View metadata, citation and similar papers at core.ac.uk
brought to you by CORE
provided by Qazvin University of Medical Sciences Repository

Original Article JQUMS, Vol.21, No.4, 2017, pp. 4-12

Genotypic characterization by multi locus variable number of tandem repeats analysis international *Bordetella pertussis* vaccine strains

M. Fatah Moghadam[1], K. Tadayon[2], R. Ghaderi[2], M. Sekhavati[2], M. Noofeli[3], P. Khaki[4], F. Boroumand Azad[5], S. Saedi[6], Gh. Shokri[2]

[1] Islamic Azad University of Damghan, Damghan, Iran
[2] Department of Veterinary Aerobic Bacteria Vaccines, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran
[3] Human Bacterial Vaccine Department, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran
[4] Department of Microbiology, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran
[5] Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran
[6] Pasteur Institute, Tehran, Iran

Corresponding Address: Keyvan Tadayon, Karaj, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Razi Vaccine & Serum Research Institute, Veterinary Aerobic Bacteria Vaccines Department, Karaj, Iran
Tel: +98-26-34502892, Email: k.tadayon@rvsri.ac.ir
Received: 3 Jun 2017; Accepted: 20 Aug 2017

Abstract

Background: In 1930's first whole cell pertussis vaccines became available to the public heralding a dramatic success in overcoming the global burden of the disease. To date only a handful of *B. pertussis* strains have been used by international/local pertussis vaccine manufacturers. Inevitable well-documented genetic changes in the world population of this pathogen have prompted serious questions on suitability of traditional vaccine strains protect human against currently circulating wild isolates of *Bordetella pertussis*.

Objective: Analyzing the genetic diversity within the most frequently-used vaccine strains of *B. pertussis* in the world

Methods: A recently developed multi locus variable number of tandem repeats analysis (MLVA) genotyping system along with a bioinforamtic piece of analysis was conducted on 11 strain/sub-strains of B137, B203 (10536), C393, Cs, E476, Tohama I, J445 (134), B202 and J446 (509) plus 2 sub-strains of 134 and 509 that are used at Razi institute for preparation of pertussis vaccine. In this study have used 6 individual loci of VNTR1, VNTR3a, VNTR3b, VNTR4, VNTR5 and VNTR6.

Findings: Six distinct genotypes were recognized among the examined strains by comparing our data with the Dutch MLVA databank. These were all new and not reported before in the database.

Conclusion: This observation reiterates on necessity for detection of predominant native strains to include in vaccine preparations suitable for different countries.

Keywords: Pertussis, Strain, Vaccine, Genotyping

Citation: Fatah Moghadam M, Tadayon K, Ghaderi R, Sekhavati M, Noofeli M, Khaki P, Boroumand Azad F, Saedi S, Shokri Gh. Genotypic characterization by multi locus variable number of tandem repeats analysis international *Bordetella pertussis* vaccine strains.
J Qazvin Univ Med Sci. 2017; 21 (4): 4-12.

آنالیز ژنتیکی سویه‌های بین‌المللی واکسن *بوردتلا پرتوزیس* با استفاده از روش آنالیز واحدهای تکرارشونده پشت سرهم (MLVA)

معصومه فتاح مقدم[۱]، دکتر کیوان تدین[۲]، راینا‌ک قادری[۲]، محمد سخاوتی[۲]، دکتر مجتبی نوفلی[۳]، دکتر پژواک خاکی[۴]، فرناز برومند آزاد[۵]، سمانه ساعدی[۶]، غلامرضا شکری[۲]

[۱] دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان، دامغان، ایران
[۲] بخش واکسن‌های باکتریایی هوازی دام‌پزشکی مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران
[۳] بخش واکسن‌های باکتریایی انسانی مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران
[۴] بخش میکروب‌شناسی مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران
[۵] مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران
[۶] انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

آدرس نویسنده مسؤول: کرج، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، بخش واکسن‌های باکتریایی هوازی دام‌پزشکی، تلفن ۳۴۵۰۲۸۹۲- ۰۲۶
تاریخ دریافت: ۹۶/۳/۱۳ ؛ تاریخ پذیرش: ۹۶/۵/۲۹

چکیده

زمینه: از دهه سی میلادی که نخستین نمونه‌های واکسن حاوی جرم کشته سیاه سرفه برای استفاده عمومی تولید گردید تا حال حاضر فقط تعداد انگشت شماری سویه بوردتلا پرتوزیس توسط واکسن‌سازان ملی و بین‌المللی مورد استفاده قرار گرفته است. وجود تغییرات اثبات شده ژنتیکی اجتناب‌ناپذیر در جمعیت جهانی *بوردتلا پرتوزیس* نگرانی‌هایی را در مورد مناسب بودن سویه‌های سنتی واکسن در ایجاد ایمنی کافی بر علیه سویه‌های بیماری‌زای جدید در حال چرخش ایجاد نموده است.

