

ارزیابی پاسخ آنتی بادی به پروتئین‌های غشاء خارجی بروسلا آبورتوس S99 به روش ELISA

سحر کرمی^۱، سید داور سیادت^{۲*}، بهمن تبرائی^۲، داریوش نوروزیان^۲، ناصر هرزندی^۱،
محمدرضا آقا صادقی^۲، جلال ایزدی مبارکه^۲، محمد رضا رضوی^۲، مریم خیر اندیش^۴،
سید مهدی سادات^۲، مهدی نجاتی^۲، علی شریفیات سلمانی^۳

(۱) گروه میکروب شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج

(۲) بخش واکسن های باکتریایی و تهیه آنتی ژن، مجتمع تولیدی- تحقیقاتی انستیتوپاستور ایران

(۳) گروه هپاتیت و ایدز، انستیتوپاستور ایران

(۴) مرکز پژوهشی سازمان انتقال خون ایران

نویسنده رابط: سید داور سیادت، بخش واکسن های باکتریایی و تهیه آنتی ژن، مجتمع تولیدی- تحقیقاتی انستیتوپاستور ایران

تلفن: ۶۶۹۶۸۸۵۰ d.siadat@gmail.com

تاریخ دریافت مقاله: ۸۷/۱۲/۱۴ تاریخ پذیرش مقاله: ۸۸/۴/۱۵

چکیده:

زمینه و اهداف: به پروتئین‌های غشاء خارجی (OMP_s) بروسلا به عنوان ساختارهای ایمونوژنیک برای طراحی و تولید واکسن زیر واحد بروسلون انسانی توجه شده است. OMPهای بروسلا آبورتوس همراه با سایر اجزاء باکتریایی در خرگوش، سنتز سطوح بالای مولکول‌های IgG ویژه علیه بروسلا را تحریک می کنند. هدف مطالعه ارزیابی پاسخ آنتی بادی به پروتئین‌های غشاء خارجی بروسلا آبورتوس S99 به روش الیزا بود.

روش بررسی: OMPها از گونه صاف بروسلا آبورتوس S99 با استخراج منظم سلول‌های سونیکه شده به وسیله اولتراسانتریفوژ و پیش هضم با لیزوزیم تخلیص شدند و با کروماتوگرافی تبادل یونی و ژل فیلتراسیون به طور خالص جداسازی شدند. میزان کل پروتئین تخلیص شده توسط دستگاه نانودراپ اسپکتروفتومتر (ND-1000) به طور صحیح و دقیق اندازه گیری شد. با استفاده از روش سدیم دودسیل سولفات پلی آکریل آمید ژل الکتروفورز (SDS - PAGE)، پروفایلی از پروتئین‌های غشاء خارجی به دست آمد، که طبق آن پروتئین‌ها براساس وزن مولکولی از یکدیگر تفکیک شدند. با این روش دسته دوم از پروتئین‌ها که جزو پورین‌ها (Porins) هستند و در گونه بروسلا آبورتوس بیشترین گروه OMP ها را تشکیل می‌دهند، تخلیص شدند. سپس سه دسته خرگوش سه تایی طبق یک برنامه ایمونیزاسیون به طور آزمایشگاهی با سه ترکیب مختلف شامل پروتئین‌های غشاء خارجی به تنهایی و همراه با لیپو پلی ساکارید (LPS) و ادجوانت کامل فروند (CFA) ایمونیزه شدند. طبق برنامه زمانبندی شده پس از خون گیری از حیوان، عیار پاسخ آنتی بادی اختصاصی مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته ها: نتایج نشان دادند ترکیبی از LPS+Porins و CFA+Porins به عنوان ایمونوژنیک ترین ترکیبات هستند و عیار بالاتری از آنتی بادی را در مدل حیوانی القاء می‌کنند. افزایش عیار آنتی بادی در دو گروه فوق در مقایسه با گروه ایمونیزه شده با پورین، معنی دار بود ($P < 0.05$).

