

## PENGARUH pH ELUEN TERHADAP HASIL DESALTING *CRUDE PERTUSSIS TOXIN* (PT) DAN *FILAMENTOUS HEMAGGLUTININ* (FHA) DARI *Bordetella pertussis*

FARIS ADRIANTO\*, ESTI HENDRADI\*, ISNAENI\*, NENI NURAINY\*\*

\*Lecturer at Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Airlangga University.

\*\* Staff PT. Biofarma, Bandung

farisadrianto@gmail.com

### ABSTRACT

Optimizing desalting crude process of PT and FHA using sephadex G-25 as intermediate purification phase for PT and FHA as acellular pertussis vaccine components has been developed. The factor influencing optimization including the impact of chemical factor such as elution buffer pH towards protein's concentrate were studied using 3 different pH (6, 7, and 8). The result were : Different Buffer pH has influence towards protein recoveries whereas phosphate buffer 50 mM pH 7.0 as elution buffer (with  $74,23 \pm 3,07$  % recoveries percentage) best for desalting crude PT and FHA.

**Keywords :** Desalting, Crude PT-FHA, Sephadex G-25, buffer pH, buffer concentration

### PENDAHULUAN

Pencegahan infeksi pada manusia dengan vaksinasi telah dilakukan selama lebih dari 2 abad. Upaya vaksinasi pada manusia dimulai pertama kali pada abad ke 18 sejak Edward Jenner berhasil menemukan vaksin *smallpox*. Vaksinasi adalah tindakan pencegahan penyakit infeksi dengan pemberian antigen imunogenik yang berasal dari permukaan agen yang infeksius, agar menghasilkan imunitas terhadap replikasi dan terjadinya infeksi oleh organisme asing (Mahon, 2001).

*Pertussis* (Batuk Rejan, *Whooping Cough*) adalah suatu infeksi akut pada saluran pernafasan bagian atas yang disebabkan oleh infeksi bakteri *Bordetella pertussis*. *Pertussis* ditandai dengan gejala batuk yang intensif, berat, bahkan disertai dengan lengkingan (*whoop*). Pada bayi usia di bawah 1 tahun, *pertussis* dapat berakibat fatal, dan seringkali berakhir dengan kematian. Vaksin *pertussis* pertama kali diberikan dalam bentuk *whole cell*. Kelemahan vaksin *whole cell* ini adalah memberikan reaksi lokal pada lokasi suntikan dan gejala demam pada bayi (Lewis *et al.*, 1986; Noble *et al.*, 1987). Sebagai upaya dalam mengatasi gejala tersebut, dikembangkan suatu vaksin *pertussis* yang dinamakan vaksin *acellular*, yang berisi komponen dari bakteri *Bordetella pertussis* dan bukan bakteri utuh. Vaksin *acellular pertussis* berisi komponen *Pertussis Toxin* (PT) yang ada dalam bakteri *B. pertussis* dan dapat mengandung salah satu atau gabungan komponen lain seperti *filamentous*

*hemagglutinin* (FHA), pertactin (PN), dan fimbriae (FIM) tipe 2 dan 3. *Pertussis toxin* dan *Filamentous hemagglutinin* merupakan protein ekstraselular yang diproduksi oleh *Bordetella pertussis*. *Pertussis toxin* adalah protein globular dengan berat molekul 117.000 Da. *Pertussis toxin* mempunyai berbagai aktivitas biologis dan tersusun atas 5 subunit protein yang disebut dengan S1, S2, S3, S4, dan S5 (Tamura *et al.*, 1982). *Filamentous hemagglutinin*, suatu protein dengan berat molekul 220.000 Da, merupakan protein *filamentous* yang bersifat nontoksik. *Pertussis toxin* dan *Filamentous hemagglutinin* berperan dalam perlekatan sel bakteri pada permukaan sel target dan bersifat sebagai *protective antigen* yang melindungi bakteri dari reaksi imunitas tubuh (Kerr and Matthews, 2000).