هدف: این مطالعه به‌منظور ارزیابی تنوع ژنتیکی در میان پُر استفاده‌ترین سویه‌های واکسن سیاه سرفه در جهان انجام پذیرفت.

مواد و روش‌ها: در سال ۱۳۹۶روش ژنوتایپینگ (multi locus variable number of tandem repeats analysis, MLVA) به‌صورت آنالیز بیواینفورماتیک بر روی ۱۱ سویه و تحت سویه *بوردتلا* شامل B137, B203(10536), C393, Cs, E476, Tohama I, J445(134), B202, J446(509) و به‌صورت آزمایشگاهی بر روی دو تحت سویه 134 و 509 که در مؤسسه رازی از آن‌ها برای تهیه واکسن استفاده می‌شود اجرا گردید. در این روش از ۶ لوکوس ژنتیکی VNTR1, VNTR3a, VNTR3b, VNTR4 VNTR5, VNTR6 استفاده شد.

یافته‌ها: با بررسی مقایسه‌ای میان نتایج به‌دست آمده و اطلاعات موجود در بانک اطلاعات ژنتیکی موجود در هلند در مجموع ۶ دسته ژنتیکی در میان سویه‌های تحت مطالعه شناسایی گردید که هیچ‌یک پیش از این گزارش نگردیده بودند.

نتیجه‌گیری: این مشاهده‌ها بر ضرورت جستجو به‌دنبال فراوان‌ترین سویه‌های غالب بومی هر کشور برای شمول آن‌ها در تولید واکسن تأکید می‌کند.

کلیدواژه‌ها: سیاه سرفه، سویه، واکسن، دسته‌بندی ژنتیکی

مقدمه:

بوردتلا پرتوزیس یک کوکوباسیل گرم منفی است که عامل ایجاد سیاه سرفه و بروز بیماری شدید تنفسی در کودکان و مرگ و میر در نوزادان می‌باشد. انسان تنها میزبان شناخته شده *بوردتلا پرتوزیس* است و ادامه حیات بیولوژیک آن در گرو تداوم آلودگی میزبان‌های انسانی است.[۱] پیشینه نخستین گزارش همه‌گیری سیاه سرفه به دو بایلو (Guillaume de Baillou) فرانسوی نسبت داده شده که وقوع بیماری در پاریس را در سال ۱۵۷۸ شرح داد.[۲] با معرفی نخستین واکسن‌های مؤثر بر علیه این بیماری در سال‌های مابین دو جنگ جهانی از میزان

تلفات انسانی سیاه سرفه کاسته شد.[۳] در سال ۱۹۵۰ ایمن‌سازی نوزادان و اطفال بر علیه سیاه سرفه از طریق واکسیناسیون سراسری در برنامه کاری دولت ایران قرار گرفت و تولید این واکسن نیز در سال ۱۹۵۳ در مؤسسه رازی کرج آغاز گردید.[۴] در دو دهه اخیر بازگشت همه‌گیری‌های سیاه سرفه در بسیاری از نقاط جهان و از جمله ایران نگرانی‌هایی را برای مسئولین بهداشتی در زمینه کارایی واکسن‌های معاصر محتوی جرم باکتری و فاقد جرم باکتری ایجاد نموده است.[۵] در سال ۱۳۹۰ استان‌های تهران و مازندران بیش‌ترین گزارشات وقوع سیاه سرفه را به خود اختصاص دادند.[۶و۷] *بوردتلا پرتوزیس* از نظر ژنتیکی یکنواخت شناخته می‌شود و سطح محدودی از تنوع ژنتیکی در ژنوم آن شناخته شده است و به‌همین دلیل مطالعه ژنتیکی جمعیت‌های این باکتری در نقاط مختلف جهان با دشواری مواجه می‌باشد. روش‌هایی نظیر PFGE، MLST، RFLP برای دسته‌بندی ژنتیکی *بوردتلا پرتوزیس* معرفی شده‌اند.[۸-۱۳] سیستم دسته‌بندی ژنتیکی متکی بر واحدهای تکرارشونده پشت سر هم (multiple-locus variable-number tandem repeat analysis, MLVA) در سال ۲۰۰۴ توسط شولز در مورد باکتری *بوردتلا پرتوزیس* عرضه شد.[۱۴] در این روش وجود تعداد متفاوتی از واحدهای تکرارشونده در لوکوس‌های مختلف موجود در سرتاسر ژنوم باکتری به‌صورت مقایسه‌ای میان جدایه‌های یک باکتری بررسی می‌شوند. این تفاوت‌ها معیار شناسایی تنوع ژنتیکی در میان جدایه‌های تحت بررسی قرار می‌گیرد. در روش پیشنهادی شولز ۶ لوکوس از واحدهای تکرارشونده پشت سرهم به نام‌های VNTR1 VNTR2 VNTR3 VNTR4 VNTR5 VNTR6 مورد استفاده قرار می‌گیرد.

