ارزیابی بیان فیمبریه (Fim2 و Fim3) *Bordetella pertussis* در مراحل مختلف کشت به منظور تولید واکسن

طیبه لطیفی[۱]، مجتبی نوفلی[۲*]، لیلا جبل عاملی[۳]

۱-کارشناسی ارشد میکروبیولوژی.
۲-استادیار بخش واکسن های باکتریایی پزشکی.
۳-استادیار گروه میکروبیولوژی.

۱و۳-گروه میکروبیولوژی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران.
۲-موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی (AREEO)، کرج، ایران.

*نویسندهٔ مسؤول:
مجتبی نوفلی؛ موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی (AREEO)، کرج، ایران.
تلفن: ۰۰۹۸۹۱۹۸۳۸۶۷۱۸
Email: noofeli1234@yahoo.com

چکیده

زمینه و هدف: فیمبریه(Fim2 و Fim3) یکی از فاکتورهای حدت در *Bordetella pertussis* است و باعث اتصال باکتری به سلول‌های مژه دار دستگاه تنفس میزبان و تحریک پاسخ‌های ایمنی می‌شود. فیمبریه از ارکان اصلی واکسن‌های سلولی و بدون سلولی سیاه سرفه محسوب می‌شود. طبق پیشنهاد سازمان بهداشت جهانی (WHO) در واکسن‌های سلولی باید حضور فیمبریه (Fim2 و Fim3) تایید شده باشد. در این تحقیق برای بررسی و تایید حضور Fim2 و Fim3 در واکسن‌های سلولی، دو سویه‌ی واکسینال ۵۰۹ *B. pertussis* (دارای Fim2) و ۱۳۴ *B. pertussis* (دارای Fim3) مورد آزمایش قرار گرفتند. سپس میزان بیان Fim2 و Fim3 در مراحل مختلف کشت برای تولید واکسن در بیوراکتور مورد ارزیابی قرار گرفتند.

روش بررسی: برای تعیین و ارزیابی حضور فیمبریه ها از روش اسلاید آگلوتینوژن و ELISA غیر مستقیم استفاده شد و مقدار آن به صورت کمی محاسبه گردید. پس از تایید حضور فیمبریه ها دو سویه در محیط مایع B2 کشت داده شدند.

یافته‌ها: میزان بیان فیمبریه ها در فاز های مختلف رشد به دست آمد و بهترین زمان برای برداشت و توقف کشت تعیین گردید.

نتیجه‌گیری: طبق نتایج بیشترین میزان بیان Fim2 و Fim3 و بهترین زمان برای برداشت باکتری از فرمانتور فاز لگاریتمی باکتری است. با اینکه میزان بیان این دو فیمبریه در این فاز با یکدیگر متفاوت می باشد اما در نهایت بیشترین حضور فیمبریه در این فاز است.

واژه‌های کلیدی: سیاه سرفه، *Bordetella pertussis*، واکسن، ELISA، فیمبریه، Fim2 و Fim3.

دریافت مقاله: ۱۳۹۶/۱/۱۵ **دریافت مقالهٔ اصلاح‌شده: ۱۳۹۶/۴/۲۰** **اعلام قبولی: ۱۳۹۶/۴/۲۸**

