Archive of SID

Iranian Journal of Medical Microbiology | ISSN:2345-4342

Extraction of Outer Membrane Vesicles from Vaccinal Strain of *Bordetella pertussis* as the First Step of a Vaccine Candidate Study Against Pertussis Infection

Maryam Sadat Soltani[1], Fereshteh Eftekhar[1]*, Fereshteh Shahcheraghi[2], Mojtaba Noofeli[3], Seyed Reza Banihashemi[4]

1. *Department of Microbiology and Microbial Biotechnology, Faculty of Life Sciences and Biotechnology, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran*
2. *Department of Bacteriology, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran*
3. *Department of Human Bacterial Vaccines Production and Research, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran*
4. *Department of Immunology, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural research, Education and Extention Organization (AREEO), Karaj, Iran*

10.30699/ijmm.14.3.219

ABSTRACT

Background: Pertussis is still one of the major public health problems. The increase of the disease emerged in recent decades due to the replacement of the reactogenic whole cell vaccine with the safer acellular vaccine and the genetic diversity of the bacterium. As outer membrane vesicles (OMVs) obtained from *Bordetella pertussis* contains surface immunogenic antigen in its structure, it has an acceptable characteristic that could be considered as a good candidate for pertussis vaccine.

Materials & Methods: Vaccinal strain BP134 strain of *B. pertussis* was cultured under standard conditions and OMVs were isolated by modifying the method without the use of ultracentrifuge. The isolated vesicles were examined by transmission electron microscopy and protein content was measured by the Bradford method. The expression of virulence factors was confirmed by SDS-PAGE and protein expression was confirmed by Western immunoblot. Pyrogenicity test and abnormal toxicity test were performed on extracted vesicles.

Results: The morphology of the vesicles was confirmed in the range of 40 to 200 nm. The protein concentration of the extracted vesicles was determined as 600 µg. Expression analysis by SDS-PAGE and western blot confirmed the presence of virulence factors, pertussis toxin, filamentous hemagglutinin, and pertactin using monoclonal antibodies in OMVs of the vaccinal strain. Pyrogenicity test and abnormal toxicity test were negative.

Conclusion: The proposed method is a simple and efficient method for isolation of the *B. pertussis* OMVs. The OMVs extracted from *B. pertussis* could be a candidate for a new generation of pertussis vaccine alone or in combination with adjuvants to design future acellular vaccines.

Keywords: *Bordetella pertussis*, pertussis vaccine, SDS-PAGE, Western immunoblot

Received: 2020/03/21; **Accepted**: 2020/06/10; **Published Online:** 2020/06/18

Corresponding Information: **Fereshteh Eftekhar,** *Department of Microbiology and Microbial Biotechnology, Faculty of Life Sciences and Biotechnology, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran*. Email: f-eftekhar@sbu.ac.ir

Copyright © 2020, This is an original open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-noncommercial 4.0 International License which permits copy and redistribution of the material just in noncommercial usages with proper citation.

Use your device to scan and read the article online

Soltani M S, Eftekhar F, Shahcheraghi F, Noofeli M, Banihashemi S R. Extraction of Outer membrane Vesicles from Vaccinal Strain of Bordetella Pertussis as the First Step of a Vaccine Candidate Study Against Pertussis Infection. Iran J Med Microbiol. 2020; 14 (3) :213-226

Download citation: BibTeX | RIS | EndNote | Medlars | ProCite | Reference Manager | RefWorks

Send citation to: Mendeley Zotero RefWorks

www.SID.ir

Archive of SID

Introduction

Pertussis is an acute respiratory illness that is highly contagious, especially in infants and children, and is caused by the gram-negative bacterium *Bordetella pertussis* **(1)**. Pertussis is a reemergence disease and one of the ten most common causes of death from infectious diseases worldwide. Before vaccination was introduced, it was the main cause of infant death in the world. The main source of illness for the infant is family members, and transmission is often directly from one person to another **(2)**.

The first generation of vaccines against the disease, the whole-cell pertussis vaccine (wP), was introduced in 1940. This vaccine uses the whole bacterium which has been killed by heat so that with widespread vaccination in the world, the number of cases decreased rapidly. Although, the vaccine was associated with side effects such as fever and local reaction at the injection site and encephalopathy, due to the high content of lipopolysaccharide, which is highly immunogenic **(3)**. Due to the side effects of this vaccine, the second generation of the acellular pertussis vaccine (aP) was introduced and replaced in developed countries. aP vaccines contain inactivated pertussis toxin, along with recombinant or pure bacterial antigens of *B. pertussis* **(4, 5)**.

wP provides immunity against a wide range of antigens, while aP creates immunity against a small number of antigens used in vaccine formulations. As a result, aP has low immune-stimulating activity and does not inhibit colonization in the respiratory tract so immunized individuals can be involved in the transmission of the disease in the population **(6, 5)**.

In recent years, the re-emergence of pertussis has been observed in many countries with high vaccinated populations, and there has been a significant increase in the number of reported cases so that despite high rates of vaccination the disease is not yet controllable. Pertussis is an endemic disease, as well as the most common vaccine-preventable disease reported in industrialized countries **(8, 7)**. In Iran, wP vaccines have been produced and used based on standard strain for many years, but despite high vaccination coverage, the number of patients with the disease has increased in recent years **(9)**.

The resurgence of pertussis is associated with a variety of factors, including reduced immunity over time, gene mutations in bacterial antigens, and polymorphism in these genes, resulting in differences between the circulating strains and strains used in vaccine production was noted **(11, 10)**. According to the mentioned points, due to the control of the disease, a new generation of vaccines is needed on which genetic polymorphism is not effective.

Outer membrane vesicles (OMVs) of *B. pertussis* contain outer membrane proteins (OMPs) and lipopolysaccharide (LPS) that have adjuvant properties and stimulate innate immune responses as well **(12, 13)**. Unlike aP vaccines, these OMVs are easily absorbed by mammalian cells due to their nanoparticle properties and are harvested by antigen-presenting cells (APC) **(14, 15)**. For this reason, to control pertussis disease, OMVs vaccine obtains from vaccinal strain are considered suitable candidates for the vaccine. Therefore, the extraction of these vesicles is of particular importance. To date, various methods have been proposed to stimulate the production and extraction of vesicles. The most important method is based on the use of serial ultracentrifugation **(16)**. But lack of easy access of research and academic centers to ultracentrifuge in our country Iran is an important barrier for the extraction of OMVs. Therefore, the aim of this study was to provide a suitable and high-yield method for OMVs extraction of *B. pertussis* and to investigate the presence of virulence factors in it.

Materials and Methods

Strain and Culture

B. pertussis BP134 (vaccinal strain) provided by the Razi vaccine and serum research institute was used in this study. The bacterium was cultured on the Bordet-Gengou agar medium.

Isolation of OMVs

Massive bacterial culture was performed to isolate OMVs on the modified Stainer Scholte (MSS) liquid culture medium **(17)**. Colonies grown on Bordet-Gengou medium were transferred to 50 cc MSS liquid medium under sterile conditions and incubated at 35°C and 150 rpm until bacterial growth reached the end of the logarithmic phase, turbidity equal to 0.7 to 1 at a wavelength of 600 nm (OD600 = 0.7-1), 10 cc of which was inoculated to 500 cc of the new MSS medium. It was shown as OD600 = 0.05. This means that this turbidity was considered the initial turbidity for bacterial growth, then incubated at 35°C and 150 rpm. Taking into account the growth curve of the bacterium and considering that the best time to stop bacterial growth and start the OMV extraction process is at the end of the logarithmic phase and the beginning of the stationary phase, it seems that the best time to harvest a cell mass when the turbidity is 0.7 to 1 at a wavelength of 600 nm.

By centrifuging the culture medium containing bacteria at 8000 g and at 4°C for 30 minutes, bacterial pellets were isolated and washed twice with phosphate buffer (PBS). In the next step, the pellets were completely dissolved in the Tris-EDTA buffer (TE; 8 ml per gram of sediment) to create a uniform suspension. The suspension was then kept at room temperature for

www.SID.ir

Archive of SID

30 min and sonicated for 10 min on ice. The suspension was centrifuged at 10000 g and 4°C for 20 min. The pellets were washed with TE buffer and the supernatant was centrifuged at 60000 g C for 2 hours at 4°C. The pellets dissolved in the buffer contained Tris (0.1 mol), EDTA (10 mM) and DOC (5 g/L) to obtain a uniform suspension, then the suspension was centrifuged at 60000 g at 4°C for 2 h. The supernatant was poured into a new microtube and the TE buffer was added to it and centrifuged again at 60,000 g and 4°C for one hour. Then, the obtained pellets were dissolved in 5 ml of 3% sucrose and passed through the 0.22 µm filter. The filtered sample (containing OMV) was inactivated by heating in 56°C water bath. To study sterility, the extracted vesicles were cultured in the blood Agar. OMV extraction was performed four times with this method, and each time, the size and spatial shape of the vesicles extracted with the TEM electron microscope were examined **(12, 18)**. For this purpose, a carbon formvar grade was first prepared and negatively stained with potassium phosphotungstate. The grids were examined by Zeiss EM10C electron microscope **(12)**.