در سال‌های پس از آن با حذف لوکوس VNTR2 و تقسیم لوکوس VNTR3 به دو قسمت VNTR3a و VNTR3b سیستم بین‌المللی دسته‌بندی ژنتیکی متمرکز *بوردتلا پرتوزیس* براساس MLVA توسط مؤسسه ملی بهداشت عمومی و محیط زیست هلند (National Institute for Public Health and Environment) تکمیل و توسعه یافت (قابل دسترسی از طریق تارنمای (http://www.mlva.net/bpertussis/default.asp).[۸] تا آوریل ۲۰۱۷ تعداد ۳۲۶ دسته ژنتیکی این باکتری از تمام جهان در این بانک اطلاعاتی ثبت گردیده است. در مطالعه حاضر ژنوم سویه‌های واکسن بوردتلا پرتوزیس 134 و 509 مورد استفاده در تولید واکسن سیاه سرفه در ایران (مؤسسه رازی) با استفاده از روش MLVA مورد بررسی و آنالیز ژنتیکی قرار گرفت.

❋مواد و روش‌ها:

این تحقیق طی سال‌های ۱۳۹۴ و ۱۳۹۵ در مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی کرج انجام شد. دو سویه *بوردتلا پرتوزیس* 509 و *بوردتلا پرتوزیس* 134 از بایگانی بخش تولید واکسن سیاه سرفه مؤسسه رازی انتخاب و پس از کشت بر روی محیط اختصاصی آگار بورده ژنژو غنی شده با ۱۵ درصد خون گوسفند به مدت ۴ تا ۵ روز کشت و در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد تا هنگام تشکیل پرگنه‌های قابل رؤیت نگه‌داری شدند. ژنوم باکتری به روش ساده جوشاندن در بن‌ماری فراهم گردیدو از سوسپانسیون به‌دست آمده به‌صورت مستقیم در آزمایش‌های PCR استفاده شد.[۱۵]

در مطالعه حاضر به‌منظور سازگار نمودن روش دسته‌بندی ژنتیکی متکی بر واحدهای تکرارشونده پشت سرهم با ماشین‌های ترموسایکلر و سیستم ژل الکتروفورز متعارف و با استفاده از نرم‌افزار تخصصی آرتمیس و Primer 3 نسبت به طراحی پرایمرهای جدید براساس ژنوم سویه آزمایشگاهی Tohama I اقدام گردید. لوکوس‌های شش‌گانه مؤسسه ملی بهداشت عمومی و محیط زیست هلند (VNTR1, VNTR3a, VNTR3b, VNTR4 VNTR5 VNTR6) برای این منظور انتخاب و ساخت پرایمرهای طراحی شده توسط شرکت ماکروژن کره جنوبی انجام پذیرفت.[۱۶و۱۷] (جدول شماره ۱).

برای دستیابی به بهترین برنامه تلفیقی دما، زمان و همچنین اجزای تشکیل‌دهنده PCR از روش نجفی و

همکاران استفاده شد.[۱۸و۱۹] حجم همه واکنش‌های PCR برابر ۱۲ میکرولیتر تنظیم گردید؛ به‌طوری‌که ۶ میکرولیتر از مخلوط آماده مصرف PCR از کیت تجارتی آماده مصرف آمپلیکون (دانمارک,®Amplion) همراه با ۰/۲ میکرولیتر از محلول کاری هر یک از دو پرایمر با غلظت ۵ پیکومول در میکرولیتر و ۵/۱ میکرولیتر نمونه DNA همراه با ۴/۱ میکرولیتر آب مقطر دو بار تقطیر مخلوط گردیدند. از Double Distilled PCR water به‌عنوان شاهد منفی استفاده گردید.

برنامه آمپلیفیکاسیون شامل؛ یک نوبت واسرشت مقدماتی تحت شرایط ۴۵ ثانیه، ۹۵ درجه سانتی‌گراد و سپس ۳۰ چرخه متوالی واسرشت ۴۵ ثانیه، ۹۵ درجه سانتی‌گراد، اتصال برای ۴۵ ثانیه در دمای ۶۲ درجه سانتی‌گراد و به‌دنبال آن گسترش با دمای ۶۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد که با مرحله نهایی تکمیلی گسترش به‌شرح ۶۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد خاتمه یافت. پس از بارگذاری محصولات PCR و شاخص اندازه (۱۰ میکرولیتر در هر چاهک)،[۱۹] الکتروفورز ژل‌ها (آگاروز ۱/۵ درصد پیش رنگ شده) با ترکیب رنگ‌آمیزی تجاری DNA (Red Safe) به‌مدت ۲ ساعت در میدان الکتریکی به قدرت ۲ ولت بر سانتی‌متر لیتر انجام شد.

