

## The combined use of recombinant and pVAX-omp31 DNA Vaccine for immunological protection against pathogenic *Brucellas melitensis* in an experimental model of BALB/c Mice

Naser Harzandi<sup>1</sup>, Haniyeh Aghababa<sup>2</sup>, Nima Khoramabadi<sup>2</sup>, Bahman Tabaraie<sup>3</sup>

1. Department of Microbiology, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran
2. Department of Bacteriology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
3. Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

### Article Information

#### Article history:

Received: 2016/05/28

Accepted: 2017/02/15

Available online: 2017/03/16

#### Article Subject:

Molecular Microbiology

IJMM 2017; 11(1): 39-47

#### Corresponding author at:

Dr. Naser Harzandi

Department of Microbiology,  
Karaj Branch, Islamic Azad  
University, Karaj, Iran

Tel: 0982634182404

#### Email:

[naser.harzandi@kiaui.ac.ir](mailto:naser.harzandi@kiaui.ac.ir)

### Abstract

**Background and Aim:** Brucellosis is still an important zoonotic infection and evaluation of immunologic properties of various bacterial antigens along with different vaccination strategies helps in designing efficient vaccines against the disease. The aim of this study is to immunologically evaluate the eukaryotic vector pVAX1, carrying the outer membrane protein gene of 31 kDa (Omp31) *B. melitensis*.

**Materials and Methods:** In this study which was carried out in 2014, whole sequence of *omp31* of *B. melitensis* was inserted between *Bam*HI and *Xho*I of pVAX1 plasmid vector. Female BALB/c mice aged 6-8 weeks (purchased from Pasteur Institute of Iran) were immunized intra-muscularly with 100µg of the construct, followed by either protein or plasmid boosters separately. The level of IL-4, IL-12, IFN-γ, total serum IgG, and specific IgG1 and IgG2a against recombinant Omp31 were evaluated. Finally the protective immune response following exposure to *B. melitensis* 16M was evaluated.

**Results:** DNA-vaccine *omp31* career with protein reminders Omp31, stimulate higher levels of IFN-γ, IL-12 and IgG2a compared to groups of DNA-vaccine or recombinant protein. Protective immunity was also significantly higher in mice which immunized with DNA vaccine-protein regimen.

**Conclusions:** Mice which immunized with DNA vaccine-protein regimen showed a significantly higher levels of IL-12 and IFN-γ along with serum IgG2a which together imply augmentation of T cell-mediated immune responses against Omp31. The latter was confirmed by significant protective response to *B. melitensis* 16M challenge.

**KeyWords:** *B. melitensis*, DNA vaccine, Omp31, pVAX1

Copyright © 2017 Iranian Journal of Medical Microbiology. All rights reserved.

### How to cite this article:

Harzandi N, Aghababa H, Khoramabadi N, Tabaraie B. The combined use of recombinant and pVAX-omp31 DNA Vaccine for immunological protection against pathogenic *Brucella melitensis* in an experimental model of BALB/c Mice. Iran J Med Microbiol. 2017; 11 (1): 39-47



Farname Inc.

## استفاده توأم از Omp31 نو ترکیب و DNA-واکسن pVAX-omp31 جهت محافظت

### ایمونولوژیک علیه بروسلا ملی تنسیس در مدل تجربی موش BALB/c

ناصر هرزندی<sup>۱</sup>، هانیه آقابابا<sup>۲</sup>، نیما خرم‌آبادی<sup>۲</sup>، بهمن تبرایی<sup>۳</sup>

۱. گروه میکروبی‌شناسی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران

۲. گروه باکتری‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۳. انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

#### چکیده

#### اطلاعات مقاله

**زمینه و اهداف:** بروسلوزیس یک بیماری مشترک بین انسان و حیوان می‌باشد و ارزیابی آنتی‌ژن‌های مختلف آن از نظر پاسخ‌های ایمنولوژیک و بررسی استراتژی‌های مختلف ایمن‌سازی در طراحی واکسن‌های مؤثر نقشی اساسی دارند. در این تحقیق هدف ما ارزیابی ایمنولوژیک وکتور یوکاریوتی pVAX1 حامل ژن پروتئین غشای خارجی ۲۱ کیلو دالتونی (Omp31) بروسلا ملی تنسیس بود.