Measure the Amount of Vsicles Protein

Bradford protein testing is a common method for measuring the concentration of proteins. OMV protein levels were measured according to this method **(19)**.

SDS-PAGE Electrophoresis and Western Blotting

The protein profile of pertussis toxin, pertactin, and filamentous hemagglutinin proteins in OMVs extracted from vaccinal strain was evaluated using the SDS-PAGE method on 12% polyacrylamide gel (20). The coloring of the obtained protein bands was performed by Coomassie blue method and the final confirmation of PTX, PRN, FHA protein expression was prepared by the western blotting method using monoclonal antibodies (NIBSC No. 97/572, 97/558 and 97/564, respectively). NIBSC was performed using SMOBIO (PM2600) protein marker **(12, 21)**.

Pyogeny Test in Rabbits

The pyrogeny testing of the extracted sample was performed according to the Pharmacopoeia method. To a group of five white rabbits produced by the Razi vaccine and serum research Institute, 3 mg/mL of OMVs were injected intravenously per kilogram of animal weight, and the same amount of PBS was injected into the control group. Then the rabbit's body temperature was measured every hour, until the third hour after the injection **(22)**.

Abnormal Toxicity Test

The Abnormal Toxicity Test was performed to determine the harmlessness of the consumption of OMVs extracted in rabbits. A group of five white rabbits weighing 1.5 to 2 kg provided by Razi Vaccine and Serum Institute were injected intramuscularly with 3 mg/ml of OMVs per kilogram of body weight. The rabbits were then kept in normal conditions for seven days. Temperatures were maintained in the range of 20 to 22°C and humidity around 60%, and during this period, in terms of weight loss, side effects of the injection site and mortality were examined **(22).** In this study, the international standards of ethical rules for dealing with laboratory animals were observed.

Results

Since the bacterial culture in liquid medium and induction of stress in bacterial cells (the composition of the medium, cell harvest time and type of different stress conditions) in the liquid medium, affect the amount of vesiculation and OMV content. Harvest time is very important in the OMV extraction process. Considering that the best time to stop bacterial growth and start the OMV extraction process is the end of the logarithmic phase and the beginning of the stationary phase, which is about 30 hours after the initial culture according to the bacterial growth curve (Figure 1), harvesting was performed at this time.

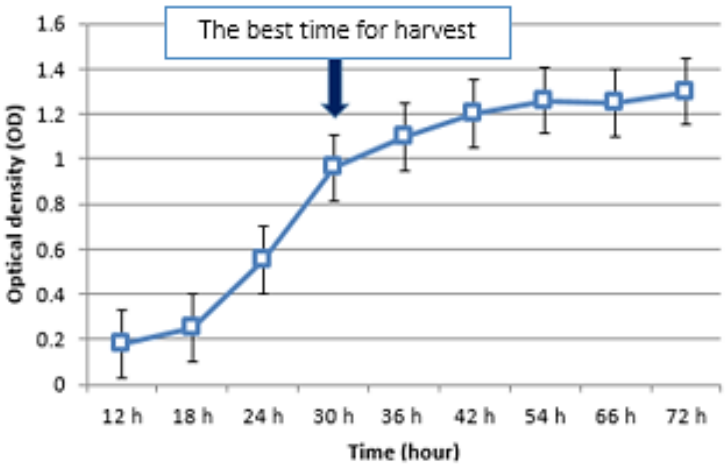


Figure 1. Growth curve of *B. pertussis* vaccinal strain

www.SID.ir

Archive of SID

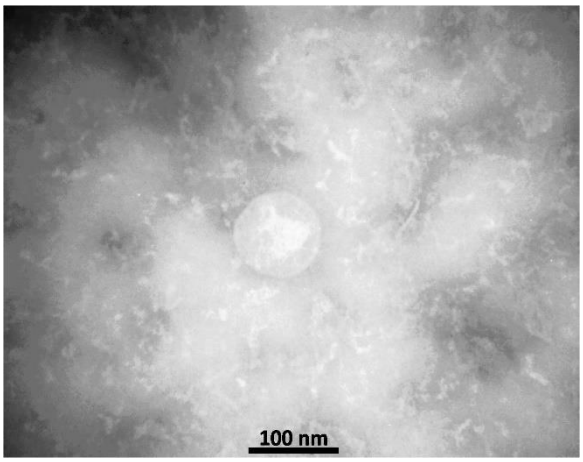


Figure 2. Electron micrograph of the extracted vesicles of *B. pertussis*

The morphology of the vesicles was confirmed by electron microscopy and its size was determined between 40 - 200 nanometers (Figure 2)

The protein content of the extracted OMVs was estimated at 700 µg/ml. The profile of the proteins in extracted OMVs was observed by SDS-PAGE on polyacrylamide gel (Figure 3), presence of pertussis toxin, pertactin and filamentous hemagglutinin antigens in the extracted OMVs previously observed in the SDS-PAGE test confirmed by western blot test, using specific monoclonal antibodies, and completely specific bands were created for the antigens that were similar to the OMV isolated by the previous current method (Figure 4). OMV extraction was performed four times independently, and each time the results were similar in morphology and size and similar to those previously performed.

With the injection of the extracted vesicles, the results of the pyrogeny test and the abnormal toxicity test were negative, so that no significant increase was observed in these tests, the increase in body temperature of any rabbit was not more than 0.7°C, which indicates that extracted OMVs was not pyrogenic. Also, in the test for abnormal toxicity, none of the animal models lost weight, no side effects were observed at the injection site, and all rabbits survived until the end of the seventh day.

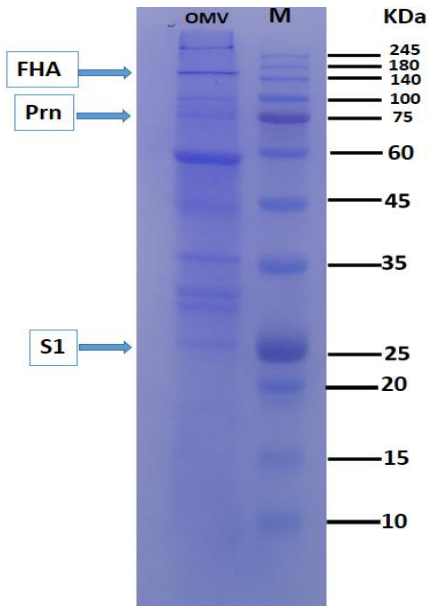


Figure 3. SDS-PAGE test of *B. pertussis* extracted with a protein marker

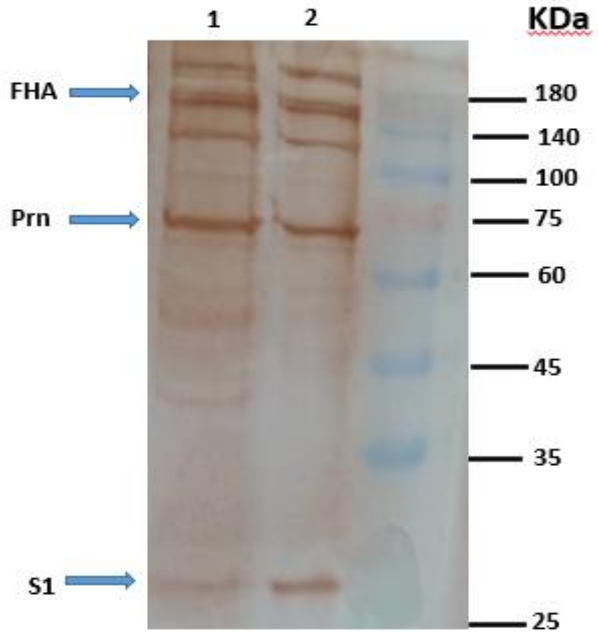


Figure 4. Western blot test using PTX, FHA and PRN monoclonal antibodies. (1) OMV obtained from the modified extraction method, (2) OMV obtained from the current extraction method

www.SID.ir

Archive of SID

Discussion

The resurgence of pertussis occurs despite widespread vaccination, and given the importance of more prevention of the disease, there is much debate today about pertussis vaccines. Acellular pertussis vaccines (aP) was developed and replaced in many developed countries due to the side effects associated with whole-cell pertussis vaccines (wP). These aP vaccines contain inactivated toxin along with recombinant or pure *B. pertussis* bacterial antigens such as pertussis toxin, filamentous hemagglutinin, pertactin, and fimbriae. These vaccines also have disadvantages, including the effectiveness of these vaccines depends on the number and concentration of antigens present in its formulation. While wP creates immunity against a wide range of antigens. The aP does not inhibit colonization in the respiratory tract, and immunized individuals can be involved in the transmission of the disease in the population **(23, 24).**

Other limitations of the aP pertussis vaccines include a rapid reduction of antibodies in the body after vaccination and induction of humoral immunity by the vaccine. Because *B. pertussis* is an intracellular bacterium, the humoral response is not the acquired immune response required for immunity against pertussis and cannot produce long-term immunity, so the cellular immune response plays an important role in clearing *B. pertussis*. Therefore, there is a great need for a third-generation pertussis vaccine to cover the weaknesses of previous vaccines. A vaccine should not only stimulate Th2 responses, but also stimulates Th1 and Th17 responses, like wP vaccine **(3, 25)**.