Pada masa 1990-2000 berbagai studi telah dilakukan untuk melakukan isolasi dan purifikasi PT dan FHA dari *Bordetella pertussis*. Beberapa cara isolasi PT dan FHA melibatkan kombinasi *hydroxylapatite chromatography*, *haptoglobin-affinity chromatography*, dan *gel filtration chromatography* (Sato *et al.*, 1993); *affi-Gel Blue* dan *fetuin-affinity chromatography* (Sekura *et al.*, 1993); *Blue-sepharose*, *phenyl sepharose*, dan *hydroxylapatite* (Svoboda *et al.*, 1996); dan *CM-sepharose CL-6B* (Erkan *et al.*, 2003).

Secara umum, proses purifikasi PT dan FHA dari *Bordetella pertussis* tersebut melibatkan 3 (tiga) tahapan utama, yaitu *capturing*, *intermediate*

*purification*, dan *polishing*. *Capturing* adalah suatu proses penangkapan protein target dari isolat sehingga protein target dapat terpisah dari *critical contaminant* seperti protease dan glikosidase. Pada tahapan *intermediate purification*, protein target dapat dipisahkan dari sebagian besar *bulk impurities* seperti protein lain, asam nukleat, virus, dan endotoksin. Tahapan terakhir dari proses purifikasi adalah *polishing*. Pada tahapan ini, protein target sudah mendekati tahap murni karena sebagian besar kontaminan sudah terpisah.

*Desalting* adalah suatu tahapan pada proses *intermediate purification* dimana protein target akan dipisahkan dari molekul-molekul kecil yang menjadi kontaminan. Dalam proses *desalting*, metode yang biasa digunakan adalah *gel filtration chromatography* (Hagel, 1989). Dalam *gel filtration chromatography*, faktor-faktor fisika seperti panjang kolom, jenis resin, ukuran pori resin, *flow rate* eluasi, dan jumlah sampel yang dimasukkan akan lebih berpengaruh terhadap pemisahan protein dan kontaminannya bila dibandingkan dengan faktor-faktor kimia seperti kapasitas resin, pH eluasi, dan konsentrasi eluen (Harland, 2002).

Tujuan penelitian ini secara umum adalah untuk membuktikan apakah faktor kimia seperti pH buffer eluasi akan berpengaruh terhadap hasil purifikasi protein. Penelitian ini dapat digunakan sebagai dasar tahapan *polishing* PT dan FHA dari *Bordetella pertussis* untuk formulasi vaksin *acellular pertussis*.

## METODE PENELITIAN

### Alat:

Alat yang digunakan meliputi GE ÄKTApurifier UPC 900, Kolom GE XK 16, Resin Hydroxy Apatite (HA) Ultrogel<sup>®</sup>, Kolom GE HiTrap<sup>®</sup> Desalting 5 mL, *Sample Collector* Frac-950, Kolom Sepharose, Vertikal elektroforesis Mini-Protean<sup>®</sup>3 Cell BIO-RAD, Waterbath 95 °C, Varimix, Polystyrene *microtiter plate*, ELISA reader, Spektrofotometer Nanodrop 2000, dan seperangkat alat gelas yang digunakan di laboratorium.

### Bahan :

Isolat *Bordetella pertussis* Tahoma strain (hasil isolasi PT. BioFarma), NaOH 0.5 M, WFI,

Phosphate Buffer (PB) 50 mM pH 6, 7, dan 8. Phosphate Buffer (PB) 100 mM pH 6, 7, dan 8. Etanol 20%, seperangkat reagen SDS PAGE, B. pertussis PT anti serum (sheep), antibody FHA anti serum (sheep), antigen standar FHA (JNIH-4), anti FHA monoklonal (JNIH-11), washing buffer (0.05% Tween 80 dalam aquadest), dilution buffer (0.1% protifar dan 0.05% Tween 80 dalam PBS pH 7.2), blocking buffer (Protifar 0.05 gram dalam 50 mL PBS), standar Purified PT JNIH-5, anti-PT S1 subunit monoclonal antibody 10D6, Anti PT JNIH-12, anti mouse peroxidase conjugate, substrat TMB (Sodium acetate buffer pH 5.5 + TMB dalam etanol 96% + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 7.5 mL buffer asetat + 125 uL TMB/Etanol 96% + 1.5 uL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> .