**مواد و روش کار:** در این مطالعه که در سال ۱۳۹۲ به انجام رسید توالی ژن *omp31* بروسلا ملی تنسیس در پلاسمید pVAX1 بین جایگاه‌های *BamHI* و *XhoI* کلون شد. از این پلاسمید برای ایمن‌سازی موش‌های ماده ۶-۸ هفته‌ای BALB/c (تهیه شده از بخش حیوانات آزمایشگاهی انستیتو پاستور ایران) به صورت تزریق داخل ماهیچه‌ای ۱۰۰ میکروگرم استفاده شد. تزریق یادآور به دو شکل پلاسمیدی یا پروتئینی در گروه‌های جداگانه انجام گرفت. پس از ایمن‌سازی سنجش سطح  $IFN-\gamma$ ، IL-4، IL-12، ایمنوگلوبولین G تام سرمی و IgG1 و IgG2a نسبت به پروتئین نو ترکیب Omp31 انجام شد. در نهایت پاسخ ایمنی حفاظت کننده به دنبال مواجهه‌سازی با بروسلا ملی تنسیس 16M مورد ارزیابی قرار گرفت.

**یافته‌ها:** DNA-واکسن حامل *omp31* به همراه یادآور پروتئینی Omp31، میزان بیشتری از  $IFN-\gamma$ ، IL-12 و IgG2a را نسبت به گروه‌های دریافت‌کننده DNA-واکسن یا پروتئین نو ترکیب تنها تحریک کرده بود. نتایج چالش با سویه بیماری‌زا نیز حاکی از ایمنی حفاظت بخش بیشتر در گروه دریافت‌کننده DNA-واکسن و پروتئین بود.

**نتیجه‌گیری:** بررسی سطح سایتوکین‌ها حاکی از مقدار بالاتر  $IFN-\gamma$ ، IL-12 در موش‌هایی بود که با رژیم DNA-واکسن و پروتئین نو ترکیب ایمن شده بودند. میزان بالاتر IgG2a سرمی در گروه یاد شده به موازات پاسخ سایتوکینی نشانگر شکل‌گیری ایمنی سلولی در گروه ذکر شده است که پاسخ ایمنی حفاظت بخش در مقابل سویه بیماری‌زای آن را تأیید می‌نماید.

**کلمات کلیدی:** بروسلا ملی تنسیس، DNA واکسن، Omp31، pVAX

کپی‌رایت ©: حق چاپ، نشر و استفاده علمی از این مقاله برای مجله میکروبی‌شناسی پزشکی ایران محفوظ است.

**تاریخچه مقاله**  
دریافت: ۱۳۹۵/۰۳/۰۸  
پذیرش: ۱۳۹۵/۱۱/۲۷  
انتشار آنلاین: ۱۳۹۵/۱۲/۲۶  
**موضوع:**  
میکروبیولوژی مولکولی  
**IJMM 1396; 11(1): 39-47**  
**نویسنده مسئول:**  
دکتر ناصر هرزندی

گروه میکروبی‌شناسی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران

تلفن: ۰۹۸۲۶۳۴۱۸۲۴۰۴

پست الکترونیک:  
[naser.harzandi@kiaiu.ac.ir](mailto:naser.harzandi@kiaiu.ac.ir)