محصولات حاصل از آمپلیفیکاسیون ۱۰ لوکوس ژنوم سویه‌های *بوردتلا پرتوزیس* 134 و *بوردتلا پرتوزیس*509 تعیین توالی و با به‌کارگیری نرم‌افزارهای تخصصی نظیر نسخه ۲/۱ Chromas lite و Clustal پردازش شدند تا تعداد واحدهای تکرارشونده به کمک نرم‌افزار TRF تعیین گردد.[۲۰و۲۱]

با مراجعه به بانک اطلاعات MLVA هلند تعداد واحدهای تکرارشونده در هر لوکوس جهت تعیین دسته ژنتیکی هریک از دو سویه توسط موتور جستجوی سیستم مورد بررسی قرار گرفت. اطلاعات (تعداد تکرارها) هر یک از ۳۲۶ دسته ژنتیکی *بوردتلا پرتوزیس* موجود در بانک اطلاعات MLVA هلند و همچنین دو سویه تحت بررسی به‌صورت فایل اکسل به نرم‌افزار ۶/۷ BioNumerics (Applied Maths, Kortrijk Belgium), انتقال داده شد تا در رسم نمودار درخت پوشای مینیمم براساس ارتباط ژنتیکی میان آن‌ها استفاده شود.

❋ یافته‌ها:

اجرای PCR با استفاده از یک برنامه عمومی از نظر دما و اجزای واکنش قابل استفاده برای هر ۶ لوکوس امکان‌پذیر و توالی نوکلئوتیدها در محصولات تکثیر PCR سویه *بوردتلا پرتوزیس* 134 و *بوردتلا پرتوزیس* 509 تعیین گردید. در بررسی بیواینفورماتیک مشاهدات در میان ۱۱ سویه واکسن تحت مطالعه، ۵ دسته ژنتیکی MLVA شناسایی گردید که پیش‌بینی می‌شود براساس اطلاعات ثبت شده موجود در بانک اطلاعات MLVA هلند جدید شناخته شده و با کُدهای احتمالی MT327، MT328، MT330، MT329 و MT331 ثبت گردند (جدول شماره ۲).

جدول ۱- جزئیات پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه

لوکوس PCR	منبع	توالی پرایمر 5' → 3'
VNTR1	(۷)	F- CCC AAT CCC GAC AAC ATC CT R- CGA CAC GGG CAT ATT GGG AA
VNTR3 (a&b)	این مطالعه	F- GTT CAC GCT GAC CAA CAA CC R - ATCTGCTTGAGCGGATAGGC
VNTR4	این مطالعه	F- CCCT GAC CCT GGA CAG CCT R- CAG GCT GCT GAG ATC ATC GTC G
VNTR5	این مطالعه	F- CCG GAC AAA TTC GAC ATC R- AGCCGTTGGCCGAATAGAG
VNTR6	این مطالعه	F- CCA GGG CCT TCA GTT CGG R- CAC CAA TCT CAC GCA AAC GGT

جدول ۲- اندازه محصولات PCR در آزمایش VNTR در سویه‌های *بوردتلا پرتوزیس* و دسته ژنتیکی (MT) آن‌ها براساس بانک اطلاعات مرکز RIVM هلند