Outer membrane vesicles of bacteria play an important role in physiology, pathogenesis, and interaction between host and pathogenic agents, and contain surface immunogens in their structure **(26, 27)**. On the other hand, since overtime after vaccination, genetic modification of pathogenic and immunogenic factors of the bacterium *B. pertussis* has caused genetic modification of strains to protect the bacterium from the host immune system **(28)**.

It seems that the main stimulate pressure for vaccine development is due to the generation of vaccine-escape mutants, such as those that do not produce pertactin. Such strain became dominant in many countries **(29-31)**. The ability of OMV for protection with the help of several components, including Ptx, FHA and PRN, it introduces OMV as a vaccine candidate that selective pressure does not affect the circulating strains, and reduce the possibility of strains escaping the vaccine, so OMV has acceptable properties that can be used as a good candidate for the pertussis vaccine **(18)**.

In 2013, Fernandez evaluated the possibility of using OMVs extracted from *B. pertussis* as a vaccine candidate, and with the use of western blotting, the presence of pertussis toxin, pertactin, and fimbriae, were confirmed. LAL (Limulus Amebocyte Lysate) has been shown to have lower endotoxin levels than a vaccine licensed in wP **(14)**.

The contents of the vesicles of the outer membrane of the Tohama strain were examined using various techniques in a study by Robert and colleagues. The results showed the presence of known surface immunogens, such as pertactin, adenylate cyclase, pertussis toxin, and lipooligosaccharide. Considering the inherent safety induced in the airflow pathway and the protective immunity in the mouse model, it was shown that the OMV obtained from *B. pertussis* is considered as a candidate for protection against pertussis **(12)**.

In a study by Raeven in 2016, the possibility of using OMVs as a candidate for the pertussis vaccine was investigated. Comparing OMV-containing vaccines with wP and aP vaccines, high levels of antibodies were observed, and the results showed that the extensive and regulated humoral response makes OMV vaccine a potential and promising candidate **(32)**.

In a study by Gillard in 2014, outer membrane vesicles obtained from the recombinant strain of *B. pertussis* were formulated with the Tdap vaccine as a vaccine candidate evaluated, and the results were compared with conventional commercial vaccines. The findings showed that $Tdap_{omv}$ induced Th1 and Th2 immune responses and provided protection against clinical isolates, while the common commercial Tdap vaccine-induced Th2 but weakened Th1 response and provided little protection against the pathogen. According to $Tdap_{omv}$, it can be considered as a new vaccine **(33)**.

Also, the Bexsero® (previously 4CMenB) vaccine, OMV isolated by the detergent in combination with the recombinant antigen, was introduced against *Neisseria meningitidis* serogroup B, developed by Bai et al. In 2011, and its immunogenicity was confirmed in clinical trials **(34)**.

Extraction of the outer membrane vesicles of bacteria and their application in vaccine studies are developing nowadays. In previous studies, ultracentrifugation with a speed of 100000 g was used to isolate the outer membrane vesicles **(12, 16, 33)**. Due to the unavailability of Ultracentrifuge in most research and academic centers in Iran, in this study, a new method for isolating OMVs of *B. pertussis* was presented. This method involves a series of simple high-efficiency steps that can be performed using high-speed centrifugation. Figure 2 confirms the natural spatial shape of the vesicles and the similarity of the extracted vesicles compared with previous studies. So that the size of the vesicles is 40-200 nm,

www.SID.ir

Archive of SID

which corresponds to the results obtained from the extraction of the vesicle using ultracentrifugation method **(12, 16)**.

Conclusion

Also, the results of SDS-PAGE and Western using monoclonal antibodies show that the vesicles extracted in the new method are similar to the previous current method and contain important immunogens such as pertussis toxin, pertactin and filamentous hemagglutinin, which can induce the host immune system. The extraction was repeated four times, and the morphological similarity, size, and presence of antigens were observed in all cases. Also, the harmlessness of using the vesicles obtained by the pyrogeny test and the abnormal toxicity indicates that the sample is not contaminated with impurities during the extraction process. Therefore, it is possible to use it in clinical studies in animal models. This method has many positive advantages and is beneficial economically compared to the current method, hence it can pave the way for the extraction of vesicles on a large scale without the need for ultracentrifugation. OMVs obtained from the vaccinal strain of *B. pertussis* can be considered as a candidate for a new generation of pertussis vaccine alone or in combination with adjuvants for new acellular vaccines design in the future.

Acknowledgment

The authors thank all those who helped them writing this article.

Conflict of Interest

Authors declared no conflict of interests.

www.SID.ir

Archive of SID

مقاله پژوهشی

مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران

سال ۱۴ ـ شماره ۳ ـ خرداد و تیر ۱۳۹۹

Journal homepage: www.ijmm.ir

استخراج وزیکول‌های غشای خارجی سویه واکسینال *بردتلا پرتوسیس* به‌عنوان اولین قدم مطالعاتی کاندیدای واکسن علیه عفونت سیاه سرفه

مریم سادات سلطانی[۱]، فرشته افتخار[۱*]، فرشته شاه‌چراغی[۲]، مجتبی نوفلی[۳]، سید رضا بنی‌هاشمی[۴]

۱. بخش میکروب شناسی و بیوتکنولوژی میکروبی، دانشکده علوم زیستی و بیوتکنولوژی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران
۲. بخش باکتری‌شناسی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
۳. بخش تحقیق و تولید واکسن‌های باکتریایی انسانی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی(تات)، کرج، ایران
۴. بخش ایمنی‌شناسی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی (تات)، کرج، ایران

اطلاعات مقاله

تاریخچهٔ مقاله

دریافت: ۱۳۹۹/۰۱/۰۲

پذیرش:۱۳۹۹/۰۳/۲۱

انتشار آنلاین: ۱۳۹۹/۰۳/۲۹

موضوع:

باکتری شناسی پزشکی

نویسندهٔ مسئول:

فرشته افتخار،

بخش میکروب شناسی و بیوتکنولوژی میکروبی، دانشکده علوم زیستی و بیوتکنولوژی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

ایمیل: f-eftekhar@sbu.ac.ir

چکیده

زمینه و اهداف: پرتوسیس هنوز به‌عنوان یکی از مشکلات بهداشت جهانی مطرح است. افزایش این بیماری در دهۀ اخیر به دلیل جایگزینی واکسن‌های سلولی دارای عوارض جانبی با واکسن ایمن‌تر آسلولار و همچنین تنوع ژنتیکی باکتری می‌باشد. با توجه به اینکه وزیکول‌های غشای خارجی (OMVs) بدست آمده از *بردتلا پرتوسیس* حاوی ایمونوژن‌های سطحی در ساختار خود است، می‌تواند به‌عنوان کاندیدای کاربردی واکسن پرتوسیس مطرح شود.

مواد و روش کار: سویه واکسینال BP134 *بردتلا پرتوسیس* در شرایط استاندارد کشت داده شد و وزیکول‌ها با روش تغییر یافته و بدون استفاده از اولتراسانتریفیوژ استخراج شدند. وزیکول‌های جدا شده توسط میکروسکوپ الکترونی عبوری بررسی و میزان غلظت پروتئین با استفاده از روش برادفورد مشخص گردید. بررسی بیان فاکتورهای بیماری‌زا با استفاده از SDS-PAGE و صحت بیان پروتئین‌ها با تکنیک وسترن ایمونوبلات تایید شدند. در پایان آزمون پیروژنی و سمیت غیر طبیعی بر روی وزیکول‌های استخراج شده انجام شد.