#### مقدمه

آن گوسفند و بز هستند، می‌تواند عامل بیماری شدید در انسان نیز باشد (۲). بروسلوزیس انسانی غالباً از طریق مصرف لبنیات یا غذای آلوده و نیز تماس با حیوانات بیمار رخ می‌دهد (۲). هیچ واکسن تأیید شده‌ای جهت پیشگیری از بروسلوزیس انسانی وجود ندارد و ممانعت از شیوع آن در انسان تنها به واسطه کنترل بیماری در دام‌ها قابل دستیابی است که آن هم به واسطه

گونه‌های بروسلا عوامل بیماری‌زای گرم منفی و داخل سلولی اختیاری هستند که عامل بیماری بروسلوزیس در دام‌ها و انسان می‌باشند (۱). باکتری‌ها پس از ورود به بدن در سیستم رتیکولواندوتلیال میزبان و به خصوص در فاگوسیت‌های تک‌هسته‌ای مستقر می‌شوند. بروسلا ملی تنسیس به عنوان بیماری‌زاترین گونه شناخته می‌شود و اگرچه میزبان‌های ترجیحی

ایمن سازی مدل موشی به طور هم زمان با DNA-واکسن pVAX1 حامل ژن *omp31* و پروتئین نو ترکیب *Omp31* می پردازد.

### مواد و روش ها

این مطالعه در سال ۱۳۹۲ به انجام رسید.

### سویه های باکتریایی و شرایط کشت

اشریشیا کلی  $DH_5\alpha$  و *E. coli* BL21 (DE3) از بانک میکروبی انستیتو پاستور ایران تهیه شدند. برای رشد این سویه ها به شکل متداول، از محیط لوریا-برتانی (LB) استفاده شد. بروسلا ملی تنسیس 16M و بروسلا ملی تنسیس Rev-1 از بانک میکروبی بخش باکتری شناسی دانشگاه تربیت مدرس تهیه گردید. برای کشت این سویه ها از محیط بروسلا آگار و انکوباسیون در دمای ۳۵ درجه سلسیوس استفاده شد (۲۸). کار با سویه های بروسلا، تحت تدابیر ایمنی زیستی سطح ۲ انجام گردید.

### تولید پروتئین نو ترکیب

از پلاسمید نو ترکیب pET28a که حامل توالی کامل ژن کد کننده پروتئین *Omp31* بود جهت تولید پروتئین استفاده شد (۲۳). پلاسمید نو ترکیب وارد سویه بیانی *E. coli* BL21 شد و پس از رشد در محیط مایع LB، تولید پروتئین با افزودن غلظت نهایی ۱ میلی مولار IPTG القا شد. سلول های باکتری ۴ ساعت بعد از القاء و انکوباسیون در شرایط متعادل، با سانتریفوژ جمع آوری و دو بار با سرم نمکی ۰/۹ درصد شستشو داده شدند. توده سلولی حاصله در بافر حاوی اوره ۸ مولار (100mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10mM Tris-HCl, and 8M urea; pH 8.5) حل شد و پس از سانتریفوژ و جداسازی اجزای نامحلول، محتویات با رزین نیکل مجاور شد. مخلوط حاصل پس از یک ساعت مجاورت همراه باهم خوردن مداوم در دمای اتاق به ستون پلی استایرنی منتقل شد. رزین با بافر شستشو (100mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10mM Tris-HCl, and 8M urea; pH 8.5) شستشو داده شد (۲۴). حذف اوره به روش ستون نیکل با استفاده از بافرهای حاوی شیب کاهشی غلظت اوره (۸، ۶، ۴، ۲، ۱ و ۰ مولار اوره) انجام و در نهایت پروتئین ها با استفاده از محلول ایمیدازول ۳۵۰ میلی مولار از ستون جدا و جمع آوری شدند. برای حذف ایمیدازول، محلول پروتئینی در برابر بافر فسفات نمکی (pH 7.4) به مدت یک شب دیالیز شد. خلوص و مقدار پروتئین نو ترکیب به

واکسیناسیون حیوانات و معدوم کردن دام های آلوده انجام می شود. مرسوم ترین واکسن برای کنترل بیماری در دام ها سویه بروسلا ملی تنسیس Rev-1 است که بیماری زایی آن در دام ها نسبت به سویه وحشی بسیار کمتر است. با این حال این سویه قادر است بیماری شدیدی در انسان ایجاد کند که از معضلات مهم آن محسوب می شود و اختلال سرولوژیک در تشخیص بیماری در دام های واکسینه نیز استفاده از آن را تا حدی با مشکل مواجه می سازد (۳،۴).

