

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

طیبه لطیفی^۱، مجتبی نوفلی^{۲*}، لیلا جبل عاملی^۳

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 *B. pertussis* ۵۰۹ (دارای Fim2) و *B. pertussis* ۱۳۴ (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 فیمبریه‌ها از روش اسلاید آگلوتینوژن و ELISA غیر مستقیم استفاده شد و مقدار آن به صورت کمی محاسبه گردید. پس از تایید حضور فیمبریه‌ها دو سویه در محیط مایع B2 کشت داده شدند. یافته‌ها: میزان بیان فیمبریه‌ها در فازهای 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 می‌باشد اما در نهایت بیشترین حضور فیمبریه در این فاز است.

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

۱-کارشناسی ارشد میکروبیولوژی.

۲-استادیار بخش واکسن‌های باکتریایی پزشکی.

۳-استادیار گروه میکروبیولوژی.

۱-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.

*نویسنده مسئول:

مجتبی نوفلی؛ موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی (AREEO)، کرج، ایران.

تلفن: ۰۰۹۸۹۱۹۸۳۸۶۷۱۸

Email: noofeli1234@yahoo.com

اعلام قبولی: ۱۳۹۶/۴/۲۸

دریافت مقاله اصلاح شده: ۱۳۹۶/۴/۲۰

دریافت مقاله: ۱۳۹۶/۱/۱۵

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 می‌یابد 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 واکسن های بدون سلول (acellular). واکسن های سلولی شامل سلول کشته شده ی بوردتلا پرتوزیس است و طبق توصیه ی سازمان بهداشت جهانی (WHO) همراه با توکسوئید دیفتتری و کزاز عرضه می‌شود. از عوارض این واکسن می‌توان به برگشت پذیر بودن آن، واکنش های عصبی، تب و تشنج و واکنش های 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 همآگلوتینین رشته‌ای (FHA)، فیمبریه (Fim2 و Fim3)، پرتاکتین (PRN) و پرتوزیس توکسین (PT) است (۲). در این نوع واکسن میزان واکنش های التهابی در محل تزریق به میزان قابل توجهی کمتر از واکسن های سلولی است ولی این میزان با دوزهای پی در پی افزایش می‌یابد. این امر در واکسن های سلولی عکس واکسن های غیرسلولی است و با دوزهای پی در پی کاهش می‌یابد. 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 می‌دهد) دیده می‌شود. ولی میزان عوارض خیلی کمتر از واکسن های 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 می‌کند. وزن مولکولی Fim2 و Fim3 به ترتیب ۲۲،۵ و ۲۲ کیلودالتون می‌باشد. فیمبریه ایمونوژنسیته قوی دارد و باعث تحریک تولیدآنتی بادی می‌شود. سویه های 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 سلول های 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 واکسن های 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 سویه های واکسینال *B. pertussis* 509، *B. pertussis* ۱۳۴ و *B. pertussis* Tohama I موجود در سرم سازی رازی

روز بعد پلیت‌ها سه مرتبه با محلول شستشو PBST (PBS+0.5% Tween 80) شسته شدند و با 125 μl BSA 1% بلاک شدند. روی پلیت‌ها پوشانده شد و به مدت یک ساعت در 37°C انکوبه شدند. سپس پلیت‌ها سه مرتبه با PBST شسته شدند. رقت‌های مختلفی از آنتی بادی‌های مونوکلونال با رقیق کننده (PBS+1% Tween 80) آماده شدند و 100 μl از آنها در هر چاهک ریخته شد. روی پلیت‌ها پوشانده شد و به مدت یک ساعت در 37°C انکوبه شدند. سپس پلیت‌ها 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 چاهک‌ها اضافه شد و روی پلیت‌ها پوشانده شد و به مدت یک ساعت در 37°C انکوبه شدند. سپس پلیت‌ها سه مرتبه با PBST شسته شدند. برای سویسترا 1 ml TMBDMSO و 2 μl پروکسیداز 30% به 9 ml سیترات فسفات بافر pH5 اضافه شدند و پلیت‌ها ده دقیقه در دمای اتاق انکوبه شدند. سپس با ریختن 100 μl اسید سولفوریک 2 M واکنش متوقف شد و دانسیته نوری چاهک‌ها با کمک الایزا ریدر در طول موج 450 نانومتر قرائت شد. برای اطمینان از درست بودن روش کار این تست بر روی سویه Tohama I نیز انجام شد.