مقدمه

بوردتلا پرتوزیس (*Bordetella pertussis*) یک باکتری گرم منفی و پاتوژن انسانی است که سبب ایجاد بیماری سیاه سرفه می‌شود. بیماری از طریق قطرات تنفسی فرد آلوده انتقال می یابد و هیچ مخزن محیطی تاکنون برای این بیماری شناخته نشده است(۱). دو نوع واکسن بر علیه بیماری سیاه سرفه وجود دارد: واکسن های سلولی (whole-cell) و واکسن‌های بدون سلول(acellular). واکسن های سلولی شامل سلول کشته شده‌ی *بوردتلا پرتوزیس* است و طبق توصیه ی سازمان بهداشت جهانی (WHO) همراه با توکسوئید دیفتری و کزاز عرضه می‌شود. از عوارض این واکسن می‌توان به برگشت پذیر بودن آن، واکنش‌های عصبی، تب و تشنج و واکنش‌های التهابی در محل تزریق اشاره کرد. خوشبختانه تاکنون گزارشی از مرگ و یا آسیب های مغزی از این واکسن گزارش نشده است. واکسن های بدون سلولی از خالص سازی و غیر فعال کردن فاکتورهای حدت *بوردتلا پرتوزیس* تولید می‌شوند. این واکسن شامل هماگلوتینین رشته‌ای (FHA)، فیمبریه (Fim2 و Fim3)، پرتاکتین (PRN) و پرتوزیس توکسین (PT) است(۲). در این نوع واکسن میزان واکنش‌های التهابی در محل تزریق به میزان قابل توجهی کمتر از واکسن‌های سلولی است ولی این میزان با دوزهای پی در پی افزایش میابد. این امر در واکسن های سلولی عکس واکسن‌های غیرسلولی است و با دوزهای پی در پی کاهش میابد. علائم دیگر مانند تب، تشنج و واکنش های عصبی نیز به مراتب کاهش پیدا کرده اند. اما عوارضی مانند گریه های طولانی به مدت سه ساعت، احساس خواب آلودگی و hyporesponsive episodes (شروع ناگهانی هیپوتونی، رنگ پریدگی و یا سیانوز که ظرف ۴۸ ساعت در کودکان پس از واکسیناسیون رخ می دهد) دیده می شود. ولی میزان عوارض خیلی کمتر از واکسن‌های سلولی است(۳). در سال های اخیر علی رغم واکسیناسیون گسترده میزان ابتلا به بیماری هنوز بالاست (۱). *بوردتلا پرتوزیس* دو نوع فیمبریه (Fim2 و Fim3) را به طور مجزا بیان می کند. وزن مولکولی Fim2 و Fim3 به ترتیب ۲۲,۵ و ۲۲ کیلودالتون می باشد. فیمبریه ایمونوژنسیته قوی دارد و باعث تحریک تولیدآنتی بادی می‌شود. سویه‌های *بوردتلا پرتوزیس* می‌توانند Fim2، Fim3 و یا هر دو را بیان کنند(۴). Fim2 و Fim3 می‌توانند واسطه اتصال به هپارین باشند (۵) و همینطور نقش مهمی در اتصال به سلول‌های دستگاه تنفس و تحریک پاسخ دستگاه ایمنی در دو نوع واکسن سولی و بدون سلول دارند (۴ و ۵) و بر همین اساس باید در هر دو نوع واکسن سلولی و بدون سلول وجود داشته باشد (۷). سازمان بهداشت جهانی(WHO) برای ارزیابی و تایید حضور فیمبریه در واکسن‌های سیاه سرفه دو روش اسلاید آگلوتیناسیون و الایزا (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) را پیشنهاد داده است.

در این تحقیق ابتدا با استفاده از روش اسلاید آگلوتیناسیون حضور فیمبریه(Fim2 و Fim3) در دو سویه ی ۵۰۹ و ۱۳۴ تایید گردید و سپس میزان کمی بیان Fim2 و Fim3 در طول کشت با استفاده از روش الایزای غیرمستقیم و طبق دستورالعمل WHO به دست آمد. سپس برای به دست آوردن منحنی رشد دو سویه و تعیین بهترین زمان برای برداشت باکتری از فرمانتور براساس بیان فیمبریه و توقف واکنش در محیط B2 کشت داده شدند.

روش بررسی

نوع مطالعه در این مقاله تحقیقاتی پژوهشی به منظور تولید واکسن سیاه سرفه بدون سلول یا آسلولار می‌باشد. سویه های استفاده شده در این تحقیق سویه‌های واکسینال *B. pertussis* 509 ، *B. Pertussis* ۱۳۴ و *B. pertussis* Tohama I موجود در سرم سازی رازی

است. سویه ی ۵۰۹ دارای Fim2 ، سویه‌ی ۱۳۴ دارای Fim3 و سویه‌ی Tohama I دارای Fim2 و Fim3 است و به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. باکتری‌های مذکور در طول آزمایش در محیط کشت بوردت جنگو (BG) آگار در ^{o}C ۳۷ به صورت سطحی و ایزوله خطی کشت داده شدند. پس از ۷۲-۴۸ ساعت و رشد باکتری‌ها همولیز کلنی‌ها بررسی شد و پلیت ها توسط فسفات بافر سالین (PBS) شسته شدند. محلول به دست آمده به مدت ۱۵ دقیقه در $3000 \times g$ سانتریفیوژ شد. پس از سانتریوفوژ مقداری PBS به رسوب اضافه شد و جذب نوری آن در 590 nm به ۰/۶۲۵ رسانده شد و سوسپانسیون سلولی به دست آمد. تعداد باکتری‌ها در این جذب نوری یک میلیون است. در موسسه واکسن و سرم سازی رازی نیز از این جذب نوری برای تولید واکسن سیاه سرفه استفاده می شود. برای اطمینان از این مقدار کلنی کانت انجام شد.

تست اسلاید آگلوتیناسیون. برای این تست از آنتی بادی مونوکلونال برای آنتی ژن فیمبریه ۲ *بوردتلا پرتوزیس* با کد 06/124 در NIBSC و آنتی بادی مونوکلونال برای آنتی ژن فیمبریه ۳ *بوردتلا پرتوزیس* کد 06/128 در NIBSC استفاده شد. ۲۰ µl از سوسپانسیون سلولی و ۲۰ µl از آنتی بادی‌ها بر روی پلیت با زمینه سیاه رنگ ریخته و مخلوط شدند و پس از سه دقیقه نتایج بررسی شد.