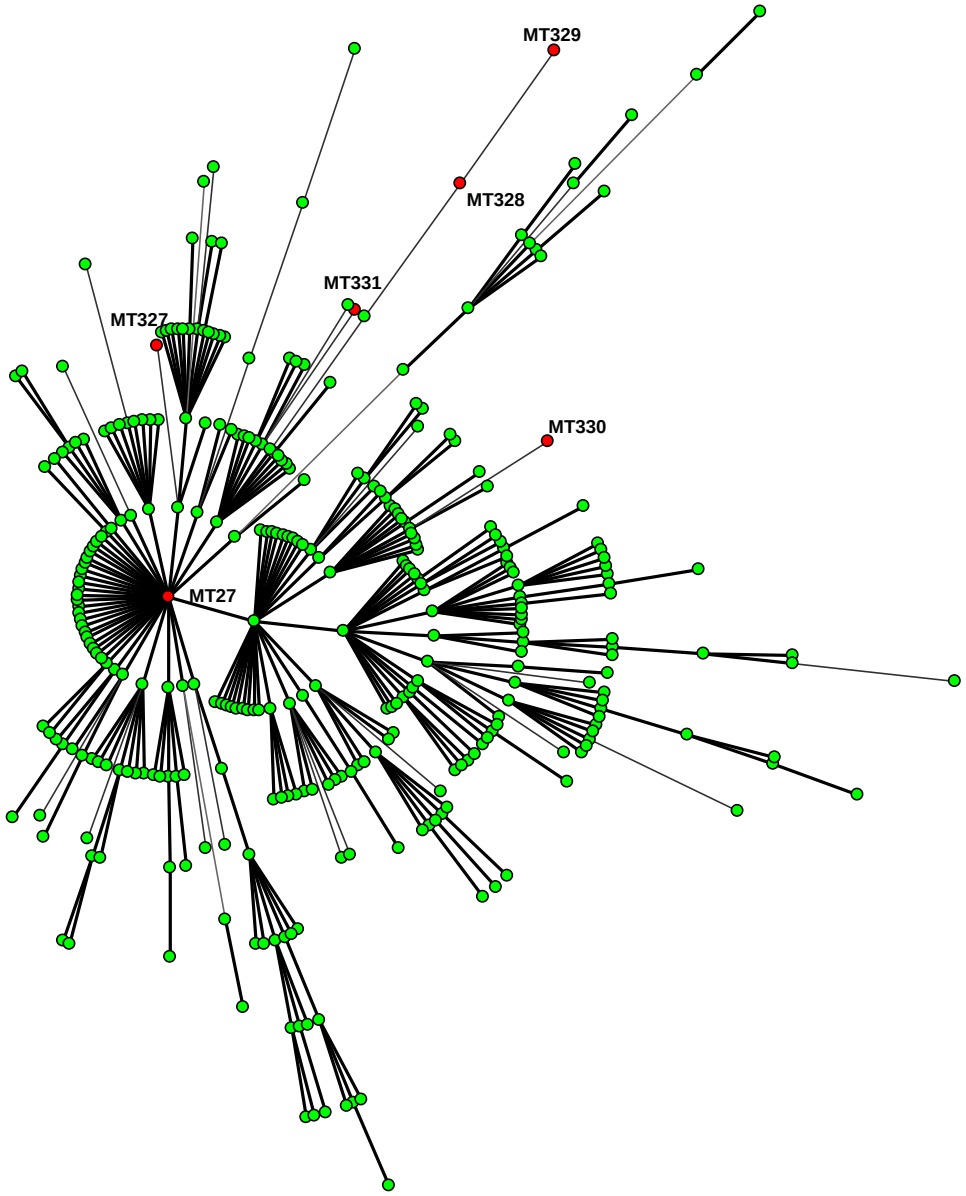
سویه (اسامی مشابه)	مشخصات (نام تولیدکننده)	خواستگاه	تاریخ جداسازی اولیه	*VNTR1*	*VNTR3a*	*VNTR3b*	*VNTR4*	*VNTR5*	*VNTR6*	*MT*
				www.mlva.net/bpertussis						
B137	Vaccine (Butantane Institute)	برزیل	نامشخص	۳۶۸	۱۲۵	۰	۲۰۸	۱۷۳	۲۳۸	۳۲۷
B203 (10536)	Vaccine	آمریکا	نامشخص	۳۶۸	۱۲۵	۰	۲۰۸	۱۷۳	۲۳۸	۳۲۷
C393	Vaccine	چین	۱۹۵۱	۳۸۳	۱۳۵	۰	۲۰۸	۱۴۳	۲۸۰	۳۲۸
CS	Vaccine	چین	۱۹۵۱	۳۸۳	۱۳۵	۰	۲۰۸	۱۴۳	۲۸۰	۳۲۸
E476	Vaccine	ژاپن	۱۹۵۴	۳۸۳	۱۳۵	۰	۲۳۲	۱۴۳	۲۷۴	۳۲۹
Tohama	Vaccine	ژاپن	۱۹۵۴	۳۸۳	۱۳۵	۰	۲۳۲	۱۴۳	۲۷۴	۳۲۹
134	Vaccine (RVSRI)	نامشخص	نامشخص	۳۵۳	۱۳۵	۱۳۵	۲۲۰	۱۳۷	۲۵۶	۳۳۰
J445 (134)	Vaccine (Serum Institute of India Pvt. Ltd.)	هندوستان	نامشخص	۳۵۳	۱۳۵	۱۳۵	۲۲۰	۱۳۷	۲۵۶	۳۳۰
B202 (134)	Vaccine	نامشخص	نامشخص	۳۵۳	۱۳۵	۱۳۵	۲۲۰	۱۳۷	۲۵۶	۳۳۰
509	Vaccine (RVSRI)	نامشخص	نامشخص	۳۹۸	۱۲۵	۰	۲۰۸	۱۷۳	۲۴۷	۳۳۱
J446 (509)	Vaccine (Serum Institute of India Pvt. Ltd.)	هندوستان	نامشخص	۳۹۸	۱۲۵	۰	۲۰۸	۱۷۳	۲۴۷	۳۳۱
Pelita III	Vaccine (BioPharma Indonesia)	ژاپن	نامشخص	۳۸۳	۱۳۵	۰	۲۳۲	۱۱۴	۲۸۳	نامشخص

❋بحث و نتیجه‌گیری:

