زیست فناوری دانشگاه تربیت مدرس
دوره 8، شماره 1، بهار و تابستان 1396

تخلیص پرتوسیس توکسین از سویه واکسینال 509 سیاه‌سرفه و زیست سنجی آن بر اساس آزمایش CHO-Cell

حمیدرضا گودرزی[1]، علی نظری شیروان[2*]، مجتبی نوفلی[3]، علی رضایی مکرم[5]، مجتبی سعادتی[5]

1- استادیار آزمایشگاه مرکزی، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج
2- استادیار بخش پروتئومیکس- بیوشیمی، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج
3- استادیار بخش تولید واکسن‌های باکتریایی انسانی، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج
4- استادیار معاونت تضمین کیفیت، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج
5- استاد مرکز تحقیقات زیست شناسی دانشگاه جامع امام حسین (ع)، تهران

*** کرج، صندوق پستی 3197619751**
anshirvan@gmail.com
(دریافت مقاله: 94/9/23 پذیرش مقاله: 95/2/21)

چکیده- پرتوسیس توکسین مهمترین عامل ویرولانس باکتری *Bordetella pertussis* است که از نوع اگزوتوکسین‌های پروتئینی AB_5 می‌باشد و آنتی ژن محوری در ساخت واکسن‌های غیر سلولی سیاه‌سرفه است. به دلیل ملاحظات اقتصادی روش‌های تخلیص پرتوسیس توکسین بطور کامل منتشر نشده است. هدف از این تحقیق، راه‌اندازی و اصلاح روش تخلیص پرتوسیس توکسین از مایع رویی کشت باکتری و زیست‌سنجی آن توسط آزمون CHO-cell بود. سویه واکسینال 509 *B. pertussis* و سلول CHO از مؤسسه رازی تهیه گردید. کشت باکتری در فرمانتور 300 لیتری در دمای 35 درجه سانتی‌گراد و در محیط B2 به مدت 44 ساعت صورت پذیرفت. سپس مایع رویی جداسازی گردیده و به ترتیب با فیلتر 0/45 میکرومتر تصفیه گردید و سپس با دستگاه اولترافیلتراسیون (cut off 10 kDa) تغلیظ شد. تخلیص توکسین توسط کروماتوگرافی میل ترکیبی با فتوئین سفاروز انجام گردید. پس از اعمال توکسین تخلیص شده بر منولایر سلولی CHO، فرایند خوشه‌ای شدن سلول‌ها از ساعت نخست پدیدار گردید و در مشاهدات ساعت دوازدهم به بعد متوقف شد. میزان توکسین تخلیص شده 0/43 IU/ml ±53/2 محاسبه گردید. طی تولید واکسن‌های سلولی، پس از جداسازی جرم سلولی، فاز مایع دور ریخته می‌شود، حال آنکه نتایج بررسی حاضر نشان داد این فاز محتوی مقادیر قابل توجه توکسین می‌باشد. با توجه به آنکه استحصال پرتوسیس توکسین، رکن اصلی در توسعه و ساخت واکسن‌های نوین غیر سلولی است لذا تحقیقات تکمیلی در خصوص استفاده از سایر سویه‌ها و بررسی شرایط مختلف کشت باکتری پیشنهاد می‌شود.

کلیدواژگان: سیاه‌سرفه، *Bordetella pertussis*، پرتوسیس توکسین، کروماتوگرافی میل ترکیبی، CHO-cell test.