تست الایزا. از این تست به دو منظور استفاده گردد. یکی برای به دست آوردن بهترین رقت آنتی بادی مونوکلونال Fim2 و Fim3 و دیگری اینکه پس از به دست آوردن این رقت ها نمونه هایی که از محیط کشت B2 به دست آمدند با این رقت ها آزمایش شدند که هر دو آزمایش به صورت زیر انجام شد. پلیت های الایزا با 100 µl از سوسپانسیون سلولی کوت شدند و به مدت یک شبانه روزدر ^{o}C ۳۷ بدون پوشاندن روی آنها انکوبه شدند. روز بعد پلیت‌ها سه مرتبه با محلول شستشو PBST (PBS+0.5% Tween 80) شسته شدند و **با** 125 µl 1% BSA بلاک شدند. روی پلیت‌ها پوشانده شد و به مدت یک ساعت در^{o}C ۳۷ انکوبه شدند. سپس پلیت ها سه مرتبه **با** PBST شسته شدند. رقت‌های مختلفی از آنتی بادی های مونوکلونال با رقیق کننده (PBS+1% Tween 80) آماده شدند و 100 µl از آنها در هر چاهک ریخته شد. روی پلیت ها پوشانده شد و به مدت یک ساعت در ^{o}C ۳۷ انکوبه شدند. سپس پلیت ها سه مرتبه با PBST شسته شدند. آنتی بادی ضد موشی متصل به HRP با رقیق کننده (PBST+0.5% skimmed milk) رقیق شد و 100 µl از آنها به چاهک ها اضافه شد و روی پلیت ها پوشانده شد و به مدت یک ساعت در ^{o}C ۳۷ انکوبه شدند. سپس پلیت ها سه مرتبه با PBST شسته شدند. برای سوبسترا TMBDMSO ۱ ml و ۲ µl پروکسیداز ۳۰% به ۹ ml سیترات فسفات بافر pH5 اضافه شدند و پلیت ها ده دقیقه در دمای اتاق انکوبه شدند. سپس با ریختن 100 µl اسید سولفوریک 2 M واکنش متوقف شد و دانسیته نوری چاهک ها با کمک الایزا ریدر در طول موج ۴۵۰ نانومتر قرائت شد. برای اطمینان از درست بود روش کار این تست بر روی سویه Tohama I نیز انجام شد.

محیط کشت B2. از هر دو سویه (۵۰۹ و ۱۳۴) در محیط BG به صورت ایزوله ی خطی کشت داده شدند و پلیت ها در ^{o}C ۳۷ به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور قرار داده شدند. پس از رشد چند کلنی از روی پلیت برداشته شدند و در دو میلی لیتر از محیط B2 حل شدند. سپس سوسپانسیون به ۱۵۰ میلی لیتر محیط B2 اضافه گردید. OD اولیه در جذب نوری ۵۹۰ نانومتر اندازه گیری شد. OD اولیه ۰/۰۵ بود. سپس در دور 200 rpm و دمای ^{o}C ۳۵ در شیک انکوباتور قرار داده شدند. به منظور ایجاد شرایطی مشابه تولید واکسن، در فرمانتور ۷ لیتر محیط B2

جدید داخل فرمانتور ریخته شد و محیط قبلی که رشد کرده بود به آن اضافه شد. پس از رشد ۳۵۰ لیتر محیط B2 به قبلی اضافه گردید. تمامی شرایط رشد در این جا مانند نمونه اول یعنی ۱۵۰ میلی لیتر بود. سپس نمونه گیری آغاز گردید. بدین صورت که در شرایط استریل هر ۵ ساعت ۲ میلی‌لیتر از محیط برداشته و جذب نوری آن اندازه گیری می‌شد. با این روش منحنی رشد دو سویه به دست آمد. طبق این منحنی رشد ۵ نمونه در سه مرحله شامل مرحله تاخیری، لگاریتمی و ثابت انتخاب شدند و برای کوت شدن و انجام تست الایزا برای بررسی بیان فیمبریه آماده شدند.

یافته ها

تست اسلاید آگلوتیناسیون. جدول ۱ و ۲ بهترین نتایج در رقت های مختلف برای دو سویه ی ۵۰۹ و ۱۳۴ را نشان می دهد. طبق این جداول حضور Fim2 در سویه ی ۵۰۹ و Fim3 در سویه ی ۱۳۴ تایید گردید.

تست الایزا. پس از تهیه ی رقت‌های مختلف که در بالا توضیح داده شد بهترین رقت آنتی‌بادی مونوکلونال برای مقایسه‌ی Fim2 در مراحل مختلف کشت ۱/۱۶۰۰ و بهترین رقت آنتی بادی مونوکلونال برای مقایسه ی Fim3 در مراحل مختلف کشت ۱/۲۰۰ به دست آمد. برای اطمینان از درستی مراحل و انتخاب رقت‌ها از سویه ی Tohama I استفاده شد. در این سویه میزان بیان Fim2 نسبت به Fim3 دو برابراست (۷) که نتایج ما نیز این مسئله را تایید کرد.