محیط کشت B2. از هر دو سویه (509 و 134) در محیط BG به صورت ایزوله ی خطی کشت داده شدند و پلیت‌ها در 37°C به مدت 48 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 150 میلی لیتر محیط B2 اضافه گردید. OD اولیه در جذب نوری 590 نانومتر اندازه گیری شد. OD اولیه 0/05 بود. سپس در دور 200 rpm و دمای 35°C در شیک انکوباتور قرار داده شدند. به منظور ایجاد شرایطی مشابه تولید واکسن، در فرمانتور 7 لیتر محیط B2

است. سویه ی 509 دارای Fim2 ، سویه ی 134 دارای Fim3 و سویه ی 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 37°C به صورت سطحی و ایزوله خطی کشت داده شدند. پس از 24-48 ساعت و رشد باکتری‌ها همولیز کلنی‌ها بررسی شد و پلیت‌ها توسط فسفات بافر سالین (PBS) شسته شدند. محلول به دست آمده به مدت 15 دقیقه در 3000 X g سانتریفیوژ شد. پس از سانتریفوژ مقداری PBS به رسوب اضافه شد و جذب نوری آن در 590 nm به 0/625 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 2 بوردتلا پرتوزیس با کد 06/124 در NIBSC و آنتی بادی مونوکلونال برای آنتی ژن فیمبریه 3 بوردتلا پرتوزیس کد 06/128 در NIBSC استفاده شد. 20 μl از سوسپانسیون سلولی و 20 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 رقت‌ها نمونه هایی که از محیط کشت B2 به دست آمدند با این رقت‌ها آزمایش شدند که هر دو آزمایش به صورت زیر انجام شد. پلیت‌های الایزا با 100 μl از سوسپانسیون سلولی کوت شدند و به مدت یک شبانه روز در 37°C بدون پوشاندن روی آنها انکوبه شدند.

از درستی مراحل و انتخاب رقت‌ها از سویه ی Tohama I استفاده شد. در این سویه میزان بیان *Fim2* نسبت به *Fim3* دو برابر است (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 می‌کشد 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 می‌دهد. میزان بیان *Fim2* در ابتدای فاز رشد پایین است سپس افزایش می‌یابد. این میزان تا ورود باکتری به فاز رکود تقریباً ثابت می‌ماند. نمودار ۳ میزان حضور و بیان *Fim3* در مراحل مختلف کشت در رقت ۱/۲۰۰ را نشان می‌دهد. میزان بیان *Fim3* در ابتدای فاز رشد پایین است سپس افزایش می‌یابد و به بالاترین میزان می‌رسد. سپس کاهش می‌یابد. 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 ساعات‌های مختلف رشد در فاز لگاریتمی را نشان می‌دهند.

جدید داخل فرماتور 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 الیزا برای بررسی بیان فیمبریه آماده شدند.