یافته‌ها: ریخت‌شناسی وزیکول‌ها با اندازه بین ۴۰ تا ۲۰۰ نانومتر تایید گردید. غلظت پروتئین وزیکول‌های استخراج شده ۶۰۰ میکروگرم مشخص شد. بررسی بیان با SDS-PAGE و وسترن وجود فاکتورهای بیماری‌زا با حضور باندهای پرتوسیس توکسین، فیلامنتوس هماگلوتینین و پرتاکتین را با استفاده از آنتی‌بادی‌های مونوکلونال در OMVs سویه واکسینال تایید کرد. نتیجه آزمون پیروژنی و سمیت غیر طبیعی روی نمونه‌ها منفی بود.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان می‌دهد که روش ارائه شده، روشی ساده و کارآمد برای جداسازی OMVs *بردتلا پرتوسیس* است و OMV جدا شده می‌تواند به‌عنوان کاندیدای نسل جدیدی از واکسن پرتوسیس به تنهایی یا در ترکیب با ادجوانت‌ها جهت طراحی واکسن‌های آسلولار در آینده مطرح باشد.

کلید واژه‌ها: *بردتلا پرتوسیس*، واکسن پرتوسیس، SDS-PAGE، وسترن ایمونوبلات.

کپی‌رایت © مجله میکروب شناسی پزشکی ایران: دسترسی آزاد؛ کپی برداری، توزیع و نشر برای استفاده غیرتجاری با ذکر منبع آزاد است.

مقدمه

بیماری سیاه سرفه (پرتوسیس)، بیماری حاد تنفسی و به شدت مسری به‌ویژه در نوزادان و کودکان است و به‌وسیلۀ باکتری گرم منفی *بردتلا پرتوسیس* ایجاد می‌شود (۱). پرتوسیس به‌عنوان یک بیماری بازپدید و یکی از ده عامل رایج مرگ و میر ناشی از بیماری‌های عفونی در جهان مطرح است. قبل از پیدایش واکسیناسیون، اصلی‌ترین علت مرگ نوزادان در جهان بود. منبع اصلی بیماری برای نوزاد اعضای خانواده است و انتقال اغلب به‌طور مستقیم از فردی به فرد دیگر صورت می‌پذیرد (۲).

اولین نسل واکسن‌ها علیه این بیماری، واکسن‌های سلولی به نام whole cell pertussis vaccine (wP) در سال ۱۹۴۰عرضه

www.SID.ir

Archive of SID

شدند. در این واکسن‌ها از پیکر کامل باکتری کشته شده به‌وسیلهٔ گرما استفاده می‌شود؛ با گسترش واکسیناسیون در جهان به سرعت تعداد موارد بیماری کاهش یافت. ولی این واکسن با عوارض جانبی مانند تب و واکنش موضعی در محل تزریق و آنسفالوپاتی همراه بود که علت آن به دلیل محتوای زیاد لیپوپلی ساکارید است که به شدت تحریک کنندهٔ ایمنی می‌باشد (۳). به دلیل اثرات جانبی این واکسن، نسل دوم واکسن غیر سلولی سیاه سرفه به نام acellular pertussis vaccine (aP) کشف و در کشورهای پیشرفته جایگزین گردید. واکسن‌های aP حاوی پرتوسیس توکسین غیر فعال شده همراه با آنتی‌ژن‌های باکتریایی نوترکیب یا خالص *بردتلا پرتوسیس* است (۵، ۴).

wP باعث ایجاد ایمنی علیه رنج وسیعی از آنتی‌ژن‌ها می‌شود، در حالی که aP ایمنی علیه تعداد کمی از آنتی‌ژن‌ها ایجاد می‌کند که در فرمولاسیون واکسن به کار برده شده است. در نتیجه aP فعالیت تحریک‌کننده ایمنی کمی دارد، کلونیزاسیون در مجرای تنفسی را مهار نمی‌کند و افراد ایمن شده با این واکسن‌ها می‌توانند در انتقال بیماری در جمعیت نقش داشته باشند (۶، ۵).

در سال‌های اخیر، ظهور مجدد پرتوسیس در تعدادی از کشورهای با جمعیت بالای واکسینه شده مشاهده شد و افزایش قابل ملاحظه‌ای در تعداد موارد گزارش شده وجود داشت به‌طوری‌که علیرغم واکسیناسیون، بیماری هنوز قابل کنترل نیست و پرتوسیس به‌عنوان یک بیماری بومی و همچنین به‌عنوان شایع‌ترین بیماری قابل جلوگیری از طریق واکسن در کشورهای صنعتی مطرح شده است (۸، ۷). در ایران نیز سال‌هاست که واکسن سلولی بر پایه سویه استاندارد تولید و مورد استفاده قرار می‌گیرد ولی با وجود پوشش بالای واکسیناسیون، آمار مبتلایان به این بیماری در سال‌های اخیر افزایش داشته است و ابتلا بیشتر در کودکان زیر دو ماه گزارش شده است (۹).

باز پدیدی بیماری سیاه سرفه با فاکتورهای مختلفی مرتبط است که از این میان می‌توان به کاهش ایمنی ایجاد شده توسط واکسن در اثر گذشت زمان، جهش‌های ژنی در آنتی‌ژن‌های باکتری و ایجاد پلی‌مورفیسم در این ژن‌ها و در نتیجه تفاوت سویه‌های موجود در جامعه با سویه مورد استفاده در تهیه واکسن اشاره کرد (۱۱، ۱۰). با توجه به موارد ذکر شده، به‌منظور کنترل بیماری، نیاز به نسل جدیدی از واکسن‌ها هست که پلی‌مرفیسم ژنتیکی روی آن موثر نباشد و محدودیت‌های واکسن‌های قبلی را نداشته باشد.

وزیکول‌های غشای خارجی (OMVs) *بردتلا پرتوسیس* دارای پروتئین‌های غشای خارجی (OMPs) و لیپوپلی ساکارید (LPS) هستند که خاصیت ادجوانتی دارند و پاسخ‌های ایمنی ذاتی را به خوبی تحریک می‌کنند (۱۳، ۱۲). این OMVها بر خلاف واکسن سلولی به دلیل خاصیت نانوذرات و دارا بودن ساختار پروتئولیپوزومی به راحتی جذب سلول‌های پستانداران شده و توسط سلول‌های عرضه کننده آنتی‌ژن (APC) برداشت می‌گردند و آنتی‌ژن‌های آن به سلول‌های ایمنی عرضه می‌شود (۱۵، ۱۴). به همین دلیل به‌منظور کنترل بیماری پرتوسیس، OMVs سویه واکسینال بومی به‌عنوان کاندیدای مناسب واکسن مطرح شدند. از این رو جداسازی این وزیکول‌ها اهمیت ویژه‌ای دارد. تا به امروز روش‌های مختلفی برای تحریک تولید و جداسازی وزیکول‌ها مطرح شده است که مهمترین روش بر پایه استفاده از اولترانتریفیوژهای پی‌درپی است (۱۶) که عدم دسترسی آسان در مراکز تحقیقاتی و دانشگاهی به دستگاه اولتراسانتریفیوژ در کشور ما ایران به‌عنوان مانعی مهم برای جداسازی وزیکول‌ها مطرح است. لذا هدف از این پژوهش ارایهٔ روشی مناسب و پر بازده برای جداسازی OMVs سویه واکسینال باکتری *بردتلا پرتوسیس* در ایران و بررسی وجود فاکتورهای بیماری‌زا در آن بود.

روش پژوهش

انتخاب سویه و کشت

در این مطالعه از سویه واکسینال BP134 *بردتلا پرتوسیس* فراهم شده از موسسه واکسن و سرم‌سازی رازی استفاده شد. باکتری بر روی محیط Bordet-Gengou آگار حاوی ۱۰٪ خون دفیبرینه گوسفندی کشت داده شد.

جداسازی OMVs

کشت انبوه باکتری جهت جداسازی OMVs بر روی محیط کشت مایع modified Stainer Scholte (MSS) انجام شد (۱۷). کلنی‌های رشد یافته بر روی محیط Bordet-Gengou در شرایط استریل و به کمک آنس به ۵۰ میلی‌لیتر محیط مایع MSS منتقل گردید و در انکوباتور شیکردار با دمای ۳۵°C و دور rpm ۱۵۰ قرار گرفت. پس از رسیدن رشد باکتری به فاز لگاریتمی یعنی کدورت برابر با ۰/۷ تا ۱ در طول موج ۶۰۰ نانومتر (۰/۷-۱=OD_{600})، ۱۰ میلی‌لیتر از آن به ۵۰۰ میلی‌لیتر محیط جدید MSS تلقیح شد به طوری که OD_{600}= ۰/۰۵ را نشان داد. به این معنی که این کدورت، کدورت اولیه جهت رشد باکتری در نظر گرفته شد. سپس در انکوباتور شیکردار و دمای ۳۵°C انکوبه شدند.

www.SID.ir

Archive of SID

با توجه به این که بهترین زمان جهت توقف رشد باکتری و شروع فرآیند جداسازی OMV انتهای فاز لگاریتمی و ابتدای فاز سکون است و همچنین با در نظر گرفتن منحنی رشد باکتری، زمانی که کدورت برابر با ۰/۷ تا ۱ در طول موج ۶۰۰ نانومتر رسید، زمان مناسب برای برداشت توده سلولی است.