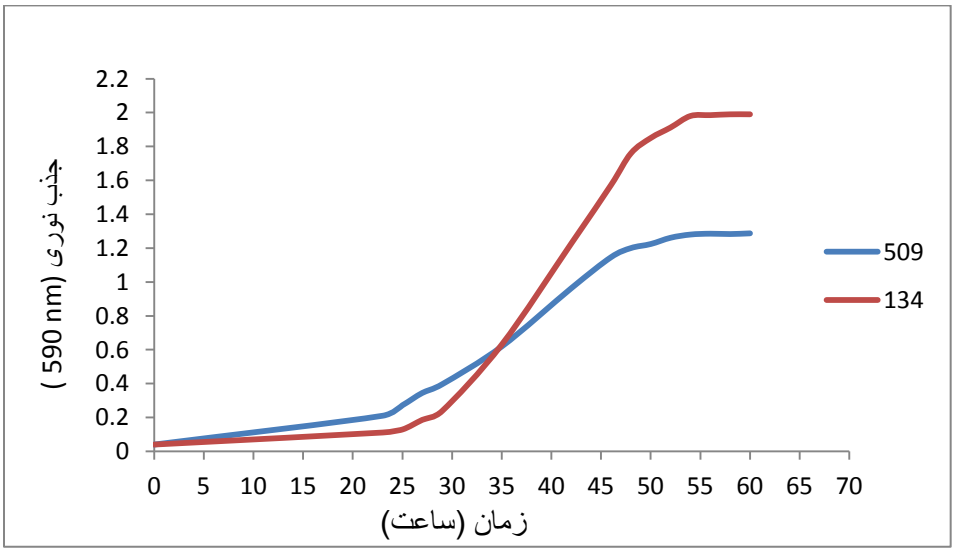
منحنی رشد و بیان فیمبریه. نمودار ۱ منحنی رشد دو سویه ۵۰۹ و ۱۳۴ را نشان می‌دهد. رشد دو سویه ۵۵ ساعت طول می کشد و رشد سویه ۱۳۴ سریع تر از سویه ی ۵۰۹ است. نمودار ۲ و ۳ طبق نمودار ۱ یعنی منحنی رشد تنظیم شده اند. نمودار ۲ میزان حضور و بیان Fim2 در مراحل مختلف کشت در رقت ۱/۱۶۰۰ را نشان می هد. میزان بیان Fim2 در ابتدای فاز رشد پایین است سپس افزایش می یابد. این میزان تا ورود باکتری به فاز رکود تقریبا ثابت می ماند. نمودار ۳ میزان حضور و بیان Fim3 در مراحل مختلف کشت در رقت ۱/۲۰۰ را نشان می دهد. میزان بیان Fim3 در ابتدای فاز رشد پایین است سپس افزایش می یابد و به بالاترین میزان می رسد. سپس کاهش می یابد. نمودار ۴ و ۵ نیز بر طبق منحنی رشد در فاز لگاریتمی تنظیم شده اند. این دو نمودار میزان حضور و بیان Fim2 و Fim3 در ساعت‌های مختلف رشد در فاز لگاریتمی را نشان می دهند.

جدول۱: نتایج تست اسلاید آگلوتیناسیون برای سویه ی *B. Pertussis* 509

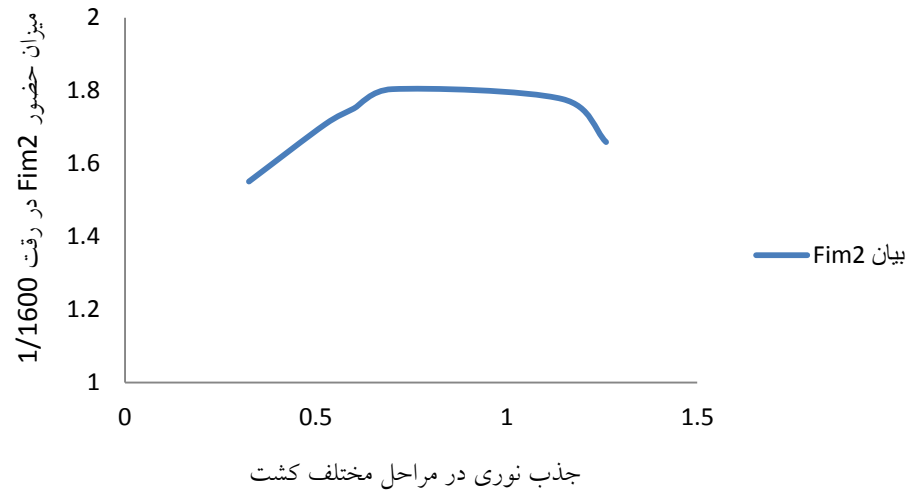
آنتی فیمبریه۳ مونوکلونال	آنتی فیمبریه۲ مونوکلونال	رقت 1/10 برای آنتی فیمبریه
–	+++	شدت آگلوتیناسیون
۳ دقیقه	۳ دقیقه	زمان ایجاد آگلوتیناسیون