یافته ها

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

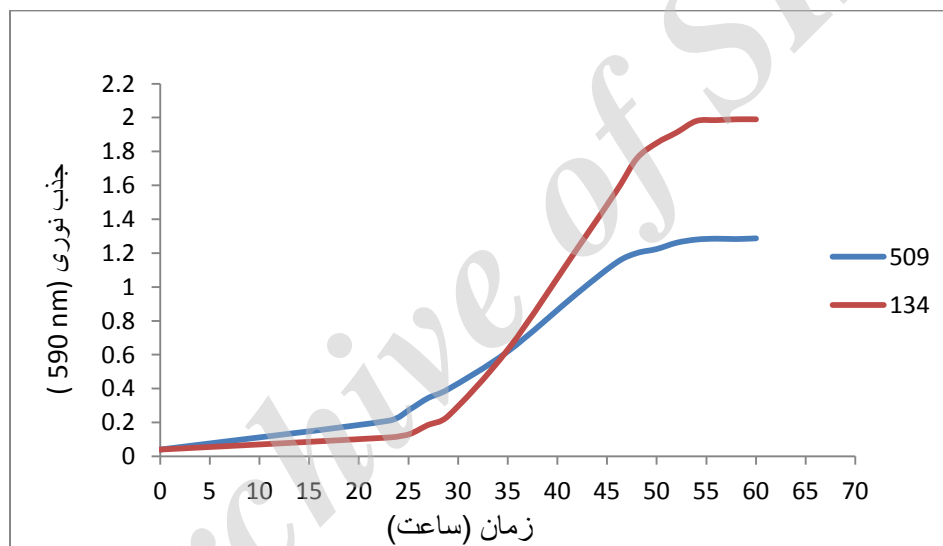
تست الیزا. پس از تهیه ی رقت‌های مختلف که در بالا توضیح داده شد بهترین رقت آنتی‌بادی مونوکلونال برای مقایسه ی *Fim2* در مراحل مختلف کشت ۱/۱۶۰۰ و بهترین رقت آنتی‌بادی مونوکلونال برای مقایسه ی *Fim3* در مراحل مختلف کشت ۱/۲۰۰ به دست آمد. برای اطمینان

جدول ۱: نتایج تست اسلاید آگلوتیناسیون برای سویه ی *B. Pertussis* 509

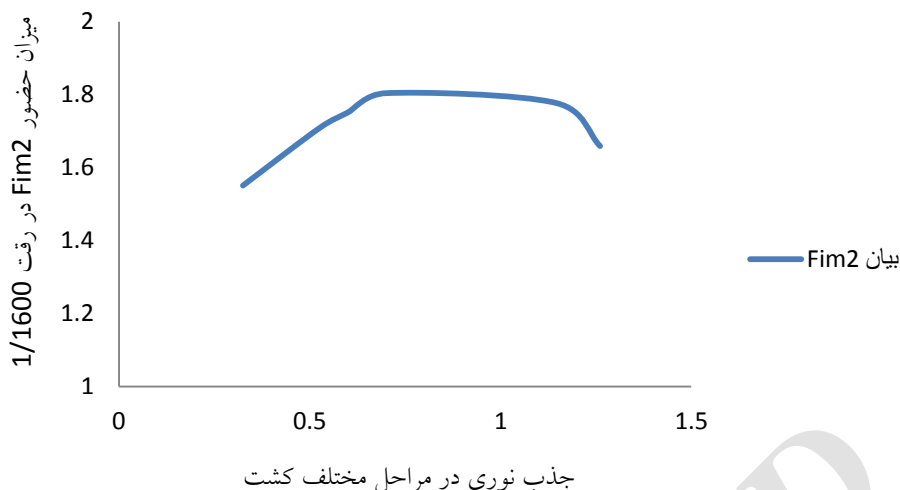
رقت 1/10 برای آنتی فیمبریه	آنتی فیمبریه ۲ مونوکلونال	آنتی فیمبریه ۳ مونوکلونال
شدت آگلوتیناسیون	+++	-
زمان ایجاد آگلوتیناسیون	۳ دقیقه	۳ دقیقه