با سانتریفیوژ محیط کشت حاوی باکتری در دور g ۸۰۰۰ و در دمای °۴C به مدت ۳۰ دقیقه، رسوب باکتری جداسازی شد. رسوب باکتری، دو بار با بافر فسفات (PBS) شستشو داده شد. در مرحله بعد رسوب در بافر تریس-EDTA (TE؛ ۸ میلی‌لیتر به ازای هر گرم رسوب) به‌طور کامل حل گردید تا سوسپانسیون یکنواختی ایجاد شود. سپس سوسپانسیون به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد و به مدت ۱۰ دقیقه روی یخ سونیکاسیون انجام گرفت. سوسپانسیون در g ۱۰۰۰۰ و دمای °۴C به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. رسوب با بافر TE شستشو داده شد و مایع رویی در g ۶۰۰۰۰ در دمای °۴C به مدت ۲ ساعت سانتریفیوژ گردید رسوب به‌دست آمده در بافر شامل تریس (۰/۱ مولار)، EDTA (۱۰ میلی‌مولار) و DOC (۵ g/L) به‌طور کامل حل شد تا سوسپانسیون یکنواختی به‌دست آید، سپس سوسپانسیون در g ۶۰۰۰۰ در دمای °۴C به مدت ۲ ساعت سانتریفیوژ شد. مایع رویی در میکروتیوپ جدید ریخته شد و بافر TE به آن اضافه گردید و مجدد در g ۶۰۰۰۰ و دمای °۴C به مدت یک ساعت سانتریفیوژ شد. سپس رسوب به‌دست آمده در ۵ میلی‌لیتر سوکروز ۳٪ حل گردید و از فیلتر µm ۰/۲۲ عبور داده شد. نمونهٔ فیلتر شده (حاوی OMV) با حرارت دادن در حمام آب °۵۶C غیر فعال گردید. به‌منظور بررسی استریلیتی، وزیکول‌های استخراج شده بر روی محیط بلاد آگار کشت داده شدند. استخراج OMV با این روش چهار بار انجام گرفت و در هر بار مشاهده، شکل فضایی وزیکول‌های استخراج شده با میکروسکوپ الکترونی TEM بررسی گردید (۱۸، ۱۲). بدین منظور ابتدا گرید فرموار کربن تهیه شد و پس از رنگ‌آمیزی کنتراست منفی با فسفوتنگستات پتاسیم تصویر میکروگراف الکترونی از OMVهای استخراج شده توسط میکروسکوپ الکترونی Zeiss EM10C تهیه شد (۱۲).

سنجش میزان پروتئین وزیکول‌ها

روش پروتئین‌سنجی برادفورد به‌عنوان یک روش رایج برای اندازه‌گیری غلظت پروتئین‌های فراکسیون‌های سلولی می‌باشد. میزان پروتئین OMV طبق این روش اندازه‌گیری شد (۱۹).

الکتروفورز SDS-PAGE و وسترن بلاتینگ

پروفایل پروتئین‌های پرتوسیس توکسین، پرتاکتین و فیلامنتوس هماگلوتینین در وزیکول‌های استخراج شده از سویه واکسینال با استفاده از روش SDS-PAGE بر روی ژل پلی‌اکریل‌آمید ۱۲٪ ارزیابی شد (۲۰). رنگ‌آمیزی باندهای پروتئینی بدست آمده با روش کوماسی‌بلو انجام گرفت و تایید نهایی بیان پروتئین‌های PTX، PRN و FHA با روش وسترن بلاتینگ و با استفاده از آنتی‌بادی‌های مونوکلونال 97/572 برای آنتی‌ژن PTX، 97/558 برای آنتی‌ژن PRN(69-kDa) و 97/564 برای آنتی‌ژن FHA.، تهیه شده از NIBSC با استفاده از مارکر پروتئینی SMOBIO (PM2600) انجام گرفت (۱۲، ۲۱).

آزمون تب‌زایی در خرگوش

جهت بررسی تب‌زایی یا عدم تب‌زایی، آزمون پیروژنی (Pyrogen Test) برای نمونه استخراج شده طبق روش فارماکوپه انجام گردید. به یک گروه پنج تایی از خرگوش‌های سفید تهیه شده از موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، مقدار mg/mL ۳ از OMVs به ازای هر کیلوگرم وزن بدن حیوان، به‌صورت وریدی تزریق شد و به گروه کنترل نیز همین مقدار PBS تزریق شد. سپس دمای بدن خرگوش‌ها در هر ساعت، تا ساعت سوم پس از تزریق، مورد سنجش قرار گرفت (۲۲).

آزمون ایجاد سمیت غیر طبیعی

آزمون ایجاد سمیت غیر طبیعی (Abnormal Toxicity Test) برای تعیین بی‌زیانی مصرف OMVs استخراج شده در خرگوش انجام گرفت. به یک گروه پنج تایی از خرگوش سفید با وزن ۱/۵ الی ۲ کیلوگرم فراهم شده از موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، مقدار mg/mL ۳ از OMVs به ازای هر کیلوگرم وزن، به صورت عضلانی تزریق شد. سپس خرگوش‌ها به مدت هفت روز در شرایط طبیعی نگهداری شدند. درجه حرارت در دامنه ۲۰ تا ۲۲ درجه سلسیوس و رطوبت در حدود ۶۰ ٪حفظ گردید و در این مدت از نظر کاهش وزن، عوارض جانبی محل تزریق و مرگ و میر مورد بررسی قرار گرفتند (۲۲).

یافته‌ها

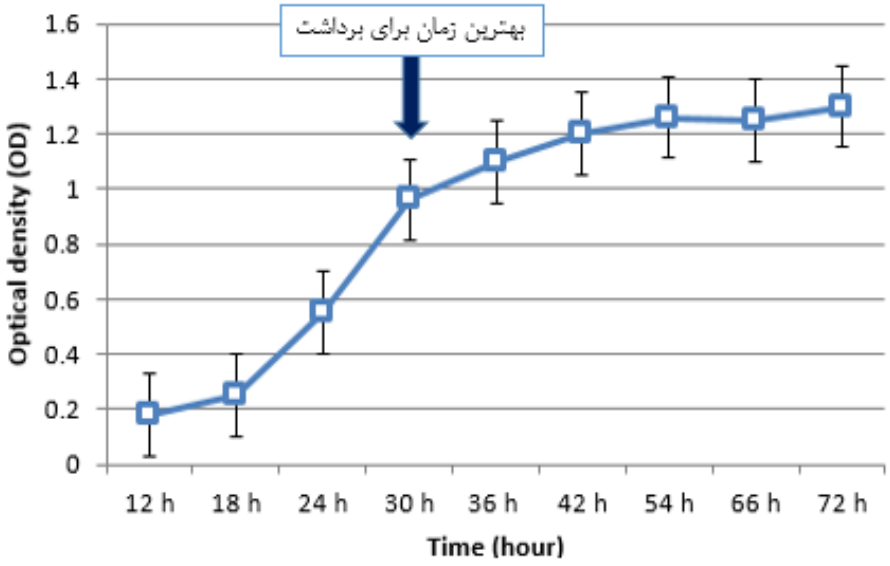
با توجه به اینکه کشت باکتری در محیط‌های مایع و القاء استرس به سلول‌های باکتری (ترکیب محیط، زمان برداشت سلول و نوع کاربرد شرایط مختلف استرس‌زا)، بر روی میزان وزیکولاسیون و محتوای OMV تاثیر دارند. با در نظر گرفتن اینکه بهترین زمان جهت توقف رشد باکتری و شروع فرآیند جداسازی OMV انتهای فاز لگاریتمی و ابتدای

www.SID.ir

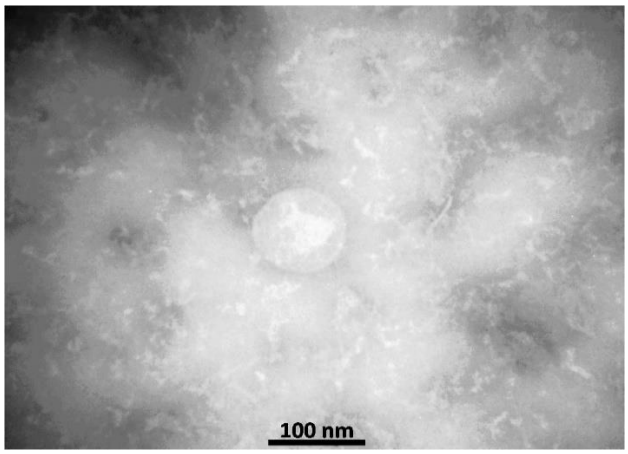
Archive of SID

فاز سکون است که بر اساس منحنی رشد باکتری (شکل ۱)، ۳۸ ساعت بعد از کشت می‌باشد، برداشت در این زمان صورت گرفت.