براساس یافته‌های موجود در دوران پیش از معرفی و استفاده از واکسن‌های کشته شده سیاه سرفه در جهان از میان سویه‌های مختلف رایج *بوردتلا پرتوزیس*، ۱ تا ۲ سویه به‌صورت غالب و بدون نشان دادن محدودیت انتشار جغرافیایی سبب ایجاد بیماری در انسان شده‌اند. در مناطقی که واکسیناسیون نوزادان و اطفال به صورت مؤثر انجام شده است سویه‌های واکسینال به‌تدریج در جمعیت انسانی حذف و یا فراوانی آن‌ها به‌شدت کاهش یافت. به‌همین ترتیب در مناطق با پوشش کم واکسن، فراوانی سویه‌های فعال و در گردش نسبت به زمان پیش از آغاز واکسیناسیون تفاوت فاحشی را نشان نداده است.[۱] این مشاهدات همراه با ویژگی ژنوم *بوردتلا پرتوزیس* که با استفاده از توانایی‌های قطعات نفوذکننده از نظر تکاملی فعال، در حال تغییر و کسب قدرت سازگاری بیش‌تر با میزبان خود می‌باشد، نشان می‌دهند که جمع‌آوری جدایه‌های کلینیکی این باکتری و انجام مطالعات دسته‌بندی ژنتیکی جهت شناسایی سویه یا سویه‌های غالب و استفاده از این سویه‌ها در تولید واکسن در هر کشوری موجه و ضروری می‌باشد.[۱] ارتباط ژنتیکی میان ۳۳۱ دسته *بوردتلاپرتوزیس* از تمام جهان که با سیستم MLVA بررسی، شناسایی و تفاوت‌های موجود میان سویه‌های واکسینال شناخته شده جهان که از مناطق مختلف جغرافیایی انتخاب شده‌اند نشان داده شده است (شکل و جدول شماره ۱).

مطالعات انجام شده با استفاده از روش تایپینگ MLVA نشان داد که برخی از دسته‌های ژنتیکی *بوردتلا پرتوزیس* متأثر از عوامل محیطی نظیر واکسیناسیون می‌توانند از فراوانی بیش‌تری در جمعیت‌های میزبان این باکتری برخوردار باشند. به‌عنوان نمونه MT27 در بسیاری از همه‌گیری‌های سیاه سرفه در اکثر مناطق اروپا، استرالیا، آمریکا، انگلستان و ژاپن به‌عنوان سویه غالب شناخته شده است (شکل شماره ۱).[۲۲-۲۶]

شکل ۱- درخت پوشای مینیمم توزیع شده از ارتباط ژنتیکی میان ۳۳۱ دسته ژنتیکی موجود در بانک اطلاعات MLVA هلند



شناسایی ۵ دسته ژنتیکی در میان ۱۱ سویه واکسینال تحت بررسی با در نظر گرفتن تفاوت حداقل در ۳ لوکوس VNTR (جدول شماره ۲) بین نزدیک‌ترین این سویه‌ها می‌تواند نشان‌دهنده دامنه تفاوت احتمالی در ویژگی‌های فنوتیپی میان این سویه باشد. این گونه تفاوت‌ها پیش از این در جریان انجام مطالعه بر روی قدرت ایمنی‌زایی و کارایی بالینی واکسن‌های تولید شده با استفاده از این سویه‌ها نشان داده شده است.[۱و۲۷و۲۸] در شرایطی که دسته ژنتیکی MT330 در سیستم MLVA برای سویه ۱۳۴ تعیین گردید، دسته ژنتیکی MT331 برای سویه ۵۰۹ احراز شد. تفاوت این دو سویه گسترده و در همه ۶ لوکوس تحت بررسی مشاهده گردید (جدول شماره ۲). تفاوت میان این دو سویه که از آن‌ها برای تهیه واکسن در ایران استفاده می‌شود پیش از این نیز توسط حقیقی با استفاده از روش PFGE شناسایی شده است.[۲۹و۳۰]

در سال ۲۰۰۴ شولز وجود یک موقعیت دوم برای حضور لوکوس VNTR3 در برخی از سویه‌های *بوردتلا پرتوزیس* را گزارش و بر همین اساس این لوکوس را به VNTR3a و VNTR3b تقسیم نمود. این ویژگی به‌ندرت در مورد لوکوس‌های VNTR باکتری‌های دیگر مشاهده شده است.[۱۴،۱۸و۲۲] در مطالعه حاضر در بین ۱۱ سویه تحت بررسی وجود موقعیت دوم برای این لوکوس فقط در سویه‌های ۱۳۴ شناسایی گردید (جدول شماره ۲). نویسندگان مقاله حاضر معتقدند وجود موقعیت دوم از این لوکوس فقط در ژنوم برخی از سویه‌های *بوردتلا پرتوزیس* در نتیجه بروز یک تغییر در مسیر تکامل ژنتیکی این سویه باشد که اسباب ظهور یک کلون جدید در جمعیت جهانی آن را فراهم نموده است. در شکل ۱ که ارتباط ژنتیکی میان همه دسته‌های ژنتیکی MLVA حال حاضر ثبت شده در بانک اطلاعات MLVA هلند نشان داده شده است، اشتقاق این سویه از سایر سویه‌های مورد بررسی مشخص گردیده است. در حال حاضر اطلاعی از فراوانی احتمالی این سویه‌ها در ایران در اختیار نمی‌باشد.