جدول ۲: نتایج تست اسلاید آگلوتیناسیون برای سویه ی *B. Pertussis* 134

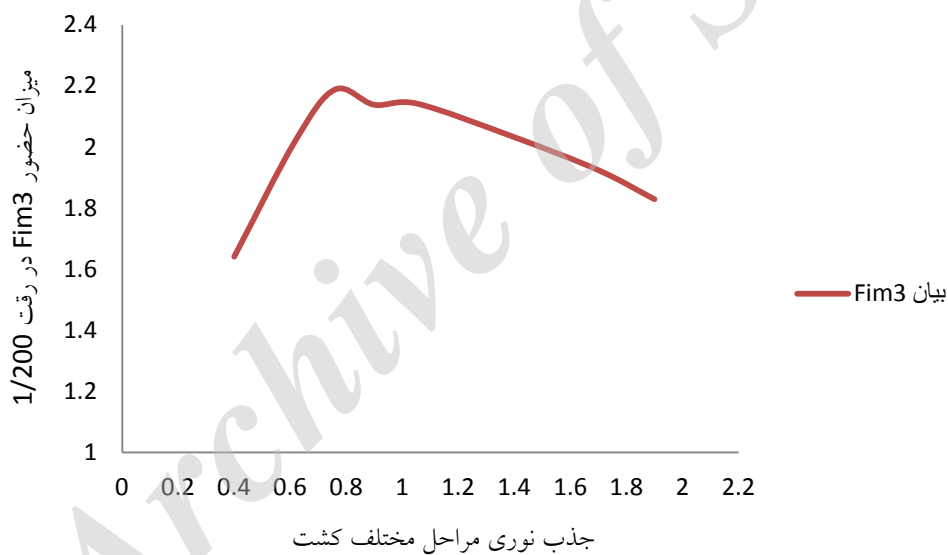
رقت 1/4000 برای آنتی فیمبریه	آنتی فیمبریه ۲ مونوکلونال	آنتی فیمبریه ۳ مونوکلونال
شدت آگلوتیناسیون	-	+++
زمان ایجاد آگلوتیناسیون	۳ دقیقه	3 دقیقه



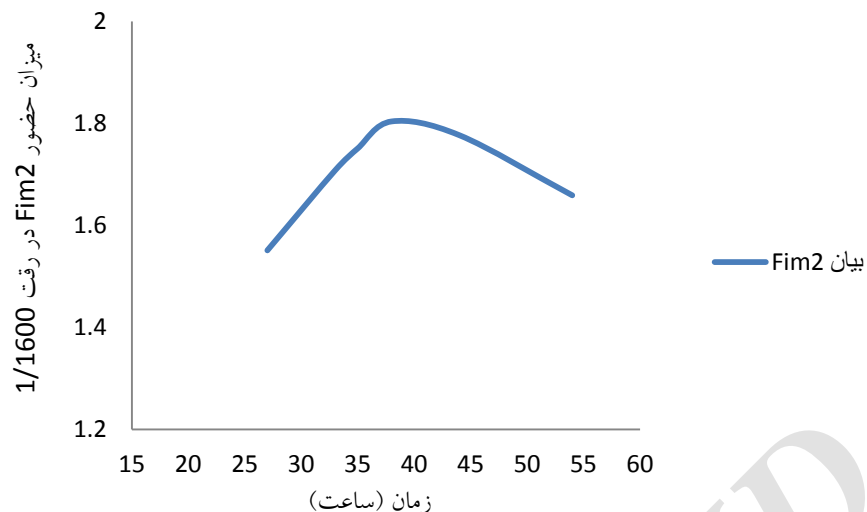
نمودار ۱: نمودار منحنی رشد دو سویه ۵۰۹ و ۱۳۴ بر بردتلا پرتوزیس در محیط کشت B2



نمودار ۲: 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.



نمودار ۳: 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.



نمودار ۴: 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 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 1/200 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 محور Y میزان بیان Fim3 را در این جذب نوری را نشان می دهد.