بروسلا قادر است از شناسایی شدن و متعاقب آن، پاسخ های ایمنی میزبان بگریزد (۵،۶). این باکتری بیماری زا با روش های هوشمندانه ای قادر است پس از فاگوسیت شدن توسط ماکروفاژها، جلوی تخریب و کشته شدن خود را در داخل سلول فاگوسیت بگیرد و به این ترتیب یک عفونت پایدار ایجاد نماید (۷). بنابراین، با توجه به جایگزینی و قدرت بقای باکتری درون ماکروفاژها، پاک سازی آن وابسته به فعال شدن سلول های ماکروفاژی آلوده از طریق ایمنی وابسته به لنفوسیت های T می باشد (۸،۹).

گزارش های متعددی از به کارگیری پروتئین های غشای خارجی به عنوان کاندیدای واکسن های زیر واحدی در دسترس است که نشان دهنده قدرت القای پاسخ های ایمنی از نوع Th-1 و حفاظت بخشی نسبی در برابر سویه های بیماری زا می باشند (۱۰-۱۳). بسیاری از این پروتئین ها قادرند پاسخ های قوی سابتوکینی و ایمونوگلوبولینی از جمله اینترلوکین ۱۲ (IL-12)، اینترفرون گاما (IFN- $\gamma$ ) و IgG2a را در میزبان ایمن شده برانگیزند. نیاز به پاسخ سلولی قوی تر، مشوق برخی پژوهشگران برای استفاده از فن آوری DNA-واکسن شده است (۱۴-۱۸).

پروتئین ۳۱ کیلودالتونی غشای خارجی بروسلا ملی تنسیس (*Omp31*)، ساختاری با قدرت اتصال به همین است (۱۹) که خاصیت آنتی ژنیک داشته و اثرات ایمنی زایی نسبی آن علیه بروسلا قبلاً مورد آزمایش قرار گرفته است (۲۰-۲۲، ۱۸). این واکسن زیر واحدی قادر است پاسخ سلولی ایجاد کند ولی به نظر می رسد با استفاده از DNA-واکسنی که در آن ژن مذکور در یک وکتور کارآمد وارد شده باشد، در کنار تجویز پروتئین نو ترکیب به عنوان واکسن زیر واحدی، بتوان پاسخ ایمنی سلولی و متعاقب آن حفاظت بیشتری علیه سویه بیماری زای بروسلا ملی تنسیس در مدل موشی القا نمود. مطالعه حاضر به بررسی نتیجه

ترتیب با روش SDS-PAGE و اسپکتروفوتومتری تعیین گردید (۲۴).

### ساخت و تولید DNA-واکسن

توالی کامل ژن *omp31* ( accession: CP007762, region: ) 337543-338265; Accession: GQ403950; Accession: HM543515) با استفاده از پرایمرهای پیشرو - AATGGATCCACCACCATGAAGTCCGTAATTTTGG - و معکوس CGTCCATC ACACCTCGAGTTAGAACTTGTAGTTCAGACCGACG که واجد توالی کوزاک پیش از رمز آغاز نیز هستند سنتر و بین جایگاه‌های *BamHI* و *XhoI* در پلاسمید pVAX1<sup>TM</sup> (Invitrogen<sup>TM</sup>, V260-20) کلون شد (۲۵). پلاسمید نو ترکیب pVAX-omp31 پس از تأیید با روش تعیین توالی، به سویه *E. coli* DH<sub>5</sub>α منتقل، تکثیر و با استفاده از کیت EndoFree Plasmid Giga Kit (QIAGEN, Catalog no. 12391) به صورت عاری از اندوتوکسین تخلیص شد. تخلیص پلاسمید طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. غلظت و مقدار پلاسمید نو ترکیب خالص به روش اسپکتروفوتومتری و با استفاده از NanoDrop<sup>TM</sup> ( NanoDrop<sup>TM</sup> 2000; Thermo Scientific, USA) اندازه‌گیری گردید (مقدار پلاسمیدهای تخلیص شده و خلوص آن‌ها توسط سنجش جذب نوری در ۲۶۰، ۲۸۰ و ۲۳۰ نانومتر ارزیابی شد).