### Metode :

#### D. Capturing PT dan FHA

Dilakukan proses capturing PT dan FHA. Sampel hasil capturing akan digunakan untuk proses desalting.

#### E. Desalting PT dan FHA

Kolom XK 16 yang telah terpacking dengan sephadex G-25 medium 25 mL dipasang ke sistem ÄKTApurifier UPC 900. Dialirkan larutan WFI sebanyak 4 CV dengan laju alir 0.5 mL/menit. Untuk stabilisasi kolom dialirkan larutan phosphate Buffer (PB) 50 mM pH 6.0 sebanyak 4 CV dengan laju alir 1 mL/menit untuk stabilisasi kolom. Inject sampel crude PT-FHA dengan menggunakan sample loop sebanyak 10% CV Dialirkan larutan phosphate Buffer (PB) 50 mM pH 6.0 sebanyak 4 CV dengan laju alir 1 mL/menit untuk eluasi. Fraksi yang menghasilkan peak ditampung, dan Diulangi dengan pH 7.0 dan 8.0. Dihitung konsentrasi protein pada tiap fraksi. Dihitung % recovery sampel.

#### F. Kuantitasi Protein

Disiapkan Spektrofotometer Nanodrop 2000 yang sudah dihubungkan dengan komputer. Dipipet 1.5 uL sampel fraksi dan diteteskan pada probe Nanodrop. Diukur absorbansi pada panjang gelombang 280 nm.

## G. SDS PAGE

Disiapkan sampel untuk analisis protein. Bila perlu sampel diencerkan dengan stok buffer. Disiapkan wadah untuk membuat campuran 50 uL  $\beta$ -mercaptoethanol dan 950 uL buffer sampel. Diencerkan sampel 1:2 dengan campuran  $\beta$ -mercaptoethanol dan buffer sampel. Dipanaskan 95 °C selama 4 menit. DIdiamkan selama beberapa menit sampai suhu sampel sama dengan suhu ruangan. Sampel siap dimasukkan dalam well gel. Sampel dimasukkan pada tiap-tiap well dengan pipet mikro secara hati-hati agar tidak terjadi overlapping sampel dan dilakukan elektroforesis pada arus tetap 40 A selama 60 menit.

## H. ELISA

Coat ELISA plate dengan 100 uL B. pertussis PT anti serum (sheep) lalu inkubasi satu malam pada suhu 2-8°C

B. pertussis PT anti serum (sheep) yang ada dalam plate dibuang. ELISA plate dicuci washing buffer sebanyak dua kali. Untuk tahapan pertama yang dilakukan adalah pengeblokan. Block ELISA plate dengan 100 uL blocking buffer, dan diinkubasi pada suhu 37°C. Setelah diinkubasi,

ELISA plate dicuci dengan washing buffer sebanyak dua kali.

Ditambahkan dilution buffer ke seluruh well kecuali awal sampel. Lalu ditambahkan 100 uL reference pada well A2,A3; tambahkan 100 uL sampel pada well A4 sampai dengan A12 dan diinkubasi 1 jam pada suhu 37°C. Setelah diinkubasi, ELISA plate dicuci dengan 200 uL washing buffer sebanyak 4 kali. Ditambahkan 100uL anti mouse anti PT pada semua well dan diinkubasi 1 jam pada suhu 37°C. ELISA plate dicuci dengan 200 uL washing buffer sebanyak 4 kali dan ditambahkan 100 uL anti mouse IgG HRPO pada semua well. Diinkubasi 1 jam pada suhu 37°C dicuci ELISA plate dengan 200 uL washing buffer sebanyak empat kali. Tambahkan 100 uL substrate TMB pada semua well dan dinkubasi 10 menit pada suhu 37°C di tempat gelap.