1- مقدمه

سیاه سرفه[1] بیماری عفونی واگیر دستگاه تنفسی خصوصاً در میان کودکان است. عامل این بیماری عفونی در انسان *Bordetella pertussis* یک کوکوباسیل گرم منفی کوچک (طول 1 تا 0/5 و عرض 0/3 تا 0/2 میکرون)، هوازی مطلق، دارای چند شکلی (پلئومورفیک) و بصورت‌های منفرد، دوتایی و یا در زنجیره‌های کوتاه است [1]. مهمترین عامل ویرولانس باکتری *B. pertussis* یک اگزوتوکسین پیچیده به وزن 105 کیلو دالتون با نام پرتوسیس توکسین[2] می‌باشد که توسط سویه‌های حاد *B. pertussis* به محیط خارج سلولی ترشح می‌گردد [2]. در بین گونه‌های جنس *Bordetella*، تنها *B. pertussis* به‌واسطه بیان ژن‌های مربوط به آن موسوم به ptx یا tox قادر به تولید پرتوسیس توکسین است. اگرچه نظیر این ژن در گونه‌های دیگر از جمله *B. parapertussis* و *B. bronchiseptica* وجود دارد، با این‌حال در مرحله نسخه‌برداری به علت وقوع موتاسیون‌های چندگانه[3] به شکل خاموش باقی مانده‌اند. پرتوسیس توکسین خالص از 5 زیر واحد به ترتیب S_1-S_5 تشکیل شده است. هریک از ژن‌های مربوط به زیر واحدها یک توالی مشخص از اسیدهای آمینه را کد می‌نماید که در هدایت زنجیره پلی پپتیدی همان زیر واحد به سمت فضای پریپلاسمیک[4]، دخالت دارند [3]. پرتوسیس توکسین که در حقیقت جزء اصلی همه واکسن‌های غیر سلولی است عضو خانواده توکسین‌های دو جزئی AB_5 با فعالیت ADP - ریبوزیل ترانسفری می‌باشد. زیر واحد 26 کیلو دالتونی S_1 جزء فعال توکسین را تشکیل می‌دهد، در حالی‌که وظیفه زیر واحدهای S_2-S_5 اتصال مولکول کامل توکسین به سطح سلول‌های هدف می‌باشد. آنتی‌بادی‌های ضد اجزاء پرتوسیس توکسین از کلونیزاسیون باکتری بر روی سلول‌های مژک‌دار جلوگیری نموده و سبب ایجاد محافظت چشمگیر در برابر عفونت می‌گردد [4].

واکسن‌های غیر سلولی سیاه‌سرفه از طریق خالص‌سازی و غیر فعال کردن آنتی‌ژن‌های انتخابی از بین عوامل ویرولانس *B. pertussis* تهیه می‌شوند. محققان تلاش نموده‌اند برای کاهش واکنش‌های نامطلوب به کمترین حد ممکن، تعداد آنتی‌ژن‌های واکسن‌ها را کاهش داده و قدرت محافظتی آنها را در برابر بیماری افزایش دهند. با توجه به آنکه پرتوسیس توکسین در ایجاد بیماری نقش اساسی دارد، لذا همه واکسن‌های غیرسلولی حاوی پرتوسیس توکسین (PT) می‌باشند. به همین علت تخلیص پرتوسیس توکسین به میزان مطلوب و سنجش عملکرد آن در توسعه تولید واکسن‌های غیر سلولی سیاه‌سرفه بسیار حائز اهمیت است [5].

آزمون سلول تخمدان‌هامستر چینی[5] یک آزمایش برون تن[6] مورد توصیه سازمان بهداشت جهانی است که برای ارزیابی فعالیت و سنجش کمی پرتوسیس توکسین (PT) دارای کارایی است. همچنین به عنوان روشی برای تشخیص سریع و افتراقی سیاه‌سرفه از سایرعفونت‌های مجاری تنفسی با کشت ترشحات نازوفارنکس[7] کاربرد دارد [6].

تولید واکسن سلولی سیاه‌سرفه در مؤسسه رازی با استفاده از سویه‌های واکسینال 509 و 134 صورت می‌گیرد. در مطالعه حاضر با رویکرد توسعه واکسن‌های غیر سلولی سیاه‌سرفه در کشور مبادرت به تخلیص پرتوسیس توکسین از کشت فرمانتوری *B. pertussis* گردید. با توجه به هم‌زمانی برنامه تولید واکسن‌های سلولی سیاه‌سرفه توسط بخش تولید واکسن‌های باکتریایی انسانی مؤسسه رازی مبنی بر کشت سویه 509 با بازه