نتیجه گیری: مجموعه پورین‌ها و LPS بروسلا می‌تواند ایمنی حفاظتی و طولانی مدتی را علیه بروسلا ایجاد کند. این مجموعه احتمالاً می‌تواند برای واکسن زیر واحد جهت پیشگیری از بروسلون انسانی مورد استفاده قرار گیرد.

کلید واژه ها: بروسلا آبورتوس S99، واکسن، پروتئین غشاء خارجی، لیپوپلی ساکارید، ELISA

مقدمه:

هیدروکلراید همراه با فینیل متان سولفونیل فلوراید حل شد و استخراج دترجنتی غشاء سیتوپلاسمی به وسیله استفاده از سدیم N - لوریل سارکوزینات انجام گرفت. محلول نهایی که حاوی OMPs است در مقابل بافر تریس در دمای 4°C به مدت ۷۲ ساعت دیالیز گردید. به منظور جداسازی پپتیدوگلیکان از پروتئین‌های غشاء خارجی، لیزوزیم اضافه شد و بعد از این مرحله دوباره نمونه در دور 10000 g اولتراسانتریفوژ گردید (۵ و ۷ و ۸).

تعیین غلظت پروتئین:

غلظت پروتئین با استفاده از اسپکتروفتومتر ND-۱۰۰۰ در حد ۱ میکرولیتر با دقت و قدرت تکرار بالا اندازه گیری شد (۸).

ژل الکتروفورز:

سدیم دودسیل پلی آکریل آمید ژل الکتروفورز (SDS - PAGE) با روش لاملی روی ژل پلی آکریل آمید ۱۲٪ انجام شد. سپس ژل به روش کوماسی بلو رنگ آمیزی گردید (۵ و ۷ و ۸).

استخراج لیپوپلی ساکارید بروسلا آبورتوس S99:

لیپوپلی ساکارید بروسلا آبورتوس S99 با استفاده از روش بهینه سازی شده شریفات سلمانی و همکاران (۲۰۰۸) استخراج گردید. به اختصار در این روش از فنل داغ در تخلیص LPS بروسلا آبورتوس استفاده شد. لیپوپلی ساکارید در مخلوط نهایی به وسیله متانول سرد ته نشین شده و در بافر تریس حل شده است. پروتئیناز k، DNase و RNase به منظور کاهش آلودگی پروتئین و اسید نوکلئیک اضافه شدند (۹-۱۱).

برنامه ایمونیزاسیون:

سه گروه مرکب از سه خرگوش سفید نیوزلندی ۴ ماهه به وزن ۲/۵ تا ۳ کیلوگرم با سه ترکیب مختلف زیر به طور داخل عضلانی ایمونیزه شدند.

گروه ۱. $120\text{ }\mu\text{g/ml}$ OMPs تخلیص شده

گروه ۲. ترکیبی از $120\text{ }\mu\text{g/ml}$ OMPs و $120\text{ }\mu\text{g/ml}$ LPS.

گروه ۳. ترکیبی از $120\text{ }\mu\text{g/ml}$ OMPs و حجم مساوی از ادجوانت کامل فروند (CFA)

تزریقات در روزهای ۰، ۷ و ۱۴ انجام شد. سرم حیوانات هیپرایمون در روزهای ۰، ۷، ۱۴ و ۲۱ جمع آوری گردید و در 20°C نگهداری شد (۵ و ۱۱).

ارزیابی پاسخ آنتی‌بادی اختصاصی:

عیار آنتی‌بادی اختصاصی ضد بروسلا آبورتوس S99 با ELISA

امروزه کنترل بیماری بروسلوز به سه اصل کشتن دام‌های آلوده، پاستوریزه کردن محصولات لبنی و واکسیناسیون استوار است. واکسیناسیون دام‌ها برپایه ی تلقیح سویه‌های زنده ضعیف شده بروسلا آبورتوس (S19، ۴۵/۲۰) و بروسلا ملی‌تنسیس (Rev1) است (۲۱). استفاده از این واکسن‌ها در دام با محدودیت‌هایی همراه است؛ تحریک تولید آنتی‌بادی در دام‌های واکسینه شده که مانع از تفکیک آنها از دام‌های مبتلا می‌گردد، همچنین بروز سقط جنین و ابتلاء به بروسلوز در این حیوانات، باعث شده تا تلقیح این واکسن‌ها در دام‌ها با احتیاط انجام گیرد. همچنین واکسن‌های بروسلوز انسانی بر پایه‌ی پیکره‌ی کامل باکتری غیر فعال شده و یا سویه‌های زنده تخفیف حدت یافته با دو مشکل اساسی مواجه هستند: نخست آنکه گاهی ایجاد بیماری می‌نمایند، دوم آنکه با واکنش‌های ازدیاد حساسیت ناخواسته همراه می‌باشند. برای غلبه بر این مشکل، شاخص‌های آنتی ژنیک دیواره سلولی بروسلا مثل لیپوپلی ساکارید (LPS) و پروتئین‌های غشاء خارجی (OMPs) به عنوان داوطلبین مناسب برای توسعه واکسن‌های زیر واحد مورد توجه قرار گرفته‌اند. OMPs جزء ترکیبات ساختاری سلول هستند و به عنوان فاکتورهای بیماری زا عمل می‌کنند، این پروتئین‌ها نقش مهمی در القای پاسخ‌های ایمنی دارند (۴-۱).

مطالعه حاضر بر روی مجموعه پروتئین‌های غشاء خارجی بروسلا آبورتوس S99 به عنوان آنتی‌ژن حفاظتی به شکل منوالان و همچنین همراه با LPS و نیز ادجوانت کامل فروند (CFA)، در القای آنتی‌بادی اختصاصی صورت گرفته است.

مواد و روش‌ها:

سویه بروسلا آبورتوس S99 از کلکسیون باکتریایی بخش واکسن‌های باکتریایی و تهیه آنتی‌ژن انسیتوپاستور ایران تهیه گردید (۴).

استخراج OMPs بروسلا آبورتوس S99:

استخراج OMPs بروسلا آبورتوس S99 مطابق روش بهینه شده توسط کرمی و همکاران (۲۰۰۹) صورت پذیرفت (۵). به طور خلاصه توده‌ی سلولی در بافر تریس هیدروکلراید معلق و سپس RNase و DNase به مقدار مورد نظر اضافه شد. نمونه‌ها با دستگاه سونیکاتور (Bronson) در سیکل پیوسته تیمار شدند. در ادامه مایع روئی در 43500 rpm اولتراسانتریفوژ شد. رسوب حاصل که حاوی غشاءهای خام می‌باشد در بافر تریس

anti IgG خروگوشی کونژوگه با HRP (Horseradish Peroxidase) به میزان $100 \mu\text{l}$ به هر چاهک اضافه شد، برای ۳۰ دقیقه انکوبه گردید و سپس شستشو شد. برای نمایان شدن واکنش آنتی ژن - آنتی بادی، محلول سوبسترا (کروموژن) به هر چاهک اضافه شد. در پایان دانسیته نوری (OD) نمونه‌ها، به وسیله دستگاه ELISA - reader (مدل Sunrise مارک TECAN) در طول موج ۴۰۵ نانومتر اندازه گیری شد (۹-۱۴و۱۲).

ارزیابی شد. میکروپلیت‌ها با آنتی ژن بروسلا آبورتوس S99 ($100 \mu\text{l}$ در هر چاهک) پوشیده شد و برای ۱ ساعت در 37°C انکوبه شدند.

پلیت‌ها در بافر بلوکه کننده (PBS - Casein) برای ۱ ساعت در 37°C اشباع شدند. آنتی سرم در رقت‌های $1/1000$ ، $1/10000$ و $1/100000$ و به مقدار $100 \mu\text{l}$ به هر چاهک اضافه گردید و به مدت یک ساعت انکوبه شد. شستشو سه بار با فسفات بافر سالین - آزاید (PBS - azide) انجام گردید.