Reaksi dihentikan dengan penambahan 100 uL 2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pada setiap well. Damati perubahan warna dari kuning menjadi biru. Baca absorbansi pada 450 nm menggunakan ELISA reader.

Untuk FHA, tahapan ELISA yang dilakukan sama dengan mengganti coating antibody menggunakan B. pertussis FHA anti serum (sheep) dan antibodi mouse anti FHA.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### C. Capturing PT dan FHA

Data hasil *capturing* crude PT-FHA dari isolat *Bordetella pertussis* adalah terlampir sebagai berikut. Sampel hasil *capturing* ini akan dilakukan proses *desalting* untuk menghilangkan garam yang

ada di eluen dan kontaminan dengan ukuran molekul kecil.

Konsentrasi Protein pada fraksi hasil Kromatografi capturing protein diukur dengan spektrofotometer Nanodrop 2000 adalah seperti tabelberikut

Tabel 1 Konsentrasi protein hasil *capturing*

Sample ID	Protein Conc.	Unit	A280	Sample Type
161111-A4	1077	µg/ml	1,077	161111-A4
161111-A4	1090	µg/ml	1,090	161111-A4

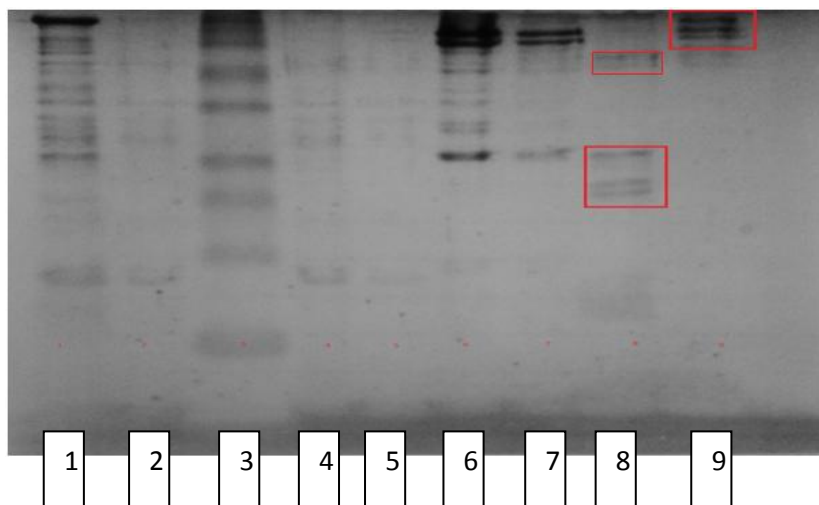
Protein yang didapatkan dilakukan SDS PAGE dan ELISA untuk melihat apakah sampel hasil capturing mengandung PT dan FHA sebagai protein target untuk kemudian dilakukan proses desalting. Dari hasil SDS PAGE, sampel mengandung PT dan FHA. Hal ini dikuatkan dengan uji ELISA terhadap sampel A4. Dengan sandwich ELISA menggunakan coating B. pertussis PT anti serum (sheep) dan B. pertussis FHA anti

serum (sheep) serta antibody mouse anti PT dan mouse anti FHA didapatkan antigen dalam sampel bereaksi dengan antibodi dan mengubah warna kuning menjadi warna biru. Artinya, secara reaksi imunologi dapat dibuktikan bahwa sampel mengandung PT dan FHA. Hal ini menunjukkan bahwa proses capturing yang sudah dilakukan sudah tepat.

Hasil ELISA:

Titer PT pada crude PT-FHA 5,5 µg/mL

Titer FHA pada crude PT-FHA 32,8 µg/mL



Gambar 2. Gel SDS PAGE hasil capturing

Keterangan :

1. Retentate
2. Post kolom
3. Marker
4. X1

5. X2
6. A3
7. A4
8. Standar PT
9. Standar FHA

### B. Desalting PT dan FHA

Proses selanjutnya adalah desalting PT dan FHA. Desalting adalah suatu *group separation* antara molekul dengan berat molekul kecil dan besar. Dengan metode tersebut, protein yang memiliki berat molekul besar dapat dipisahkan dengan garam dan molekul kecil lainnya. Karena pada elusi protein target menggunakan garam, maka kelebihan garam tersebut harus dihilangkan dari protein target.