جدول۲: نتایج تست اسلاید آگلوتیناسیون برای سویه ی *B. Pertussis* 134

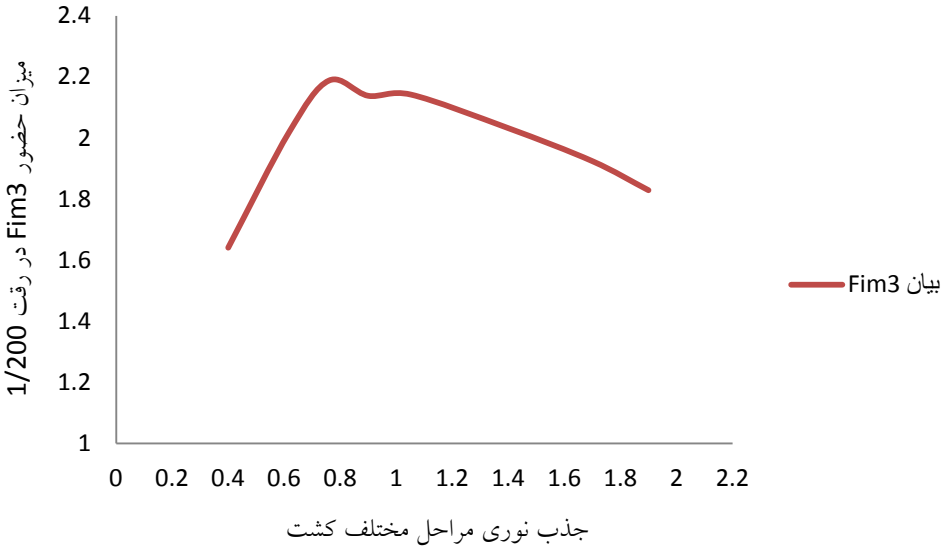
آنتی فیمبریه۳ مونوکلونال	آنتی فیمبریه۲ مونوکلونال	رقت 1/4000 برای آنتی فیمبریه
+++	–	شدت آگلوتیناسیون
3 دقیقه	۳ دقیقه	زمان ایجاد آگلوتیناسیون



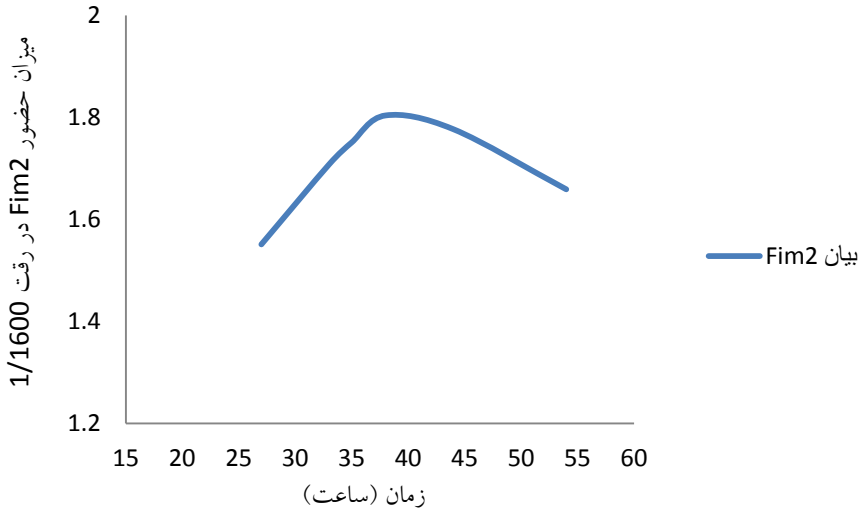
نمودار۱: نمودار منحنی رشد دو سویه ۵۰۹ و ۱۳۴ *بوردتلا پرتوزیس* در محیط کشت B2