جدول ۱: عیار IgG اختصاصی بر علیه بروسلا آبورتوس S99، پس از زمان‌های متناوب ایمونیزاسیون با ترکیبات متعدد

عیار IgG اختصاصی علیه	عیار IgG اختصاصی علیه	عیار IgG اختصاصی علیه	ترکیبات تزریق شده
بروسلا آبورتوس S99، یک هفته بعد از سومین تزریق	بروسلا آبورتوس S99، یک هفته بعد از دومین تزریق	بروسلا آبورتوس S99، یک هفته بعد از اولین تزریق	
2660 ± 124270	923 ± 76326	606 ± 68242	پورین بروسلا آبورتوس S99
1300 ± 136706	1693 ± 132896	3026 ± 122681	پورین بروسلا آبورتوس S99 + ادجوانت کامل فروند
2220 ± 155847	2980 ± 134726	2026 ± 123989	پورین بروسلا آبورتوس S99 LPS + بروسلا آبورتوس S99
$3 <$	$3 <$	$3 <$	کنترل منفی

یافته‌ها:

سلولی تعلیق غلیظی از جسم سلولی بروسلا آبورتوس S99 در معرض امواج اولتراسونیک قرار داده شد. سپس برای جداسازی غشاء سلولی از سلول‌های شکسته نشده و مواد سیتوپلاسمی به

مراحل استخراج و تخلیص OMPs بروسلا آبورتوس S99 به نحوی انتخاب گردید تا در مرحله نهایی مجموعه پروتئین‌های عمده غشاء خارجی بروسلا بدست آیند. جهت جداسازی پوسته

آمیخته‌ای از روش‌های ورستریت و همکاران (۱۹۸۱) و نیز روش کونولی و همکاران (۲۰۰۲) استفاده شد (۷-۵) و مقدار زیادی پروتئین تخلیص گردید. الگوی پروتئینی به‌دست آمده در نتیجه SDS - PAGE از OMPs تخلیص شده با روش‌های دیگر (روش دوبری و بیزارد) متفاوت است. این مشاهده ثابت می‌کند که تفاوت در روش استخراج باعث تفاوت در پروفایل پروتئینی SDS - PAGE خواهد شد (۷). طبق روش بکار رفته باند پروتئینی نمایان شده به دسته دوم از پروتئین‌ها، یعنی پورین‌ها، تعلق دارد. این گروه از پروتئین‌ها در بروسلا آبورتوس نسبت به بروسلا ملی‌تنسیس بیشتر هستند و نسبت به پروتئین‌های دیگر غشاء خارجی توانایی بیشتری در تحریک سیستم ایمنی دارند. پورین‌ها در جنس بروسلا توسط دو ژن OMP2a و OMP2b رمزدهی می‌شوند که بیش از ۸۵ درصد تشابه DNA دارند و با پروتئین RopA در ریزوبیوم لگومینوزاروم (۳۰-۴۰ درصد) و پروتئین OMP43 در بارتونلا هنسله (۳۸ درصد) از نظر توالی آمینواسیدی مشابه هستند (۱۵ و ۱۶).

به‌نظر می‌رسد که دلیل تفاوت در الگوی به دست آمده این است که در ضمن استخراج OMPs بروسلا از دیواره سلولی هضم شده با لیزوزیم، احتمالاً مقداری LPS و بخش‌هایی از مورین همراه پروتئین‌ها وجود دارد که می‌تواند سبب تفاوت پروفایل پروتئینی در روی ژل SDS - PAGE گردد (۱۷). در تجزیه و تحلیل ELISA روی سرم خرگوش ایمنی‌زایی شده، ترکیب پورین‌ها به همراه لیپولی ساکارید بروسلا آبورتوس S99 بیشترین پاسخ هومورال را در یک هفته بعد از سومین تزریق القاء نموده است. به علاوه، در گروه خرگوش‌های ایمنی‌زایی شده با ترکیب LPS به همراه پورین و CFA به همراه پورین، عیار آنتی‌بادی به طور معنی داری بالاتر از گروه تزریق شده با پورین‌ها است. لذا، این دو ترکیب به عنوان ایمونوژن‌ترین ترکیبات معرفی می‌شوند. گرچه تفاوت بین عیارهای IgG در دو گروه LPS به همراه پورین و CFA به همراه پورین معنی دار نیست ($P > 0.05$)، اما هر دو گروه، در مقایسه با حیوانات ایمنی‌زایی شده با پورین‌های بدون LPS و CFA، به طور معنی دار عیار بیشتری نشان دادند ($P < 0.05$). سطوح بالای عیار IgG بر علیه بروسلا آبورتوس S99 در مقایسه با گروه کنترل، ایمونوژنیسته پورین‌های بروسلا آبورتوس و صحت روش تخلیص پورین‌ها را نشان می‌دهد. به‌طوریکه مراحل متعدد روش تخلیص با ساختارهای ایمونوژنیک و طبیعی پورین‌ها تداخل نمی‌کند. چون LPS به همراه Porin و CFA با عیارهای بالای IgG را القاء می‌نماید، LPS بروسلا آبورتوس