نتیجه گیری

نسل جدیدی از واکسن های سیاه سرفه را دارند (۹). در تحقیقی در سال ۲۰۱۴ به مطالعه ی ژنوم *Bordetella pertussis* پرداخته شد. نتایج توالی یابی سروتایپ های متعدد نشان داد که فیمبریه *Bordetella pertussis* 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، پروتئین های سطحی غشای خارجی و لیپولی ساکارید در باکتری های گرم منفی می شود. پروموتورهای *fim2* و *fim3* هرکدام دارای قطعه ی توالی نوکلئوتیدی سیتوزین (C) هستند که با ناحیه ی 35- همپوشانی دارد و BvgA~P زمانی فعال می شود که این رشته در طولی مجاز باشد. اگر طول توالی C فیمبریه *Bordetella pertussis* خیلی کوتاه یا بلند باشد RNA پلیمرز در فاصله ی اشتباهی از ناحیه ی آغازین اتصال پروموتور BvgA~P قرار می گیرد 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 می شود. بنابراین سکانس *bvg* دمای محیط و طول پروموتور توالی C فعالیت *Fim* را تعیین می کنند. دمای ۳۷ °C 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 سویه ی ۵۰۹ و *Fim3* در سویه ی ۱۳۴) 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 سویه ی ۵۰۹ طبق نمودار ۱ پس از گذشت ۲۰ تا ۲۷ ساعت باکتری وارد فاز لگاریتمی می شود. در این زمان

سیاه سرفه بیماری عفونی حاد و بسیار مسری دستگاه تنفس فوقانی است. عامل اصلی این بیماری *Bordetella pertussis* است. این بیماری انسان را درگیر می کند و از طریق قطرات آلوده ی سرفه ی و عطسه انتقال میابد. بیماری همه ی گروه های سنی را در برمی گیرد و برای کودکان زیر یک سال سخت و حتی مرگ بار می باشد. تنها راه پیشگیری از بیماری واکسیناسیون است. فیمبریه در *Bordetella pertussis* یکی از آدهسین های بیان شده در سطح باکتری است که نقش مهمی در اتصال باکتری به سلول های اپتلیال دستگاه تنفسی ایفا می کند و باعث سرکوب التهاب و در نتیجه تکثیر طولانی مدت باکتری می شود (۳ و ۴). فیمبریه ی *Bordetella pertussis* 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* و *Fim3* را پس از واکسیناسیون با واکسن های سلولی و بدون سلول بررسی کردند. نتایج آنها نشان داد که *Fim2* نسبت به *Fim3* سیستم ایمنی را بیشتر تحریک می کند (۸). در سال ۲۰۰۸ هیکینین و همکارانش بر روی ایزوله های *Bordetella pertussis* در فنلاند بر روی سروتایپ و بیان فیمبریه مطالعه کردند. نتایج آنها نشان داد علیرغم واکسیناسیون گسترده در فنلاند سویه های دارای *Fim2* در *Bordetella pertussis* سروتایپ غالب است (۲). همینطور سویه های دارای *Fim2* می توانند در طول عفونت *Fim3* را نیز بیان کنند.

ژو و همکارانش در سال ۲۰۰۹ به بررسی تولید و تعیین ویژگی های پرتاکتین، *Fim2* و *Fim3* در *Bordetella pertussis* پرداختند. آنها این سه پروتئین را در مقادیر زیاد تولید کردند. این سه پروتئین باعث بروز پاسخ ایمنی سلولار و همورال در موش شدند پس این پروتئین ها دارای خواص ایمونوژنیک بوده و پتانسیل خوبی برای تولید

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 الیزا 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.

طبق نمودار ۲ و ۴ میزان بیان فیمبریه پایین است. بیشترین میزان بیان فیمبریه در حدود OD ۰/۷ است. در این OD باکتری تقریباً در اواسط فاز لگاریتمی قرار دارد. سپس تا ورود باکتری به فاز رکود میزان بیان تقریباً ثابت 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

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 Latifi¹, Mojtaba Noofeli^{2*}, Leila Jabalameli³

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