[1] Whooping cough
[2] Pertussis toxin (PT)
[3] Multiple mutations
[4] Periplasmic space
[5] Chinese Hamster Ovary cell; CHO-cell
[6] *In vitro*
[7] Nasopharynx

زمانی تحقیق حاضر، از سویه مذکور در فرایند تخلیص پرتوسیس توکسین استفاده گردید. مبنای خالص سازی توکسین بر کروماتوگرافی میل ترکیبی[1] قرار داشت و برای ارزیابی کمی و کیفی توکسین تخلیص شده از ایمونو دات بلات و آزمون CHO-cell استفاده گردید. روش اخیر، آزمون اختصاصی برای سنجش زیستی پرتوسیس توکسین در فرایند تولید واکسن غیر سلولی سیاه‌سرفه است که اخیراً از سوی سازمان بهداشت جهانی توصیه شده است [7].

2- مواد و روش‌ها

سویه واکسینال *B. pertussis* 509 و مواد و ملزومات کشت فرمانتوری، تصفیه و تغلیظ مایع کشت باکتری توسط بخش تولید واکسن‌های باکتریایی انسانی مؤسسه رازی تأمین گردید. سلول CHO از بانک ژن و سلول مؤسسه رازی تهیه شد. پرتوسیس توکسین استاندارد و Polyclonal Anti PT (IgG)تهیه شده از موش با کد JNIH-12 از NIBSC و فتوئین سفاروز از سیگما خریداری گردید. محیط کشت سلولی RPMI 1640، پنی سیلین - استرپتومایسین، FBS از شرکت Gibco و Merck تهیه شد.

2-1- کشت فرمانتوری میکرو ارگانیسم و تغلیظ نمونه

سویه واکسینال *B. pertussis* 509 (فریز شده) پس از احیا به 200 سی سی محیط Verwey اضافه شد و به مدت 48 ساعت در شیکر انکوباتور با دمای 35 درجه قرار گرفت، سپس کشت بدست آمده در 5 لیتر از همین محیط پاساژ داده شد و بمدت 24 ساعت با شرایط قبل انکوبه گردید. در مرحله بعد کشت حاصل به فرمانتور 300 لیتری حاوی محیط B2 اضافه شد (محیط کشت‌های نامبرده توسط بخش تولید واکسن‌های باکتریایی مؤسسه رازی تهیه گردید). مدت فرمانتاسیون 44 ساعت در دمای 35 درجه سانتی‌گراد بود که پس از قرائت OD=1.1، در یک سیکل بسته مبادرت به برداشت محصول از فرمانتور و تفکیک فاز مایع از سوسپانسیون سلولی توسط سیستم جدا ساز[2] گردید. نهایتاً حدود 30 لیتر سوسپانسیون غلیظ حاوی باکتری و مابقی بصورت مایع خروجی بدست آمد. فاز مایع جهت تصفیه و تغلیظ و استحصال پرتوسیس توکسین مورد استفاده قرار گرفت. در هر مرحله 100 لیتر از محلول ابتدا از فیلتر 0/45 میکرو متر عبور داده و سپس با سیستم اولترا فیلترراسیون (cut off 10 kDa) تا 10 برابر تغلیظ گردید.

2-2- تخلیص پرتوسیس توکسین (کروماتوگرافی میل ترکیبی)