ریخت‌شناسی وزیکول‌ها توسط میکروسکوپ الکترونی تایید گردید و اندازه آن بین ۴۰ تا ۲۰۰ نانومتر تعیین شد (شکل ۲).



شکل ۱. منحنی رشد سویه واکسینال *بردتلا پرتوسیس*



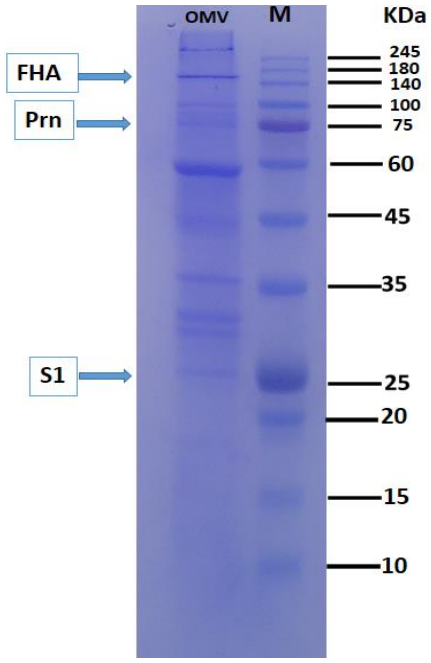
شکل ۲. میکروگراف الکترونی از وزیکول‌های استخراج شده *بردتلا پرتوسیس*

میزان پروتئین OMVهای استخراج شده با استفاده از روش برادفورد، ۷۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر محاسبه شد. پروفایل پروتئین‌های موجود در OMVs استخراج شده، با SDS-PAGE بر روی ژل پلی‌اکریل‌آمید مشاهده شد (شکل ۳)، وجود آنتی‌ژن‌های پرتوسیس توکسین، پرتاکتین و فیلامنتوس هماگلوتنین در OMVهای استخراج شده که پیش از این در آزمون SDS-PAGE مشاهده شده بودند، در آزمون وسترن بلات با آنتی‌بادی‌های منوکلونال اختصاصی تایید شدند و باندهای کاملاً اختصاصی برای آنتی‌ژن‌های مورد نظر ایجاد شدند که مشابه OMV جداسازی شده با روش رایج قبلی بود (شکل ۴). چهار بار استخراج OMV به‌طور مستقل انجام شد و در هر بار نتایج از لحاظ ریخت‌شناسی و اندازه مشابه هم و مشابه مطالعاتی بود که از قبل انجام شده بود.

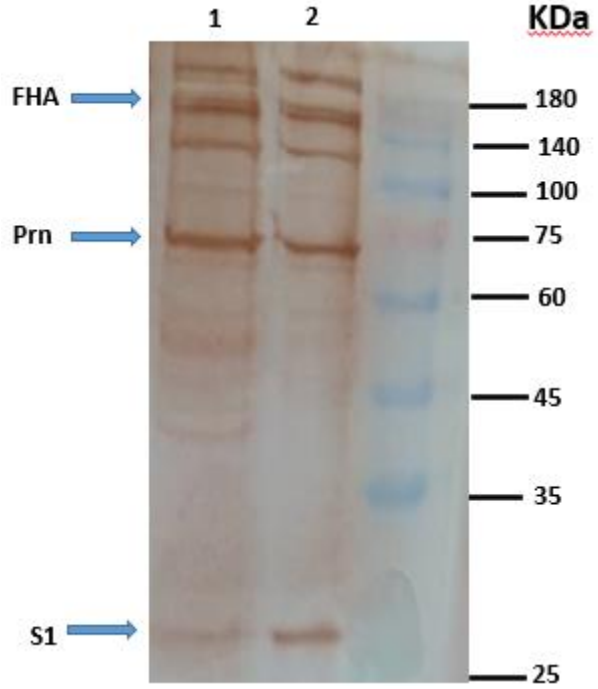
با تزریق وزیکول‌های استخراج شده، نتایج آزمون تب‌زایی و سمیت غیر طبیعی منفی بود، به‌طوری‌که در آزمون تب‌زایی، افزایش قابل ملاحظه‌ای در دمای بدن مشاهده نگردید، افزایش دمای بدن هیچ کدام از خرگوش‌ها بیشتر از ۰/۷°C نبود که در مقایسه با گروه کنترل افزایش دما دیده نشد، که نشان‌دهندهٔ تب‌زا نبودن OMVهای استخراج شده است. همچنین در آزمون ایجاد سمیت غیر طبیعی، هیچکدام از مدل‌های حیوانی دچار کاهش وزن نشدند، در محل تزریق عوارض جانبی مشاهده نگردید و تمام خرگوش‌ها تا پایان روز هفتم زنده بودند.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۳. آزمون SDS-PAGE وزیکول‌های استخراج شده *بردتلا پرتوسیس* در کنار مارکر پروتئینی



شکل ۴. آزمون وسترن بلات با استفاده از آنتی بادی‌های اختصاصی PTX، FHA و PRN. (۱) OMV بدست آمده از روش تغییر یافته جداسازی وزیکول‌ها، (۲) OMV بدست آمده از روش رایج جداسازی وزیکول

بحث

پیدایش مجدد سیاه سرفه علی‌رغم واکسیناسیون گسترده، اتفاق می‌افتد و با توجه به اهمیت کنترل بیشتر این بیماری، امروزه بحث‌های زیادی در زمینه واکسن‌های پرتوسیس مطرح است. به‌طوری‌که با توجه به عوارض جانبی واکسن سلولی سیاه سرفه (wP)، واکسن آسلولار (aP) توسعه یافت و در بسیاری از کشورهای پیشرفته جایگزین شد. واکسن‌های aP حاوی پرتوسیس توکسین غیر فعال شده همراه با آنتی‌ژن‌های باکتریایی نوترکیب یا خالص *بردتلا پرتوسیس* مانند توکسین پرتوسیس، هماگلوتینین رشته‌ای، پرتاکتین و فیمبریه است. این واکسن‌ها نیز دارای معایبی هستند، از جمله اینکه کارایی و تاثیر این واکسن‌ها به شدت وابسته به تعداد و غلظت آنتی‌ژن‌های موجود در فرمولاسیون آن است. در صورتی که wP باعث ایجاد ایمنی علیه دامنه وسیعی از آنتی‌ژن‌ها می‌شود. واکسن آسلولار فعالیت تحریک کننده ایمنی کمی دارد، کلونیزاسیون در مجرای تنفسی را مهار نمی‌کند و افراد ایمن شده با این واکسن‌ها می‌توانند در انتقال بیماری در جمعیت نقش داشته باشند (۲۴، ۲۳).

از دیگر موارد محدودیت واکسن‌های aP پرتوسیس، می‌توان به کاهش سریع آنتی بادی در بدن بعد از واکسیناسیون و القاء ایمنی هومورال توسط واکسن اشاره کرد. با توجه به این که باکتری *بردتلا پرتوسیس* یک باکتری درون سلولی است، پاسخ هومورال، پاسخ ایمنی اکتسابی مورد نیاز برای ایمنی علیه پرتوسیس نیست و به تنهایی قادر نیست ایمنی طولانی مدت ایجاد کند، لذا پاسخ ایمنی سلولی نقش مهمی در پاک کردن *بردتلا پرتوسیس* دارد. بنابراین نیاز به واکسن نسل سوم سیاه سرفه که نقاط ضعف واکسن‌های قبلی را پوشش دهد و بیماری را تحت کنترل در بیاورد بسیار احساس می‌شود. واکسنی که با داشتن چندین ایمونوژن پروتئینی نه تنها بایستی پاسخ‌های Th2 را تحریک کند بلکه پاسخ‌های مربوط به Th1 و Th17 را نیز مانند واکسن سلولی تحریک کند (۲۵، ۳).

وزیکول‌های غشای خارجی باکتری‌ها نقش مهمی در فیزیولوژی، بیماری‌زایی و تعامل بین میزبان و عامل بیماری‌زا دارند و حاوی ایمونوژن‌های سطحی در ساختار خود هستند (۲۷، ۲۶). از سوی دیگر با توجه به اینکه در طول زمان پس از استفاده از واکسن، تغییر ژنتیکی در فاکتورهای بیماری‌زا و ایمونوژن باکتری *بردتلا پرتوسیس* باعث تغییر ژنتیکی سویه‌ها شده تا از این طریق باکتری از سیستم ایمنی میزبان در امان بماند (۲۸).