ترتیب از سانتریفوژ با دور پایین و اولتراسانتریفوژ استفاده گردید. با توجه به ویژگی‌ها و اختلاف غشاء سیتوپلاسمی و غشاء خارجی، برای جداسازی این دو غشاء از یک دترژنت به نام N- لوریل سارکوزینات استفاده شد. پروتئین‌های غشاء خارجی به این دترژنت مقاوم هستند در حالیکه پروتئین‌های دیگر از بین می‌روند. این گروه از پروتئین‌ها در بروسلا برخلاف بسیاری از باکتری‌های گرم منفی دارای اتصال کووالانسی محکمی با لایه پتیدوگلیکان می‌باشند. به همین دلیل از استحکام بیشتری در برابر حرارت و عوامل دیگر برخوردار هستند. این برهم کنش بین غشاء خارجی و پتیدوگلیکان از طریق یک سری از OMPs که معمولاً لیپوپروتئین هستند، صورت می‌گیرد. از آنجا که هیدرولیز آنزیماتیک پتیدوگلیکان به منوهای تشکیل دهنده خود، سبب آزاد شدن بیشتر پروتئین‌های غشاء خارجی می‌شود و با توجه به اینکه لیزوزیم روی پتیدوگلیکان اثر می‌گذارد و باعث شکستن آن به قطعات منومر تشکیل دهنده خود می‌شود، در این مطالعه برای جدا کردن پتیدوگلیکان از این آنزیم استفاده شد.

غلظت پروتئین با اسپکتروفتومتر ۱۰۰۰ - ND، ۶/۲۷ میلی گرم بر میلی لیتر اندازه گیری شد. آنالیز SDS - PAGE، یک باند پروتئینی در رنج ۳۶-۳۸ کیلو دالتون را نشان داد که در گروه ۲ پروتئین‌های بروسلا تقسیم بندی می‌شود. همانطور که قبلاً مشخص شد روش استخراج OMPs به کار رفته در این مطالعه منجر به تخلیص گروه ۲ پروتئین‌های بروسلا آبورتوس S99 می‌گردد و به عنوان یک روش اختصاصی برای استخراج و جداسازی این گروه از پروتئین‌ها پیشنهاد می‌گردد. بنابراین روش استخراج رضایت بخش بوده است، چون غلظت بالای گروه ۲ پروتئین‌ها قابل ملاحظه است.

پاسخ آنتی‌بادی اختصاصی به OMPs بروسلا آبورتوس S99 به روش ELISA ارزیابی شد. عیار آنتی‌بادی IgG در روزهای ۰، ۷، ۱۴ و ۲۱ بعد از اولین تزریق تعیین گردید و به صورت دانسیته نوری و انحراف معیار ($OD \text{ unit} \pm SD$) بیان شد. از سرم خرگوش‌های غیر ایمنی‌زایی شده به عنوان کنترل منفی استفاده شد. داده‌های به دست آمده با دستگاه ELISA - reader از نظر آماری تجزیه و تحلیل شدند (جدول ۱). عیار سرم حیوانات ایمنی‌زایی شده به‌طور معنی دار بیشتر از کنترل منفی بود ($P < 0.05$).