در هر مرحله یک لیتر از نمونه تغلیظ شده با 50 میلی‌لیتر ژل فتوئین سفاروز مخلوط شده و به مدت 3 ساعت روی شیکر قرار گرفت و سپس ستون 1/5 × 35 سانتی‌متر با آن پک گردید. در مرحله بعد برای جداسازی اجزای غیر از PT توسط محلول TBS + urea 2M + Nacl1M PH 7.5 به شستشوی ستون مبادرت گردید. شستشوی پرتوسیس توکسین باند شده به ژل توسط محلول diethanol amine 50mM + Nacl 0.5M PH 11.5 با سرعت 30 میلی‌لیتر در ساعت (در هر لوله 5 میلی‌لیتر) انجام شد و خروجی ستون با دستگاه فرکشن کالکتور جمع آوری و سپس جذب آنها در طول موج 280 نانومتر قرائت گردید. فراکسیون‌ها در این مرحله دارای pH 11.4 بودند که بلافاصله توسط محلول Tris-Hcl 1M PH 7.5 به pH خنثی رسانده شد. فراکسیون‌های جمع آوری شده در دو مرحله در مقابل محلول‌هایTBS + Nacl 0.5 M PH 7.5 و سپس Sorenson Buffer (K2HPO4 10mM + NaCl 0.5 M PH 7.5) دیالیز شدند. فراورده نهایی برای ارزیابی

[1] Affinity chromatography

[2] Separator

پرتوسیس توکسین در 4 درجه نگهداری شد [8].

2-3- آزمایش دات بلات

به منظور احراز وجود پرتوسیس توکسین در نمونه تغلیظ شده و نیز بررسی اولیه پرنوسیس توکسین تخلیص شده در فرایند کروماتوگرافی، آزمایش دات بلات انجام شد. در این مرحله نمونه پرتوسیس توکسین استاندارد، سوپرناتانت تغلیظ شده، PT تخلیص شده و آنتی PT را هریک به میزان 10 میکرولیتر بر غشاء نیترو سلولوز نشانده و از BSA به عنوان بلاکر استفاده گردید [9].

2-4- آماده‌سازی و کشت سلول CHO

برای تهیه محیط کشت کامل به میزان 1 درصد پنی‌سیلین-استرپتومایسین و 10 درصد سرم FBS به محیط RPMI 1640 اضافه می‌شد. سلول‌های CHO پس از احیا به فالکون 25 میلی‌لیتری انتقال یافته و 4 میلی‌لیتر محیط کشت بدون سرم به آن اضافه گردیده و در شرایط 1500 rpm به مدت 10 دقیقه سانتریفوژ شد. پس از دور ریختن سوپرناتانت مجدداً 1 میلی‌لیتر محیط کشت RPMI 1640 بدون سرم اضافه نموده و به فلاسک کشت سلول فیلتردار انتقال می‌یافت و با محیط کشت کامل (حاوی FBS و آنتی‌بیوتیک) به حجم 10 ml رسانده می‌شد. فلاسک کشت سلول به انکوباتور CO2 دار با شرایط 95% رطوبت و CO2 5% انتقال یافته و پس از مدت حد اکثر 48 ساعت منولایر سلولی توسط میکروسکوپ اینورت مشاهده می‌گردید. برای جداسازی سلول‌های باند شده به کف فلاسک از تریپسین EDTA استفاده گردید. پس از شمارش سلول‌ها، به هر چاهک از پلیت 96 خانه مسطح میزان 30000 سلول در حجم 200 میکرولیتر محیط کشت کامل اضافه گردید. پلیت‌ها جهت تشکیل منولایر سلولی به انکوباتور CO2 دار با شرایط ذکر شده فوق انتقال یافتند تا پس از آن اعمال رقت‌های مختلف از توکسین‌ها روی آنها صورت پذیرد [10]. رقیق‌ترین مقدار از نمونه مورد آزمایش که خوشه ای شدن را نشان می‌دهد با انجام محاسبات بیانگر تیتر آن نمونه است. دز آغازین برای پرتوسیس توکسین استاندارد بر مبنای دستورالعمل WHO مقدار 6/72 IU/ml (هر دز در 25 میکرولیتر محیط RPMI 1640) تهیه گردید. از محلول نمونه تخلیص شده نیز میزان 25 میکرولیتر برای دز شروع[1] استفاده شد. رقت‌های پرتوسیس توکسین استاندارد و نمونه تخلیص شده از چپ به راست بر مبنای 1/2 ، 1/4، 1/8 ... 1/1024 برای اعمال به منولایر سلولی تهیه گردید. همچنین از سوسپانسیون فاز I باکتری به عنوان کنترل مثبت و از سرم فیزیولوژی برای کنترل منفی هر یک در دو چاهک اعمال گردید. آزمایش CHO-cell پانزده بار انجام شد که هر بار در سه روز کاری پی در پی صورت گرفت. مشاهده پلیت‌ها و ثبت نتایج تحت میکروسکوپ اینورت[2] پس از ساعت‌های 1، 3، 6 ، 12و 24 صورت گرفت. برای محاسبه میزان واحد بین المللی PT رقیق ترین دز منجر به عکس العمل خوشه‌ای شدن (endpoint)، مقدار رقت آغازین پرتوسیس توکسین را در فاکتور رقت چاهک endpoint ضرب کرده و مقدار IU/ml برای PT استاندارد بدست آمد. مقدار PT موجود در نمونه تخلیص شده از طریق حاصل ضرب معکوس فاکتور رقت endpoint نمونه در مقدار IU محاسبه شده endpoint استاندارد محاسبه گردید [11].