Yang ingin dipelajari dari penelitian ini adalah pengaruh faktor kimia terhadap hasil *desalting*. Faktor kimia yang diujikan adalah pH Buffer eluasi

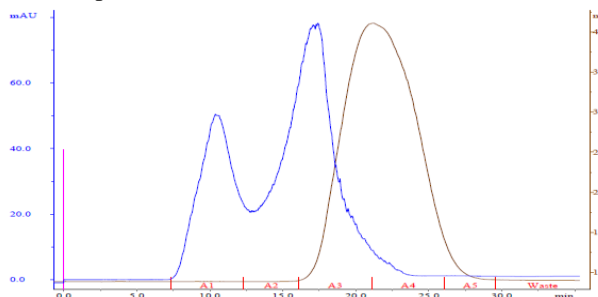
dan konsentrasi buffer eluasi. Secara teori, karena Sephadex adalah termasuk *gel filtration chromatography*, seharusnya faktor kimia tidak begitu berpengaruh terhadap kromatogram yang dihasilkan (Harland, 2004).

Untuk mengetahui pengaruh buffer eluen yang digunakan dalam proses desalting, maka dibandingkan penggunaan buffer fosfat dengan pH 6,0, 7,0, dan 8,0. Kolom yang digunakan adalah sephadex G-25 medium in XK 16, dengan volume kolom 25 mL, dan sample load 10%.

Konsentrasi crude PT-FHA = 740 µg/mL

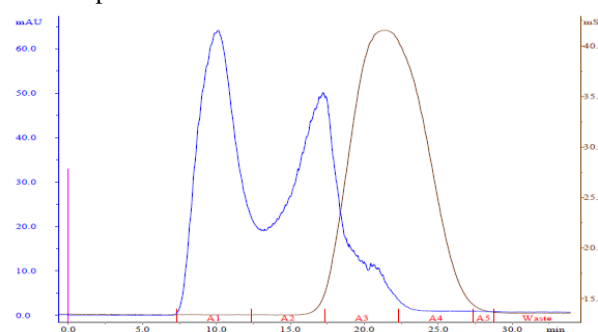
Konsentrasi crude PT-FHA dalam sampel input = 1850 µg

## 1. Buffer pH 6.0



**Gambar 3.** Kromatogram desalting sephadex G-25, buffer fosfat pH 6.0. — = peak protein, — = peak garam

## 2. Buffer pH 7.0

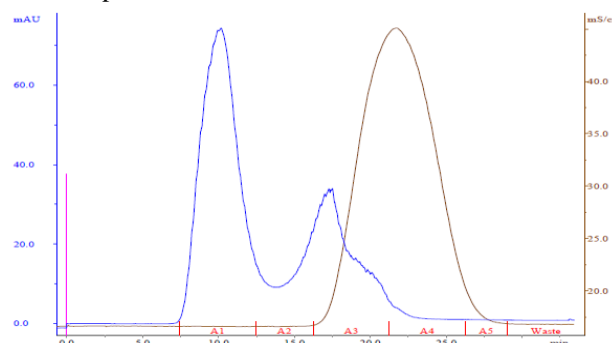


**Gambar 4.** Kromatogram desalting sephadex G-25, buffer fosfat pH 7.0. — = peak protein, — = peak garam

Dari ketiga kromatogram di atas didapatkan bahwa protein target belum sepenuhnya terpisah dari garam (*overlapping*). Puncak dari protein yang akan diambil adalah fraksi A1 dan A2, dimana fraksi A1 dan A2 sudah terpisah dari garam. Adanya *overlapping* tersebut dapat disebabkan adanya interaksi antara resin dengan sampel *crude* PT-FHA. Menurut Flodin (1981), interaksi tersebut disebabkan karena rantai *cross-linked* dextran mempunyai sedikit gugus terminal karboksilat, sehingga gel tersebut dapat bersifat sebagai *cation exchanger* lemah.

