pertussis strains isolated from vaccinated and unvaccinated children. Microbiology. 1999;145(Pt 8):2069-75.

25- Nikbin VS, Jannesar Ahmadi N, Hosseinpour M, Nakhost Lotfi M, Shooraj F, Sadeghpour F, et al. Virulence factors variation among Bordetella pertussis isolates in Iran. Int J Mol Cell Med. 2015;4(2):138-42.

26- Bisgard KM, Christie CD, Reising SF, Sanden GN, Cassiday PK, Gomersall C, et al. Molecular epidemiology of Bordetella pertussis by pulsed-field gel electrophoresis profile: Cincinnati, 1989-1996. J Infect Dis. 2001;183(9):1360-7.