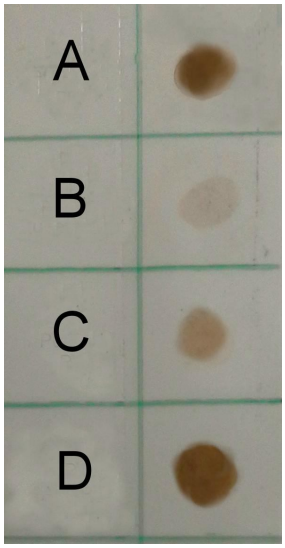
3- نتایج و بحث

نتایج آزمایش ایمونو دات بلات علاوه بر اینکه حاکی از صحت عملکرد PT استاندارد وAnti-PT می‌باشد، مشخص نمود که پرتوسیس توکسین در نمونه سوپرناتانت تغلیظ شده و خروجی فرایند تخلیص قابل

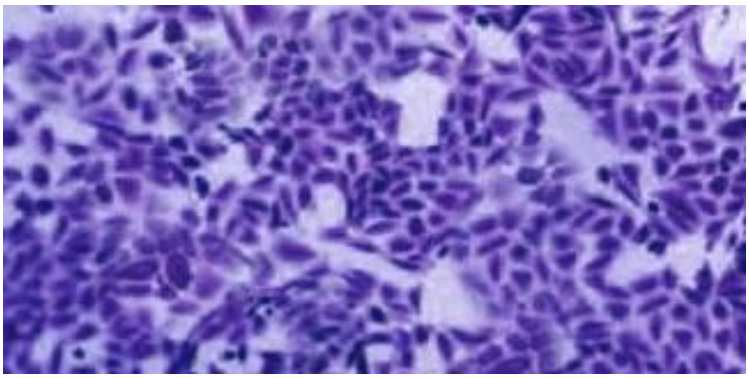
[1] Starting dose
[2] Invert microscope

مشاهده و ردیابی است (شکل 1). نتایج بدست آمده بر مبنای مشاهده خوشه ای شدن سلول‌های CHO با علامت (-) برای موارد بی تغییر ماندن منولایر سلولی (شکل 2) و علامت (+) برای خوشه ای شدن سلولها (شکل 3) در جدول 1 ثبت شده است (جدول یک مربوط به مد نتایج آزمایش‌های انجام شده می‌باشد). (شکل‌های 2 و3 تحت میکروسکوپ اینورت با بزرگ‌نمایی 10×10 تهیه شد). خوشه‌ای شدن سلول‌ها پس از اعمال توکسین استاندارد و نمونه پرتوسیس توکسین تخلیص شده بر منولایر سلولی CHO-cell از ساعت نخست پدیدار گردید و در مشاهدات ساعت دوازدهم به بعد بی تغییر مانده و متوقف شد. بطور متوسط SD IU/ml0/43 ± 2/538 برای نمونه پرتوسیس توکسین تخلیص شده طی 15 بار آزمایش بدست آمد.