Berdasarkan pengukuran protein total terhadap sampel A1 dan A2 dari masing masing pH, didapatkan data sesuai dengan tabel 2. Berdasarkan % recovery total dari fraksi A1 dan A2, Dihitung secara statistik untuk menentukan pH buffer yang paling sesuai untuk proses desalting.

## 3. Buffer pH 8.0



**Gambar 5.** Kromatogram desalting sephadex G-25, buffer fosfat pH 8.0. — = peak protein, — = peak garam

**Hipotesis statistik**

Ho : Tidak ada perbedaan bermakna % recovery total minimal 1 pasang pH buffer

$$(\mu A = \mu B = \mu C)$$

Ha : Ada perbedaan bermakna % recovery total minimal 1 pasang pH buffer

$$(\mu A \neq \mu B, \mu A \neq \mu C, \mu B \neq \mu C)$$

**Perhitungan Statistik:**

Uji statistik yang digunakan adalah Anova One Way. Dari perhitungan menggunakan SPSS, diperoleh nilai  $F = 95.979$  dan nilai signifikansi 0.000. Artinya  $H_a$  diterima dan  $H_o$  ditolak.

Kesimpulan:

Secara keseluruhan berarti ada perbedaan bermakna % recovery total minimal 1 pasang pH buffer pada  $\alpha=0.05$ .

% recovery total terbesar diperoleh dari buffer fosfat pH 7.0

Tabel 2. % recovery sampel dengan buffer yang berbeda

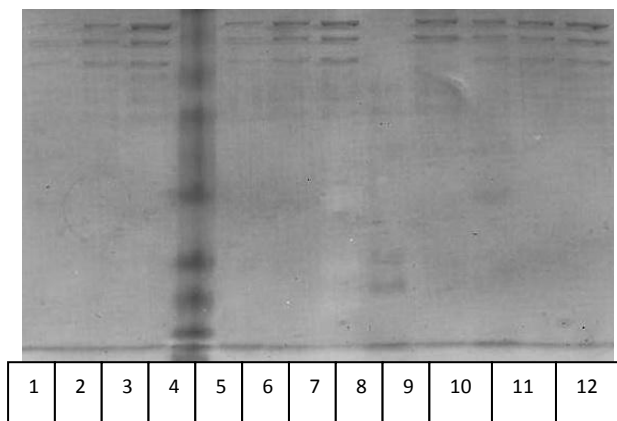
pH buffer	Sample ID	Protein Conc.	mL fraksi	µg protein	% recovery (%)	% recovery rata2 (%)	% recovery total (%)
6.0	A1 sample 10% pH 6	99 µg/ml	5 mL	495	26,76	25,95	46,04 ± 2,94
	A1 sample 10% pH 6	94 µg/ml		470	25,41		
	A1 sample 10% pH 6	95 µg/ml		475	25,68		
	A2 sample 10% pH 6	107 µg/ml	3.78 mL	404.46	21,86	20,09	
	A2 sample 10% pH 6	104 µg/ml		393.12	21,25		
	A2 sample 10% pH 6	84 µg/ml		317.52	17,16		
	A3 sample 10% pH 6	141 µg/ml	5 mL	705	38,11	39,82	
	A3 sample 10% pH 6	151 µg/ml		755	40,81		
A3 sample 10% pH 6	150 µg/ml	750		40,54			
7.0	B1 sample 10% pH 7	127 µg/ml	5 mL	635	34,32	36,49	74,23 ± 3,07
	B1 sample 10% pH 7	136 µg/ml		680	36,76		
	B1 sample 10% pH 7	142 µg/ml		710	38,38		
	B2 sample 10% pH 7	157 µg/ml	5 mL	785	42,43	37,75	
	B2 sample 10% pH 7	126 µg/ml		630	34,05		
	B2 sample 10% pH 7	136 µg/ml		680	36,76		
	B3 sample 10% pH 7	55 µg/ml	5 mL	275	14,86	11,80	
	B3 sample 10% pH 7	32 µg/ml		160	8,65		
B3 sample 10% pH 7	44 µg/ml	220		11,89			
8.0	C1 sample 10% pH 8	163 µg/ml	5 mL	815	44,05	44,41	55,23 ± 1,14
	C1 sample 10% pH 8	158 µg/ml		790	42,70		
	C1 sample 10% pH 8	172 µg/ml		860	46,49		
	C2 sample 10% pH 8	51 µg/ml	3.8 mL	193.8	10,48	10,82	
	C2 sample 10% pH 8	58 µg/ml		220.4	11,91		
	C2 sample 10% pH 8	49 µg/ml		186.2	10,06		
	C3 sample 10% pH 8	54 µg/ml	5 mL	270	14,59	14,05	
	C3 sample 10% pH 8	49 µg/ml		245	13,24		
C3 sample 10% pH 8	53 µg/ml	265		14,32			