بحث:

در این مطالعه به منظور تخلیص OMPs بروسلا آبورتوس S99

موثری هم ایمنی سلولی و هم ایمنی هومورال را القا می کند (۲۱-۱۹). پیروژنیسته پایین LPS به همراه توانایی بالا برای تحریک آنتی بادی های اختصاصی علیه بروسلا و امکان کاربرد آن به عنوان یک ادجوانت برای پورین های بروسلا، همگی خصوصیات هستند که کاربرد مجموعه LPS و پورین بروسلا را برای تحریک ایمنی حفاظتی و طولانی مدت بر علیه عفونت بروسلا پیشنهاد می کنند (۱۹ و ۲۰ و ۲۲). این دو دلیل، انتخاب OMPs به عنوان داوطلبین واکسن زیر واحدی را مطرح می نماید.

نتیجه گیری:

برای تحریک سیستم ایمنی؛ پروتئین ها به عنوان آنتی ژن های قوی محسوب می شوند، باعث ایجاد سلول های خاطره می گردند، ایمنی طولانی مدت ایجاد می کنند، هیچ گونه سمیتی برای افراد ندارند و سرانجام کاملاً ایمن هستند. زمانیکه پروتئین ها همراه LPS (جهت تحریک بیشتر سیستم ایمنی) استفاده شوند بسیار موثرتر خواهند بود. لذا، به عنوان داوطلب مناسبی برای طراحی و توسعه واکسن زیر واحد جهت پیشگیری از بروسلاز انسانی مورد توجه هستند.

S99 برای پورین های همین باکتری به عنوان یک ادجوانت قوی (با اثر مشابه CFA) با منشاء میکروبی محسوب می گردد. به نظر می رسد که با توجه به سمیت پایین LPS بروسلا/آبورتوس نسبت به CFA (ده هزار برابر پیروژنیسته کمتر از LPS انتروباکتریاسه) و نیز عدم ایجاد ازدیاد حساسیت تاخیری، ادجوانت مناسب تری در مقایسه با ادجوانت های رایج باشد (۲۰-۱۸). ترکیب LPS و Porin به عنوان بهترین داوطلب واکسن زیر واحد ترکیبی در بین ترکیبات بیان شده پیشنهاد می شود. گرچه اپی توپ های زنجیره پلی ساکراید O (OPS) در LPS به طور قوی تر نسبت به OMPs قدرت تحریک آنتی بادی را دارند اما در ترکیب پیشنهادی فوق، پورین ها، پاسخ های ایمنی وابسته به لنفوسیت T را تحریک می نمایند، در حالیکه LPS که یک آنتی ژن غیر وابسته به لنفوسیت T است، نمی تواند خاطره ایمونولوژیک را ایجاد نماید (۱۹ و ۲۰). با توجه به اینکه پورین ها به دلیل حضور زنجیره های بلند OPS در گونه های صاف (بیشترین گونه های بروسلا نوع وحشی) کمتر در دسترس آنتی بادی ها هستند و LPS هم فاقد خصوصیات ایمونولوژیک آنتی ژن های وابسته به T می باشد، ترکیبی از این دو ساختار دیواره سلولی بروسلا/آبورتوس S99 به طور

فهرست مراجع:

- Schuring GG, Sriranganathan N, Corbel MJ. Brucellosis vaccines: past, present and future. *Vet Mic* 2002; **90**: 479-496.
- Ragan VE, The Animal and Plant Health Inspection Service (APHIS) brucellosis eradication program in the United States. *Vet Mic* 2002; **90**: 11-18.
- Corbel, M.J. Brucellosis: an overview. *Emerg. Infect Dis* 1997; **3**: 213-221.
- Young EJ, An overview of human brucellosis. *Clin infect Dis* 1995; **21**: 283-289.
- Verstrete DR, Creasy MT, Caveney N T, Baldwin CL, Blab M W, winter A. J. Outer membrane Proteins of *Brucella abortus*: isolation and characterization. *J Infect Immun* 1982; **35**: 979-989
- Connolly P, Comerici D, Timothy G A, walz A, Quan M, Ryan C, et al. Proteomic analysis of *Brucella abortus* cell envelope and identification of immunogenic candidate proteins for vaccine development. *J Research* 2006; **8**: 3767-3780.
- Verstrete DR, Winter AJ. Comparison of sodium dodecyl sulfate – polyacrylamide gel electrophoresis profiles and antigenic relatedness among outer membrane protein of 49 *Brucella abortus* strains. *Infect Immun* 1984; **48**: 182-187.
- Karami S, Siadat SD, Tabaraie B, Norouzian D, Harzandi N, Aghasadeghi MR, et al. Extraction and Molecular Evaluation of *Brucella abortus* S99 Major Outer Membrane Proteins. *Fayz*, In Press.
- Sharifat Salmani A, Siadat SD, Ahmadi H, Nejati M, Norouzian D, Tabaraie B, et al. Optimization of *Brucella abortus* S99 Lipopolysaccharide extraction by phenol and Butanol methods. *Res J Bio sci* 2008; **3**(6): 578-580.
- Shapouri R, Mohabati Mobarez A, Ahmadi H, Tabaraie B, Hosseini Doust R, et al. Optimization of *Brucella abortus* fermenter culture conditions and LPS extraction method for antigen production. *Res J Microbial* 2008; **3**(1): 1-8.
- Sharifat Salmani A, Siadat SD, Norouzian D. Outer Membrane vesicle of *Neisseria meningitidis* serogroup B as an adjuvant to induce specific antibody response against the

- lipopolysaccharide of *Brucella abortus* S99. *Annals Microbiol* 2009; **56**(1): 145-149.
12. Cloeckaert A, Kerkhofs P, Lime Nt. Antibody response to Brucella outer membrane proteins in bovine brucellosis : Immunoblot analysis and competitive enzyme- linked immunosorbent assay using monoclonal antibodies. *J clin Microbiol* 1992; **30**: 3168- 3174.
13. Bowden RA, Cloeckaert A, Zygmunt MS, Benard S, Dubray G. Surface exposure of outer membrane protein and Lipopolysaccharide epitopes in Brucella species studied by enzyme – Linked Immunosorbent assay and flow cytometry *Infect Immun* 1995; **63**: 3845- 3852.
14. Cloeckaert A, verger JM, Grayos M, vizaino N. Molecular and immunological characterization of the major outer membrane proteins of Brucella. *FEMS Microbial Let* 1996; **145**:1- 8
15. Cloeckaert A, Zygmunt MS, Wergifosse P, Dabray G, Limet JN. Demonstration of peptidoglycan associated Brucella outer membrane proteins by use of monoclonal antibodies. *J Gen Microbiol* 1992;**138**: 1543 – 1550.
16. Diaz R, Jones LM, leong D, Wilson JB. Surface antigens of smooth Brucellae. *J Bacteriol* 1968; **96**: 893-901.
17. Meredith CA , Jaughlin Mc. Immune response to porin in cattle immunized with whole cell , outer membrane, and outer membrane protein antigens of *Brucella abortus* combined with trehalose dimycolate and muramy dipeptide sdjuvants. *Infect Immun* 1983; **42**: 1159- 1167.
18. Dzata GK, Confer AW, wychoff JH. The effects of adjuvants on immune responses in cattle injected with a *Brucella abortus* soluble antigen. *Ve Microbiol* 1991; **29** : 27 – 48.
19. Chewonogrodzky JW, Dubray GE, Biological activities of *Brucella abortus* lipopolysaccharides. *Infect Immun* 1981; **31**:362.
20. Moreno, ELM, Jones , Berman DT. Immunochemical characterization of rough Brucella lipopolysaccharides. *Infect Immun* 1984; **43**: 779- 782.
21. Jacques IA, Cloeckaert J N, Dubray G. Protection conferred on mice by combinations of monoclonal antibodies directed against outer membrane proteins or smooth lipopolysaccharide of Brucella. *J Med Microbiol* 1992; **37**: 100-103.
22. Schurig GG, Jones LM, Speth SL ,Berman DT. Antibody response to antigens distinct from smooth lipopolysaccharide complex in Brucella infection. *Infect Immun* 1978;**21**: 994-1002