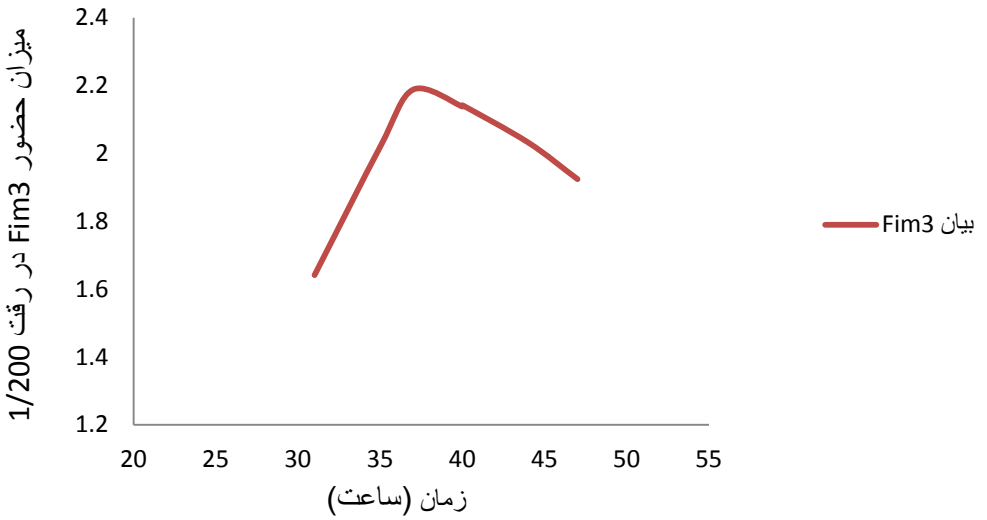
نمودار۲: میزان حضور Fim2 در مراحل مختلف کشت در رقت 1/1600 . این محور با توجه به منحنی رشد رسم شده است. محور x نشان دهنده میزان جذب نوری در فاز لگاریتمی و محور y میزان بیان Fim2 را در این جذب نوری را نشان می دهد.



نمودار۳: میزان حضور Fim3 در مراحل مختلف کشت در رقت 1/200 . این محور با توجه به منحنی رشد رسم شده است. محور x نشان دهنده میزان جذب نوری در فاز لگاریتمی و محور y میزان بیان Fim3 را در این جذب نوری را نشان می دهد.



نمودار۴: میزان حضور Fim2 در مراحل مختلف کشت در رقت 1/1600 در ساعت های مختلف در فاز لگاریتمی. نمودار نشان دهنده ی بیشترین میزان بیان Fim2 در فاز لگاریتمی است. این نمودار بر طبق منحنی رشد رسم شده است. محور x نشان دهنده ی زمان شروع فاز لگاریتمی تا ورود به مرحله ی فاز ثابت و و محور y میزان بیان Fim2 را در این جذب نوری را نشان می دهد.



نمودار ۵ : میزان حضور Fim3 در مراحل مختلف کشت در رقت ۱/۲۰۰ در ساعت های مختلف در فاز لگاریتمی. نمودار نشان دهنده ی بیشترین میزان بیان Fim3 در فاز لگاریتمی است. این نمودار بر طبق منحنی رشد رسم شده است. محور x نشان دهنده ی زمان شروع فاز لگاریتمی تا ورود به مرحله ی فاز ثابت و و محور y میزان بیان Fim3 را در این جذب نوری را نشان می دهد.

نتیجه گیری

سیاه سرفه بیماری عفونی حاد و بسیار مسری دستگاه تنفس فوقانی است. عامل اصلی این بیماری *بوردتلا پرتوزیس* است. این بیماری انسان را درگیر می‌کند و از طریق قطرات آلوده‌ی سرفه‌ی و عطسه انتقال میابد. بیماری همه‌ی گروه های سنی را در برمی گیرد و برای کودکان زیر یک سال سخت و حتی مرگ بار می‌باشد. تنها راه پیشگیری از بیماری واکسیناسیون است. فیمبریه در *بوردتلا پرتوزیس* یکی از ادهسین های بیان شده در سطح باکتری است که نقش مهمی در اتصال باکتری به سلول‌های اپتلیال دستگاه تنفسی ایفا می‌کند و باعث سرکوب التهاب و در نتیجه تکثیر طولانی مدت باکتری می‌شود(۳ و۴). فیمبریه‌ی *بوردتلا پرتوزیس* به دلیل تحریک سیستم ایمنی از اجزای اصلی واکسن بدون سلولی است و حضور آن در این نوع واکسن باید تایید شده باشد.

در سال ۲۰۱۲ الکساندر و همکارانش پاسخ آنتی بادی به Fim2 وFim3 را پس از واکسیناسیون با واکسن‌های سلولی و بدون سلول بررسی کردند. نتایج آنها نشان داد که Fim2 نسبت به Fim3 سیستم ایمنی را بیشتر تحریک می‌کند (۸). در سال ۲۰۰۸ هیکینین و همکارانش بر روی ایزوله های *بوردتلا پرتوزیس* در فنلاند بر روی سروتایپ و بیان فیمبریه مطالعه کردند .نتایج آنها نشان داد علیرغم واکسیناسیون گسترده در فنلاند سویه‌های دارای Fim2 در *بوردتلا پرتوزیس* سروتایپ غالب است (۲). همینطور سویه‌های دارای Fim2 می‌توانند در طول عفونت Fim3 را نیز بیان کنند.