Dari fraksi hasil *desalting* dengan perbedaan pH, dilakukan SDS PAGE dan ELISA untuk mengetahui adanya protein target (PT dan FHA) dalam sampel tersebut. Dari data gel akrilamid, didapatkan bahwa band subunit PT tidak dapat dideteksi oleh pewarnaan klasik Coomassie Brilliant Blue baik pada sampel *crude* protein maupun sampel. Pewarnaan Coomassie Brilliant Blue dapat mendeteksi 50 ng protein band pada sampel. Hal ini dapat disebabkan beberapa faktor:

a. Konsentrasi PT dalam sampel hasil *desalting* kecil, sehingga tidak bisa dideteksi oleh pewarnaan Coomassie Brilliant Blue.

b. PT dalam sampel tidak stabil, sehingga dengan penyimpanan akan terjadi kerusakan protein.

Untuk mengatasi hal tersebut, dapat dilakukan pewarnaan *Silver staining* yang mempunyai sensitivitas 10 kali lipat dibandingkan Coomassie Brilliant Blue.



Gambar 6 Gel SDS PAGE hasil desalting buffer yang berbeda.

Keterangan :

- |              |               |                |
|--------------|---------------|----------------|
| 1. A1 pH 6.0 | 5. A1 pH 7.0  | 9. Standar FHA |
| 2. A2 pH 6.0 | 6. A2 pH 7.0  | 10. A1 pH 8.0  |
| 3. A3 pH 6.0 | 7. A3 pH 7.0  | 11. A2 pH 8.0  |
| 4. Ladder    | 8. Standar PT | 12. A3 pH 8.0  |

Untuk menguji apakah PT dalam sampel hasil desalting konsentrasi kecil sehingga tidak terdeteksi oleh pewarnaan Coomassie Brilliant Blue, maka dilakukan ELISA sampel hasil desalting. Dari hasil ELISA didapatkan bahwa titer PT pada sampel hasil desalting kecil dan beberapa tidak dapat

dideteksi. Hal ini dapat disebabkan antigen PT ada di fraksi A3 yang tidak dilakukan perhitungan karena masih belum terpisah sempurna dengan garam. PT dan FHA dapat dipisahkan pada tahapan *polishing* purifikasi protein.