به نظر می‌رسد فشار اصلی محرک برای تکامل سویه‌ها فشار ایمنی ناشی از واکسیناسیون، با ایجاد نسلی از جهش‌هایی که از

www.SID.ir

Archive of SID

واکسن فرار می‌کنند (vaccine escape mutant) باشد، مانند سویه‌هایی که پرتاکتین تولید نمی‌کنند، امروزه این سویه‌ها به سرعت در حال افزایش هستند و در بسیاری از کشورها به صورت غالب در آمدند (۳۱-۲۹). توانایی ایجاد محافظت OMV به کمک چندین جزء شامل Ptx، FHA، Prn می‌باشد و OMV را به‌عنوان کاندید واکسنی مطرح می‌کند که فشار انتخابی روی سویه‌های در گردش روی یک جزء یا اجزای آن تاثیر نمی‌گذارد و امکان پیدایش سویه‌هایی که از واکسن فرار می‌کنند نیز کاهش می‌یابد. بنابراین OMV ویژگی قابل قبولی دارد که می‌تواند به‌عنوان کاندیدای کاربردی واکسن پرتوسیس مطرح شود (۱۸).

Fernández در سال ۲۰۱۳ امکان استفاده از پروتئولیپوزوم (OMV) استخراج شده از *بردتلا پرتوسیس* را به‌عنوان کاندید واکسن ارزیابی نمود و با استفاده از وسترن بلات وجود پرتوسیس توکسین، پرتاکتین و فیمبریه آشکار شد و با استفاده از آزمون LAL (Limulus Ambeocyte Lysate) نشان داده شد که سطح اندوتوکسین آن کمتر از واکسن دارای مجوز wP است (۱۴).

محتویات وزیکول‌های غشای خارجی *بردتلا پرتوسیس* سویه Tohama در مطالعه‌ای که توسط Roberts و همکارانش صورت گرفت با استفاده از تکنیک‌های مختلف بررسی شد. نتایج وجود ایمونوژن‌های سطحی شناخته شده پرتوسیس مانند پرتاکتین، آدنیلات سیکلاز، پرتوسیس توکسین و لیپو اولیگوساکارید را نشان می‌دهد. با در نظر گرفتن القاء ایمنی ذاتی در مسیرهای جریان هوا و ایمنی محافظت کننده در مدل موشی، نشان داده شد که OMV به‌دست آمده از *بردتلا پرتوسیس* به‌عنوان کاندیدایی برای ایجاد محافظت علیه پرتوسیس مطرح است (۱۲).

در مطالعه‌ای که به‌وسیلهٔ Raeven در سال ۲۰۱۶ انجام شد امکان استفاده از OMVs به‌عنوان کاندیدای واکسن پرتوسیس بررسی گردید. در مقایسه واکسن‌های حاوی OMV با واکسن‌های wP و aP، سطح بالایی از آنتی بادی مشاهده شد و نتایج به‌دست آمده نشان داد که پاسخ هومورال گسترده و تنظیم شده، واکسن OMV را به‌عنوان یک کاندیدای محتمل و امید بخش مطرح می‌کند (۳۲).

در مطالعه‌ای که توسط Gaillard در سال ۲۰۱۴ صورت گرفت، وزیکول‌های غشای خارجی به‌دست آمده از سویه نوترکیب *بردتلا پرتوسیس* در فرمولاسیون با واکسن Tdap به‌عنوان کاندید واکسن بررسی شدند و نتایج با واکسن تجاری رایج مقایسه شد. یافته‌ها نشان دادند که $Tdap_{omv}$ باعث القاء پاسخ ایمنی Th1 و Th2 می‌گردد و محافظت علیه عفونت جدایه بالینی ایجاد می‌کند، در صورتی که واکسن تجاری رایج Tdap موجب القاء Th2 می‌شود ولی پاسخ Th1 ضعیف است و محافظت کمی علیه عامل بیماری مورد نظر ایجاد می‌کند. بنابراین $Tdap_{omv}$ می‌تواند به‌عنوان واکسن چند آنتی‌ژنی آسلولار جدید در نظر گرفته شود (۳۳).

همچنین واکسن Bexsero® (previously 4CMenB)، OMV جداسازی شده به وسیله دترجنت در ترکیب با آنتی‌ژن نوترکیب وارد شده علیه *نایسریا مننژیتیدیس* سروگروپ B که توسط Bai و همکارانش در سال ۲۰۱۱ توسعه یافت و ایمونوژنیسیته آن در آزمایش‌های بالینی تایید شده است (۳۴).

با توجه به این که جداسازی وزیکول‌های غشای خارجی باکتری‌ها و کاربرد آن‌ها در مطالعات مربوط به واکسن روز به روز گسترش می‌یابد. برای جداسازی وزیکول‌های غشای خارجی در مطالعات پیشین از اولتراسانتریفیوژ با دور g ۱۰۰۰۰۰ استفاده می‌شد (۳۳، ۱۶، ۱۲). با توجه به در دسترس نبودن اولترا سانتریفیوژ در اکثر مراکز تحقیقاتی و دانشگاهی در ایران، در این مطالعه، روش جدیدی برای جداسازی OMVs باکتری *بردتلا پرتوسیس* ارائه شد. این روش شامل یک سری مراحل ساده با بازدهی بالا است که با استفاده از سانتریفیوژ با دور بالا امکان پذیر می‌باشد. شکل ۲، طبیعی بودن شکل فضایی وزیکول‌ها و همسان بودن وزیکول‌های استخراج شده را در مقایسه با مطالعات پیشین تایید می‌کند. به‌طوری‌که اندازه وزیکول‌ها ۴۰-۲۰۰ نانومتر است که با نتایج به‌دست آمده از جداسازی وزیکول با روش اولتراسانتریفیوژ مطابقت دارد (۱۶، ۱۲).

نتیجه‌گیری

همچنین نتایج SDS-PAGE و وسترن با استفاده از آنتی‌بادی‌های مونوکلونال نشان می‌دهد که وزیکول‌های جدا شده به روش جدید مشابه روش رایج قبلی و حاوی ایمونوژن‌های مهم پرتوسیس توکسین، پرتاکتین و فیلامنتوس هماگلوتنین است که می‌تواند باعث القاء سیستم ایمنی میزبان شود. استخراج به روش مذکور چهار بار تکرار شد و شباهت از نظر ریخت‌شناسی، اندازه و حضور آنتی‌ژن‌ها در همه موارد مشاهده شده است. همچنین بی‌زیانی استفاده از وزیکول‌های به‌دست آمده با منفی شدن آزمون تب‌زایی و سمیت غیر طبیعی بیانگر عدم آلودگی نمونه با ناخالصی‌ها و عوامل تب‌زا طی فرایند استخراج می‌باشد. لذا استفاده از آن را در مطالعات بالینی در مدل حیوانی امکان‌پذیر می‌سازد. با توجه به این که این روش علاوه بر محصولی مشابه نسبت به روش‌های قبلی، از

www.SID.ir

Archive of SID

نظر امکانات و بعد اقتصادی نسبت به روش رایج مزایای مثبتی دارد، می‌تواند زمینه‌ساز جداسازی وزیکول‌ها در سطح وسیع و بدون نیاز به دستگاه اولتراسانتریفیوژ باشد. به‌طوری‌که OMVs سویه واکسینال *برد‌تلا پرتوسیس* به‌عنوان کاندیدای نسل جدیدی از واکسن پرتوسیس به تنهایی یا در ترکیب با ادجوانت‌ها جهت طراحی واکسن‌های آسلولار در آینده مطرح است.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله، از تمامی کسانی که نویسندگان را در این مقاله یاری کرده‌اند، قدردانی می‌شود.

تعارض در منافع

در انجام مطالعهٔ حاضر، نویسندگان هیچ‌گونه تضاد منافعی نداشته‌اند.