در پاکستان، فراوانی *بوردتلا پاراپرتوزیس* براساس یافته‌های آزمایشگاهی حاصل ازکشت نمونه‌های کلینیکی اخذ شده از بیماران مبتلا به عوارض شبیه سیاه سرفه حتی از *بوردتلا پرتوزیس* نیز بیش‌تر گزارش شد (۷/۳۵ درصد در مقایسه با ۰/۵ درصد).[۳۱] این تفاوت فاحش در فراوانی به قدرت ناکافی واکسن مورد استفاده در پاکستان در ایجاد ایمنی مناسب بر علیه *بوردتلا پاراپرتوزیس* نسبت داده شده است. اگرچه فراوانی *بوردتلا پاراپرتوزیس* در میان میزبان‌های ایرانی به مراتب کم‌تر از شهروندان پاکستانی گزارش شده است[۳۲] اما به‌نظر می‌رسد لازم است موضوع اهمیت احتمالی این باکتری در بروز سیاه سرفه در ایران در انتخاب و تولید واکسن مورد توجه متولیان بهداشتی قرار گیرد. یادآور می‌شود که نوع واکسن مصرفی در هر دو کشور پاکستان و ایران مشابه و از نوع واکسن محتوی باکتری کشته (غیرفعال شده) می‌باشد.

مؤلفین معتقدند با استفاده از روش‌های ژنوتایپینگ نظیر MLVA و تعمیم آن‌ها به جدایه‌های کلینیکی می‌توان نسبت به شناسایی فراوان‌ترین سویه‌های *بوردتلا پرتوزیس* در حال گردش در ایران اقدام و با شمول آن‌ها در سویه‌های مورد استفاده برای تولید واکسن دستیابی به هدف کنترل بیماری را در دسترس قرار داد.

❋سپاس‌گزاری:

این تحقیق مورد حمایت مالی و لجستیکی مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی کرج می‌باشد. بدین‌وسیله از دکتر مارجلین ون گنت محقق مسئول بانک اطلاعات ژنوتیپ‌های MLVA در مؤسسه ملی بهداشت عمومی و محیط زیست هلند برای نظرات کارشناسی سازنده و مشاوره فنی در این پروژه قدردانی می‌گردد.

❋مراجع:

1. Guiso N. Bordetella pertussis and pertussis vaccines. Clin Infect Dis 2009; 49(10): 1565-9. doi: 10.1086/644733.

2. Cone TC Jr. Whooping cough is first described as a disease sui generis by Baillou in 1640. Pediatrics 1970; 46(4): 522.

3. Yarmohammadi H, Bahmani Kazeruni MH, Soofi A, Zargaran A. The first report of epidemic pertussis by Bahaodowle Razi from the 15th century anno domini. Iran Red Crescent Med J 2015; 17(7): e13454. doi: 10.5812/ircmj.13454.
4. Sabbe M, Vandermeulen C. The resurgence of mumps and pertussis. Hum Vaccin Immunother 2016; 12(4): 955-9. doi: 10.1080/21645515.2015.1113357.
5. Mirchamsy H, Taslimi H, Aghdachi M. Sur La Preparation Et L'utilisation Des Vaccins Associes: Antidiphterique, Antitetanique et Anticoquelucheux en Iran. Acta Medica Iraniac 1960; 3(2): 14-29.
6. Guiso N. Bordetella pertussis: why is it still circulating? J Infect 2014; 68 Suppl 1: S119-24. doi: 10.1016/j.jinf.2013.09.022.
7. Khazaei S, Ayubi E, Mansori K, Khazaei S. Pertussis incidence by time, province and age group in Iran, 2006-2011. Iran J Public Health 2016; 45(11): 1525-7.
8. de Moissac YR, Ronald SL, Peppler MS. Use of pulsed-field gel electrophoresis for epidemiological study of Bordetella pertussis in a whooping cough outbreak. J Clin Microbiol 1994; 32(2): 398-402.
9. Vodzak J, Queenan AM, Souder E, Evangelista AT, Long SS. Clinical manifestations and molecular characterization of pertactin-deficient and pertactin-producing bordetella pertussis in children, Philadelphia 2007-2014. Clin Infect Dis 2017; 64(1): 60-6.
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. Du Q, Wang X, Liu Y, Luan Y, Zhang J, Li Y, et al. Direct molecular typing of Bordetella pertussis from nasopharyngeal specimens in China in 2012-2013. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2016; 35(7): 1211-4. doi: 10.1007/s10096-016-2655-3.
12. van der Zee A, Vernooij S, Peeters M, van Embden J, Mooi FR. Dynamics of the population structure of Bordetella pertussis as measured by IS1002-associated RFLP: comparison of pre- and post-vaccination strains and global distribution. Microbiology 1996; 142 (Pt 12) 3479-85.
13. Friedman LE, Messina MT, Santoferrara L, Santillán MA, Mangano A, Franco MA. Characterization of Bordetella bronchiseptica strains using phenotypic and genotypic markers. Vet Microbiol 2006; 117(2-4): 313-20.
14. Schouls LM, van der Heide HG, Vauterin L, Vauterin P, Mooi FR. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis of Dutch Bordetella pertussis strains reveals rapid genetic changes with clonal expansion during the late 1990s. J Bacteriol 2004; 186(16): 5496-505.
15. Seyed-Mohamadi S, Moradi Bidhendi S, Tadayon K, Ghaderi R. Genetic characterization of Bacillus anthracis 17 JB strain. Iran J Microbiol 2015; 7(3): 168-72.
16. Carver T, Harris SR, Berriman M, Parkhill J, McQuillan JA. Artemis: an integrated platform for visualization and analysis of high - throughput sequence - based experimental data. Bioinformatics 2012; 28 (4): 464-9. doi: 10.1093/ bioinformatics/btr703.
17. Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, et al. Primer3-new capabilities and interfaces. Nucleic Acids Res 2012; 40(15): e115.
18. Najafi Olya Z, Tadayon K, Ghaderi R. A simplified Van Erth Single Nucleotide Polymorphism (SNP) typing method of