Tabel 2. Hasil ELISA PT dan FHA pada sampel hasil desalting

pH buffer	Sample ID	ELISA PT	ELISA FHA
6.0	A1 sample 10% pH 6	Undetect	22,31 µg/ml
	A1 sample 10% pH 6	Undetect	17,22 µg/ml
	A1 sample 10% pH 6	Undetect	18,97 µg/ml
	A2 sample 10% pH 6	0,13 µg/ml	0,33 µg/ml
	A2 sample 10% pH 6	0,22 µg/ml	1,21 µg/ml
	A2 sample 10% pH 6	0,17 µg/ml	2,89 µg/ml
7.0	B1 sample 10% pH 7	Undetect	16,45 µg/ml
	B1 sample 10% pH 7	Undetect	18,70 µg/ml
	B1 sample 10% pH 7	Undetect	20,54 µg/ml
	B2 sample 10% pH 7	0,23 µg/ml	2,45 µg/ml
	B2 sample 10% pH 7	0,35 µg/ml	4,55 µg/ml
	B2 sample 10% pH 7	0,11 µg/ml	1,34 µg/ml
8.0	C1 sample 10% pH 8	Undetect	24,11 µg/ml
	C1 sample 10% pH 8	Undetect	26,77 µg/ml
	C1 sample 10% pH 8	Undetect	19,79 µg/ml
	C2 sample 10% pH 8	0,06 µg/ml	2,11 µg/ml
	C2 sample 10% pH 8	Undetect	2,78 µg/ml
	C2 sample 10% pH 8	0,05 µg/ml	1,89 µg/ml

## KESIMPULAN

Faktor kimia seperti pH buffer eluen akan berpengaruh terhadap hasil proses desalting.

pH buffer eluen akan berpengaruh terhadap % recovery sampel protein. % recovery terbaik didapatkan dengan menggunakan buffer fosfat pH

7.0 sebagai eluen desalting dengan nilai  $74,23 \pm 3,07\%$

#### ACKNOWLEDGMENT

Ucapan terima kasih disampaikan kepada PT. Biofarma yang telah memberikan kesempatan untuk melakukan penelitian dan membiayai seluruh penelitian ini sehingga penelitian ini dapat diwujudkan.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Erkan O., Kamer K., Ozlem B., Ayfer G., 2003. Rapid purification of pertussis toxin (PT) and filamentous hemagglutinin (FHA) by cation-exchange chromatography. *Vaccine* 22: 1570-1575
- Hagel L. and Janson J.C., 2002. Size-exclusion chromatography, in Heftmann, E (ed), *Chromatography, 5th edition*. Amsterdam: Elsevier pp. A267-AA307.
- Hagel L., 1999. Gel Filtration in J.-C. Janson and L. Rydén (ed), *Protein Purification. Principles, High Resolution Methods and Applications*. New York: VCH Publisher Inc. p. 63-106.
- Harland., C. E. ,1994. *Ion exchange: Theory and Practice*, Cambridge: The Royal Society of Chemistry.
- Mahon B.P., Darren P.J., Cassidy P., 2001. Acellular pertussis vaccine protects against exacerbation of allergic asthma due to *Bordetella pertussis* in a murine model. *Clin. Diagn. Lab. Immunol* .12(3): 409-417
- Mahon, B. P. 2001. The rational design of vaccine adjuvants for mucosal and neonatal immunization. *Curr. Med. Chem.* 8:1057-1075
- Lewis K., Cherry J.D., Holroyd J., Baker L.R., Dudenhofer F.E., Robinson R.G., 1986. A double blind study comparing an acellular pertussis component DTP vaccine with a whole cell pertussis component DTP vaccine in 18 month old children. *Am. J. Dis. Childh.* 149: 872-876M, Okihashi; Takatori S; Kitagawa Y; Tanaka Y, 2007, *J AOAC Int.* 90(4) : 1165-1179
- Noble G.R., Bernier R.H., Esber E.C., Hardegree C., Hinman A.R., Klein D, Saah A. 1987. Acellular and whole cell pertussis vaccine in Japan. Report of a visit by US scientist. *J. Am. Med. Assoc.* 257: 1351-1356
- Sato Y., Cowell JI., Sato H. Burstin D.G., Manclark C.R., 1993. Separation and purification of the hemagglutinin from *Bordetella pertussis*. *Infect Immun* 41(1): 313-20
- Kerr JR., Matthews RC., 2000. *Bordetella pertussis* infection: pathogenesis, diagnosis, management, and the role of protective immunity. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 19: 77-88