ژو و همکارانش در سال ۲۰۰۹ به بررسی تولید و تعیین ویژگی‌های پرتاکتین، Fim2 و Fim3 در *بوردتلا پرتوزیس* پرداختند. آنها این سه پروتئین را در مقادیر زیاد تولید کردند. این سه پروتئین باعث بروز پاسخ ایمنی سلولار و هومورال در موش شدند پس این پروتوئین ها دارای خواص ایمونوژنیک بوده و پتانسیل خوبی برای تولید نسل جدیدی از واکسن های سیاه سرفه را دارند (۹). در تحقیقی در سال ۲۰۱۴ به مطالعه ی ژنوم *بوردتلا پرتوزیس* پرداخته شد. نتایج توالی یابی سروتایپ های متعدد نشان داد که فیمبریه *بوردتلا پرتوزیس* در عفونت زایی نقش دارد و بیان می شود (۷).

بیان ژن *fim* توسط BvgA/S و در طول تغییر فاز و در طول مرحله ی لگاریتمی رخ می دهد. تغییر فاز پدیده ای است که باعث روشن یا خاموش شدن فاکتورهایی مانند فیمبریه، فلاژل، پروتئین‌های سطحی غشای خارجی و لیپوپلی ساکارید در باکتری‌های گرم منفی می‌شود. پروموتورهای *fim2* و *fim3* هرکدام دارای قطعه ی توالی نوکلئوتیدی سیتوزین(C) هستند که با ناحیه‌ی 35- همپوشانی دارد و BvgA~P زمانی فعال می‌شود که این رشته در طولی مجاز باشد. اگر طول توالی C فیمبریه *بوردتلا پرتوزیس* خیلی کوتاه یا بلند باشد RNA پلیمراز در فاصله‌ی اشتباهی از ناحیه‌ی آغازین اتصال پروموتور BvgA~P قرار می گرد در نتیجه رونویسی از فیمبریه انجام نمی شود. از آنجایی که این رشته به صورت مستقل عمل می کند سلول ها می توانند هر ترکیبی از پروتئین های *fim* را در سطح خود بیان کنند که همین امر باعث تنوع فنوتیپی در داخل یک جمعیت می‌شود. بنابراین سکانس *bvg*، دمای محیط و طول پروموتور توالی C فعالیت Fim را تعیین می کنند. دمای ^{o}C ۳۷ و نبود مدوله کننده ها نیز به بیان Fim کمک می کنند (10 و 11).

براساس نتایج به دست آمده در این تحقیق میزان بیان Fim (Fim2 در سویه‌ی ۵۰۹ و Fim3 در سویه‌ی۱۳۴) در مرحله ی تاخیری و پیش از آنکه وارد فاز لگاریتمی شوند پایین است. با ورود باکتری به مرحله ی تصاعدی یا فاز لگاریتمی میزان بیان افزایش پیدا کرده است.

در سویه‌ی ۵۰۹ طبق نمودار ۱ پس از گذشت ۲۰ تا ۲۷ ساعت باکتری وارد فاز لگاریتمی می شود. در این زمان

طبق نمودار ۲ و ۴ میزان بیان فیمبریه پایین است. بیشترین میزان بیان فیمبریه درحدود OD ۰/۷ است. در این OD باکتری تقریبا در اواسط فاز لگاریتمی قرار دارد. سپس تا ورود باکتری به فاز رکود میزان بیان تقریبا تابت است. پس از ورود باکتری به مرحله ی رکود از میزان بیان کاسته می-شود.

در سویه ی ۱۳۴ طبق نمودار ۱ باکتری پس از ۲۳ تا ۲۷ ساعت وارد فاز لگاریتمی می‌شود. طبق نمودار ۳ میزان بیان Fim3 در حدود OD ۰/۷ به بیشترین میزان رسیده است. پس از آن میزان بیان شیب کاهشی را در پیش گرفته و تا پایان مرحله‌ی لگاریتمی میزان بیان همچنان رو به کاهش است.

بر اساس نتایج این تحقیق از نظر بیان فیمبریه بهترین زمان برای برداشت دو سویه ی ۵۰۹ و ۱۳۴ از فرمانتور بدین صورت است که: بهترین زمان برای باکتری *بوردتلا پرتوزیس* سویه ی ۵۰۹ از فرمانتور اواسط مرحله لگاریتمی یعنی ۳۴ تا ۴۲ ساعت پس از رشد تا ورود باکتری به فاز رکود ۴۶ تا ۵۰ ساعت پس از رشد باشد. بهترین زمان برداشت فیمبریه باکتری *بوردتلا پرتوزیس* سویه ی ۱۳۴ از فرمانتور ۳۳ تا ۴۸ ساعت پس از رشد باشد. همینطور بهتر است که در مراحل مختلف تولید، کنترل کمی فیمبریه ها با روش الایزا بررسی شود.