Bacillus anthracis applicable by traditional thermocycler machines. Med Lab J 2015; 9(1): 97-103. [In Persian]
19. Sekhavati M, Tadayon K, Ghaderi R, Banihashemi R, Jabbari AR, Shokri G, et al. "In-house" production of DNA size marker from a vaccinal Bacillus anthracis strain. Iran J Microbiol 2015; 7(1): 45-9.
20. Stucky BJ. SeqTrace: a graphical tool for rapidly processing DNA sequencing chromatograms. J Biomol Tech 2012; 23(3): 90-3. doi: 10.7171/jbt.12-2303-004.
21. Li W, Cowley A[1], Uludag M[1], Gur T[1], McWilliam H[1], Squizzato S, et al. The EMBL-EBI bioinformatics web and programmatic tools framework. Nucleic Acids Res 2015; 43(W1): W580-4. doi: 10. 1093/nar/gkv279.
22. van Gent M, Heuvelman CJ, van der Heide HG, Hallander HO, Advani A, Guiso N, et al. Analysis of Bordetella pertussis clinical isolates circulating in European countries during the period 1998-2012. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2015; 34(4): 821-30. doi: 10.1007/s10096-014-2297-2.
23. Octavia S, Sintchenko V, Gilbert GL, Lawrence A, Keil AD, Hogg G, et al. Newly emerging clones of Bordetella pertussis carrying prn2 and ptxP3 alleles implicated in Australian pertussis epidemic in 2008-2010. J Infect Dis 2012; 205(8): 1220-4. doi: 10. 1093/infdis/jis178.
24. Schmidtke AJ, Boney KO, Martin SW, Skoff TH, Tondella ML, Tatti KM, et al. Population diversity among Bordetella pertussis isolates, United States, 1935-2009. Emerg Infect Dis 2012; 18(8): 1248-55. doi: 10.3201/eid1808.120082.
25. Litt DJ, Neal SE, Fry NK. Changes in genetic diversity of the Bordetella pertussis population in the United Kingdom between 1920 and 2006 reflect vaccination coverage and emergence of a single dominant clonal type. J Clin Microbiol 2009; 47(3): 680-8. doi: 10.1128/JCM.01838-08.
26. Miyaji Y, Otsuka N, Toyoizumi-Ajisaka H, Shibayama K, Kamachi K. Genetic analysis of Bordetella pertussis isolates from the 2008-2010 pertussis epidemic in Japan. PLoS One 2013; 8(10): e77165. doi: 10.1371/ journal.pone.0077165.
27. Cherry JD. The history of pertussis (whooping cough); 1906-2015: facts, myths, and misconceptions. Curr Epidemiol Rep 2015; 2(2): 120-30.
28. Edwards KM, Berbers GA. Immune responses to pertussis vaccines and disease. J Infect Dis 2014; 209 (Suppl 1): S10-5. doi: 10.1093/infdis/jit560.
29. Bahmanjeh A, Khaki P, Moradi Bidhendi S, Hosseinpour R, Noofeli M. A study on the genetic analysis of clinical isolates and vaccine strains of Bordetella pertussis by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) Archives of Razi Institute 2016; 71(4): 219-25. doi: 10.22034/ari.2016.107502.
30. Haghighi F, Shahcheraghi F, Abbasi E, Eshraghi SS, Zeraati H, Mousavi SA, et al. Genetic profile variation in vaccine strains and clinical isolates of Bordetella pertussis recovered from Iranian patients. Avicenna J Med Biotechnol 2014; 6(3): 178-84.
31. Bokhari H, Said F, Syed MA, Mughal A, Kazi YF, Kallonen T, et al. Molecular typing of Bordetella parapertussis isolates circulating in Pakistan. FEMS Immunol Med Microbiol 2011; 63(3): 373-80. doi: 10.1111/ j.1574-695X.2011.00861.x.
32. Sedaghat M, Nakhost Lotfi M, Talebi M, Saifi M, Pourshafie MR. Status of pertussis in Iran. Jundishapur J Microbiol 2014; 7(11): e12421. doi: 10.5812/jjm.12421.