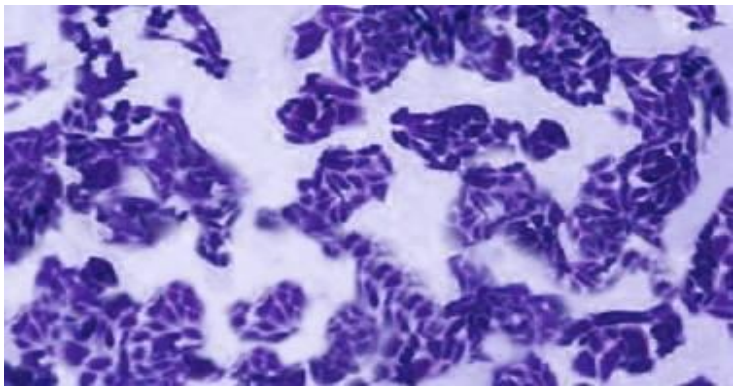
با توجه به اهمیت اقتصادی تولید واکسن آسلولار سیاه‌سرفه روش‌های تهیه و تخلیص آنتی‌ژن‌های مورد نیاز بطور کامل منتشر نگردیده است.



شکل 1 نتایج آزمایش دات بلات:
A: standard PT, B: concentrated supernatant, C: purified PT, D: anti-PT



شکل 2 منولایر سلول‌های CHO



شکل 3 سلول‌های خوشه‌ای شده CHO تحت تأثیر پرتوسیس توکسین

جدول 1 جدول شماتیک پلیت 96 خانه و مد نتایج حاصل از کاربرد رقت‌های مختلف توکسین استاندارد و نمونه مورد آزمایش

A and B: Reference PT from NIBSC (Duplicate), B and C: Purified PT from *Bordetella pertussis* strain 509 (Duplicate), E1-2: control negative (saline), F1-2: control positive (Phase I of *B. pertussis* culture)

	Dilution Factor 1	1/2 2	1/4 3	1/8 4	1/16 5	1/32 6	1/64 7	1/128 8	1/256 9	1/512 10	1/1024 11
A	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
B	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
C	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
D	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
E	-	-									
F	+	+									

در این خصوص بطور عمده دو روش کروماتوگرافی میل ترکیبی از سویه 10536 توسط Pele Chong و همکاران و نیز روش کروماتوگرافی تعویض یونی[12] از سویه Tohama توسط Erkan Özcengiz و همکاران مبنای تخلیص پرتوسیس توکسین بوده است [12]. در روش اخیر در دو مرحله مبادرت به تخلیص پرتوسیس توکسین و هماگلوتینین رشته‌ای[13] شده است، Francoise Megret و JosephE Alouf در انستیتو پاستور فرانسه از سویه واکسینال 509 با روش کروماتوگرافی میل ترکیبی و استفاده از هپارین سفاروز مبادرت به تخلیص پرتوسیس توکسین نمودند [13]. در روش کروماتوگرافی میل ترکیبی اختصاصاً پرتوسیس توکسین تخلیص می‌شود، لذا این روش در مطالعه حاضر مورد چالش و انطباق با شرایط موجود قرار گرفت. در فرایند آزمایش CHO-cell با توجه به درجه‌ای از آزادی عمل که دستورالعمل سازمان بهداشت جهانی قائل به آن می‌باشد، مبادرت به اعمال رقت‌های مختلف پرتوسیس توکسین استاندارد و نمونه تخلیص شده به منولایر سلولی CHO گردید. در معدودی از منابع، توکسین استاندارد و نمونه‌های آزمایشی اعم از توکسین استخراج شده، واکسن‌ها و یا نمونه‌های گرفته شده از بیماران به طور هم‌زمان با سلول‌های CHO به چاهک‌های پلیت اضافه می‌شود و بعد از 24 ساعت انکوباسیون مبادرت به ثبت مشاهدات می‌گرددکه در این روش خصوصاً در رقت‌های بالا و زمانی که دانسیته سلولی زیاد باشد، سلول‌ها فرصت جبران و رشد مجدد یافته و فضای ایجاد شده در اثر خوشه ای شدن را پر می‌کنند و بدین ترتیب تشخیص دقیق endpoint با چالش مواجه می‌شود. در این خصوص باید تفاوت وضعیت آزمایشگاه‌ها و مواد مصرفی و بطور کلی تطابق شرایط را نیز در نظر داشت. نهایتاً انجام تحقیقات بیشتر در خصوص استفاده از سایر سویه‌های *B. pertussis*، و مطالعه برای دستیابی به شرایط بهینه کشت فرمانتوری در جهت افزایش میزان توکسین ترشح شده توسط باکتری پیشنهاد می‌شود.