قدردانی

از همه‌ی کارکنان بخش DTP موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی که در این تحقیق نهایت همکاری را به عمل آوردند کمال تشکر و قدردانی را داریم.

منابع

1-Miller E, Vurdien JE, White JM. The epidemiology of pertussis in England and Wales. Communicable Disease Report Review. 1992; 2(13).
2-Heikkinen E, Xing K, Ölander R, Hytönen J, Viljanen M, Mertsola J, Hecorresponding Q. *Bordetella pertussis* isolates in Finland: Serotype and fimbrial expression. BMC Microbiol. 2008; 8(162).
3-Cherry J, et al. A search for serologic correlates of immunity to *Bordetella pertussis* cough illnesses. Vaccine. 1998; 16(20) 1901-6.
4-Ashworth L, et al. Agglutinogens and fimbriae of *Bordetella pertussis.* Tokai J Exp Clin Med. 1988; 13.
5-Robinson A, Irons L, Ashworth L. Pertussis vaccine: present status and future prospects. *Vaccine* 1985; 3(1) 11-22.
6-Geuijen CA, et al. Identification and Characterization of Heparin Binding Regions of the Fim2 Subunit of *Bordetella pertussis*. Infect Immun. 1998; 66(5) 2256–2263.
7-Gorringe AR, Vaughan TE, *Bordetella pertussis* fimbriae (Fim): relevance for vaccines. Expert Rev Vaccines. 2014; 13(10) 1205–1214.
8-Alexander F, Matheson M, Fry N, Labram B, Gorring A. Antibody Response to Individual *Bordetella pertussis* Fimbrial Antigen Fim2 or Fim3 following Immunization with the Five- Component Acellular Pertussis Vaccine or to Pertussis Disease. Clin Vaccine Immunol. 2012; 19(11) 1776–1783.
9-Xu Y, Wang Y, Tan Y, Zhang H, Wu L, Wang L, Zhang S. Production and characterization of recombinant pertactin, fimbriae 2 and fimbriae 3 from *Bordetella pertussis.* BMC Microbiology, 2009 9(274).
10-Chen Q, et al , Novel architectural features of *Bordetella pertussis* fimbrial subunit promoters and their activation by the global virulence regulator BvgA. Mol Microbiol. 2010; 77(5) 1326-40.
11-Fazekas A, Steeves R, Newmaster S. Improving sequencing quality from PCR products containing long mononucleotide repeats. Biotechniques. 2010; 48(4) 277-85.

Bordetella Pertussis Fimbriae (Fim2 and Fim3) Expression Evaluation in Different Stages of Cultivation to Produce Vaccine

Tayebe Latifi[1], Mojtaba Noofeli[2*], Leila Jabalameli[3]

1- MSc in Microbiology.
2-Assistant Professor of Bacterial Medicine Vaccines
3-Assistant Professor of Microbiology.

1,3-Department of Microbiology, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran.
2-Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research and Development Research Organization (AREEO), Karaj, Iran.

**Corresponding author: Mojtaba Noofli; Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research and Development Research Organization (AREEO), Karaj, Iran.*
Tel: +989198386718
Email: noofeli1234@yahoo.com

Abstract

Background and Objective: Fimbriae (Fim2 and Fim3) is one of the most important virulence factors in *Bordetella pertussis* and it causes the adhesion of bacteria to the upper respiratory tract cells and that enhances immune response. The level of antibody production against fimbriae is directly related to the level of protection. Fimbriae is one of the main components in both whole-cell and acellular pertussis vaccines. According to WHO standard, in the whole-cell vaccine, presence of fimbriae must be confirmed by two techniques including ELISA and slide agglutination.

Subjects and Methods: In this research, two strains of *B. pertussis* 509 (with Fim2) and 134 (with Fim3) were tested by culturing in B2 and presentation of fimbriae was assessed at different stages of cultivation. In this study indirect ELISA and slide agglutination assays were used to determine and evaluate the presence and quantity of the fimbriae during cultivation period. After confirming the presence of the fimbriae, two strains (134 and 509) were cultured in B2 medium.

Results: According to the fimbriae expression, the best time for stopping and harvesting the cultivation were determined.

Conclusion: The results have shown that the high level of Fim2 and Fim3 expression and the best time for harvesting and stopping the culture is in the log phase. Although, the level of expression in two strains were dissimilar in this phase, but eventually the most expression level is in the log phase.

Keywords: *Bordetella pertussis*, vaccine, ELISA, fimbriae, Fim2, Fim3.

►*Please cite this paper as:*

Latifi T, Noofeli M, Jabalameli L. Bordetella Pertussis Fimbriae (Fim2 and Fim3) Expression Evaluation in Different Stages of Cultivation to Produce Vaccine. Jundishapur Sci Med J 2017; 16(3):345-354.

Received: Apr 4, 2017 **Revised: July 11, 2017** **Accepted: July 19, 2017**