Referance

1. Kerr J, Matthews R. Bordetella pertussis infection: pathogenesis, diagnosis, management, and the role of protective immunity. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 2000;19(2):77-88. [DOI:10.1007/s100960050435] [PMID]
2. Edwards KM. Overview of pertussis: focus on epidemiology, sources of infection, and long term protection after infant vaccination. The Pediatric Infectious Disease Journal. 2005;24(6): 104-8. [DOI:10.1097/01.inf.0000166154.47013.47] [PMID]
3. Warfel JM, Edwards KM. Pertussis vaccines and the challenge of inducing durable immunity. Current Opinion in Immunology. 2015;35:48-54. [DOI:10.1016/j.coi.2015.05.008] [PMID]
4. Willems RJ, Mooi FR. From whole cell to acellular pertussis vaccines. Reviews in Medical Microbiology. 1996;7(1):13-22. [DOI:10.1097/00013542-199601000-00002]
5. Lugauer S, Heininger U, Cherry JD, Stehr K. Long-term clinical effectiveness of an acellular pertussis component vaccine and a whole cell pertussis component vaccine. European Journal of Pediatrics. 2002;161(3):142-6. [DOI:10.1007/s00431-001-0893-5] [PMID]
6. Denoël P, Godfroid F, Guiso N, Hallander H, Poolman J. Comparison of acellular pertussis vaccines-induced immunity against infection due to Bordetellapertussis variant isolates in a mouse model. Vaccine. 2005;23(46-47):5333-41. [DOI:10.1016/j.vaccine.2005.06.021] [PMID]
7. Mooi FR, He Q, Guiso N. Phylogeny, evolution, and epidemiology of Bordetellae. Bordetella Molecular Microbiology. 2007:17-45.
8. Sealey KL, Belcher T, Preston A. Bordetella pertussis epidemiology and evolution in the light of pertussis resurgence. Infection, Genetics and Evolution. 2016;40:136-43. [DOI:10.1016/j.meegid.2016.02.032] [PMID]
9. Safarchi A, Octavia S, Nikbin VS, Lotfi MN, Zahraei SM, Tay CY, et al. Genomic epidemiology of Iranian Bordetella pertussis: 50 years after the implementation of whole cell vaccine. Emerging Microbes & Infections. 2019;8(1):1416-27. [DOI:10.1080/22221751.2019.1665479] [PMID] [PMCID]
10. Mooi F, Van Der Maas N, De Melker H. Pertussis resurgence: waning immunity and pathogen adaptation-two sides of the same coin. Epidemiology and Infection. 2014;142(04):685-94. [DOI:10.1017/S0950268813000071] [PMID]
11. Mooi FR, Van Loo I, Gent Mv, He Q, Bart MJ, Heuvelman KJ, et al. Bordetella pertussis strains with increased toxin production associated with pertussis resurgence. Emerging Infectious Diseases. 2009;15(8):1206-13. [DOI:10.3201/eid1508.081511] [PMID] [PMCID]
12. Roberts R, Moreno G, Bottero D, Gaillard ME, Fingermann M, Graieb A, et al. Outer membrane vesicles as acellular vaccine against pertussis. Vaccine. 2008;26(36):4639-46. [DOI:10.1016/j.vaccine.2008.07.004] [PMID]
13. Ünal CM, Schaar V, Riesbeck K. Bacterial outer membrane vesicles in disease and preventive medicine. Seminars in Immunopathology. 2011;33(5):395-408. [DOI:10.1007/s00281-010-0231-y] [PMID]
14. Fernández S, Fajardo EM, Mandiarote A, Padrón MA, Acosta M, Cabrera RA, et al. A proteoliposome formulation derived from Bordetella pertussis induces protection in two murine challenge models. BMC Immunology. 2013;14(1):1-4. [DOI:10.1186/1471-2172-14-S1-S8] [PMID] [PMCID]
15. Kulp A, Kuehn MJ. Biological functions and biogenesis of secreted bacterial outer membrane vesicles. Annual Review of Microbiology. 2010;64:163-84. [DOI:10.1146/annurev.micro.091208.073413] [PMID] [PMCID]
16. Hozbor D, Rodriguez M, Fernandez J, Lagares A, Guiso N, Yantorno OJC. Release of outer membrane vesicles from Bordetella pertussis. Current Microbiology. 1999;38(5):273-8. [DOI:10.1007/PL00006801] [PMID]
17. Stainer D, Scholte M. A simple chemically defined medium for the production of phase I Bordetella pertussis. Microbiology. 1970;63(2):211-20. [DOI:10.1099/00221287-63-2-211] [PMID]

www.SID.ir

18. Ormazábal M, Bartel E, Gaillard ME, Bottero D, Errea A, Zurita ME, et al. Characterization of the key antigenic components of pertussis vaccine based on outer membrane vesicles. Vaccine. 2014;32(46):6084-90. [DOI:10.1016/j.vaccine.2014.08.084] [PMID]
19. Ernst O, Zor T. Linearization of the Bradford protein assay. Journal of Visualized Experiment. 2010;38:1-6. [DOI:10.3791/1918] [PMID] [PMCID]
20. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 1970;227:680-5. [DOI:10.1038/227680a0] [PMID]
21. Pereira A, Pietro Pereira AS, Silva CL, de Melo Rocha G, Lebrun I, Sant'Anna OA, et al. Antibody response from whole-cell pertussis vaccine immunized Brazilian children against different strains of Bordetella pertussis. Am J Trop Med Hyg. 2010;82(4):678-82. [DOI:10.4269/ajtmh.2010.09-0486] [PMID] [PMCID]
22. Vipond C, Findlay L, Feavers I, Care R. Limitations of the rabbit pyrogen test for assessing meningococcal OMV based vaccines. ALTEX-Alternatives to Animal Experimentation. 2016;33(1):47-53. [DOI:10.14573/altex.1509291] [PMID]
23. Wilk MM, Borkner L, Misiak A, Curham L, Allen AC, Mills KH. Immunization with whole cell but not acellular pertussis vaccines primes CD4 TRM cells that sustain protective immunity against nasal colonization with Bordetella pertussis. Emerging microbes and infections. 2019;8(1):169-85. [DOI:10.1080/22221751.2018.1564630] [PMID] [PMCID]
24. Locht C. Pertussis: acellular, whole-cell, new vaccines, what to choose? Expert review of vaccines. 2016;15(6):671-3. [DOI:10.1586/14760584.2016.1161511] [PMID]
25. Guiso N. Bordetella pertussis and pertussis vaccines. Clinical Infectious Diseases. 2009;49(10):1565-9. [DOI:10.1086/644733] [PMID]
26. Hozbor DF. Outer membrane vesicles: an attractive candidate for pertussis vaccines. Expert Review of Vaccines. 2017;16(3):193-6. [DOI:10.1080/14760584.2017.1276832] [PMID]
27. Zurita ME, Wilk MW, Carriquiriborde F, Bartel E, Moreno GN, Misiak A, et al. A pertussis outer membrane vesicle-based vaccine induces lung-resident memory CD4 T cells and protection against Bordetella pertussis, including pertactin deficient strains. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. 2019;9:125-31. [DOI:10.3389/fcimb.2019.00125] [PMID] [PMCID]
28. He Q, Mertsola J. Factors contributing to pertussis resurgence. Future Microbiology. 2008;3(3):329-39. [DOI:10.2217/17460913.3.3.329] [PMID]
29. Tsang RS, Shuel M, Jamieson FB, Drews S, Hoang L, Horsman G, et al. Pertactin-negative Bordetella pertussis strains in Canada: characterization of a dozen isolates based on a survey of 224 samples collected in different parts of the country over the last 20 years. International Journal of Infectious Diseases. 2014;28:65-9. [DOI:10.1016/j.ijid.2014.08.002] [PMID]
30. Safarchi A, Octavia S, Luu LDW, Tay CY, Sintchenko V, Wood N, et al. Pertactin negative Bordetella pertussis demonstrates higher fitness under vaccine selection pressure in a mixed infection model. Vaccine. 2015;33(46):6277-81. [DOI:10.1016/j.vaccine.2015.09.064] [PMID]
31. Martin SW, Pawloski L, Williams M, Weening K, DeBolt C, Qin X, et al. Pertactin-negative Bordetella pertussis strains: evidence for a possible selective advantage. Clinical Infectious Diseases. 2014;60(2):23-7. [DOI:10.1093/cid/ciu788] [PMID]
32. Raeven RH, Brummelman J, Pennings JL, Van Der Maas L, Tilstra W, Helm K, et al. Bordetella pertussis outer membrane vesicle vaccine confers equal efficacy in mice with milder inflammatory responses compared to a whole-cell vaccine. Scientific Reports. 2016;6:1-8. [DOI:10.1038/srep38240] [PMID] [PMCID]
33. Gaillard ME, Bottero D, Errea A, Ormazábal M, Zurita ME, Moreno G, et al. Acellular pertussis vaccine based on outer membrane vesicles capable of conferring both long-lasting immunity and protection against different strain genotypes. Vaccine. 2014;32(8):931-7. [DOI:10.1016/j.vaccine.2013.12.048] [PMID]
34. Bai X, Findlow J, Borrow R. Recombinant protein meningococcal serogroup B vaccine combined with outer membrane vesicles. Expert Opinion on Biological Therapy. 2011;11(7):969-85. [DOI:10.1517/14712598.2011.585965] [PMID]

www.SID.ir