4- تشکر و قدردانی

این تحقیق با پشتیبانی بخش پروتئومیکس و بیوشیمی و نیز بخش تولید واکسن‌های باکتریایی مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی صورت پذیرفت. بدینوسیله همه عزیزان مؤثر در انجام این مطالعه قدردانی می‌گردد.

5- منابع

[1] Florence G.A. Versteegh, Schellekens J.F.P., Fleer A., Roord J.J. (2005) Pertussis: a concise review including diagnosis, incidence, clinical manifestations and the role of treatment and vaccination in management. Reviews in medical microbiology 16(3):79-89.

[2] A. Nicosia, Perugini M., Franzini C., Casagli M. C., Borri M. G., Antoni G. (1986) Cloning and Sequencing of the Pertussis toxin gene:

[12] Ion exchange chromatography
[13] Filamentous haemaglutinin (FHA)

operon structure and gene duplication. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:4631-4635.

[3] C. Locht, Keith JM. (1986) Pertussis toxin gene: nucleotide sequence and genetic organization. Science. 232: 1258-1264.

[4] Jeffrey A. Melvin, Erich V. Scheller, Jeff F. Miller and Peggy A. (2014) Cotter *Bordetella pertussis* pathogenesis: current and future challenges. Macmillan Publishers Limited. Volume 12.

[5] Granstrom M. (2011) The History of pertussis vaccination: From whole- cell to subunit vaccines. History of vaccine development. In: Plotkin SA, editor: Springer New York pp: 73-89.

[6] S. A. Halprini, Bortolussi R., Kasina A., Wort A.J. (1990) Use of a Chinese hamster ovary cell cytotoxicity assay for the rapid diagnosis of pertussis. J Clin Microbiol. 28(1): 32–38.

[7] World Health Organization (2013) Manual for quality control of Diphtheria, Tetanus and Pertussis vaccine. Printed by the WHO Document Production Services, Geneva, Switzerland.

[8] Pelec Hong, Michelk Lein (1988) Single-step purification of pertussis toxin and its subunits by heat-treated fetuin-Sepharose affinity chromatography. BIOCHEM. Cell Biol. VOL. 67.

[9] Protein Blotting Applications Guide (1997) Technical Protocol TP001, Millipore Corporation, Bedford, Massachusetts, USA.

[10] P. Gillenius, Jaatmaa E., Askelof P., Granstrom M., Tiru M. (1985) the standardization of an assay for pertussis toxin and antitoxin in microplate culture of Chinese hamster ovary cells. *J Biol. Stand*. 13, 61-66.

[11] D. Xing, R. Gaines Das, P. Newland and M. Corbel. (2002) Comparison of the bioactivity of reference preparation for assaying Bordetella pertussis toxin activity in vaccines by the histamine sensitisation and Chinese hamster ovary-cell tests: assessment of validity of expression of activity in terms ofprotein concentration. Vaccine, (20)3535-3542.

[12] Erkan Özcengiz, Kamer Kilinç, Özlem Büyüktanir, Ayfer Günalp (2004) Rapid purification of pertussis toxin (PT) and filamentous hemagglutinin (FHA) by cation-exchange chromatography. Vaccine (22) 1570–1575.

[13] Francoise Megret, Joseph E Alouf. (1988) A simple novel approach for the purification of pertussis toxin. FEMS microbiology Letter (51): 159-162.