### مواجهه گروه‌های آزمون موشی

موش‌های BALB/c ماده ۶ تا ۸ هفته‌ای (خریداری شده از بخش حیوانات آزمایشگاهی انستیتو پاستور ایران) با استفاده از ترکیب کتامین و زایلازین بیهوش شده و ۱۰۰ میکروگرم از پلاسمید نو ترکیب pVAX-omp31 به دو گروه شامل ۱۵ سر موش در هر گروه تزریق شد (۲۹). یکی از گروه‌ها با فاصله دو هفته پس از ایمن‌سازی اولیه، ۲۰ میکروگرم پروتئین نو ترکیب Omp31 فرموله شده در ادجوانت ناقص فروند را به عنوان یادآور و به صورت زیر جلدی دریافت نمودند که این دوز دو هفته بعد نیز تکرار شد. گروه دیگر در فواصل دو هفته‌ای، دوز یادآور پلاسمیدی را مانند ایمن‌سازی اولیه دریافت نمود (۲۸). یک گروه در روزهای صفر، ۱۴ و ۲۸ با ۲۰ میکروگرم پروتئین نو ترکیب Omp31 فرموله شده در ادجوانت فروند و تزریق زیر جلدی ایمن‌سازی شدند. گروه کنترل مثبت، با یک دوز حاوی ۱۰<sup>۴</sup> CFU سویه بروسلا ملی تنسیس Rev-1 به صورت تزریق داخل صفاقی ایمن‌سازی شد. یک گروه غیر ایمن نیز در نظر

گرفته شد که PBS استریل را به صورت تزریق داخل ماهیچه دریافت می‌نمود.

### ارزیابی پاسخ اختصاصی آنتی‌بادی سرمی

ایمونوگلوبولین G تام سرمی به همراه IgG1 و IgG2a با روش ELISA غیرمستقیم و با کمی تغییر نسبت به آنچه پیش‌از این گزارش شده ارزیابی شدند (۲۶). موش‌ها در روزهای صفر، ۱۴، ۲۸، ۴۲، ۵۶، ۷۰، ۸۴ و ۹۸ از طریق شبکه رترواوکولار خون‌گیری شدند (۵ موش از هر گروه). پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای ته صاف Nunc MaxiSorp<sup>®</sup> با ۱۰۰ میکرولیتر محلول PBS حاوی ۵ μg.mL<sup>-1</sup> پروتئین Omp31 نو ترکیب بارگذاری و پس از یک شب انکوباسیون در ۴ درجه سلسیوس با محلول ۰.۵٪ آلبومین گاوی مسدود شدند (۳۷ درجه سلسیوس-یک ساعت). تیر سرمی IgG تام با رقت‌های سریالی ۱:۲ تعیین شد (از آنتی‌بادی ضد IgG موشی با رقت ۱:۲۰۰۰ برای تشخیص استفاده شد). سطح IgG1 و IgG2a با استفاده از کیت‌های ISO-2 (Sigma-Aldrich) ویژه زیر کلاس‌های مذکور و بر اساس دستورالعمل سازنده اندازه‌گیری شد.

### اندازه‌گیری پاسخ سایتوکینی

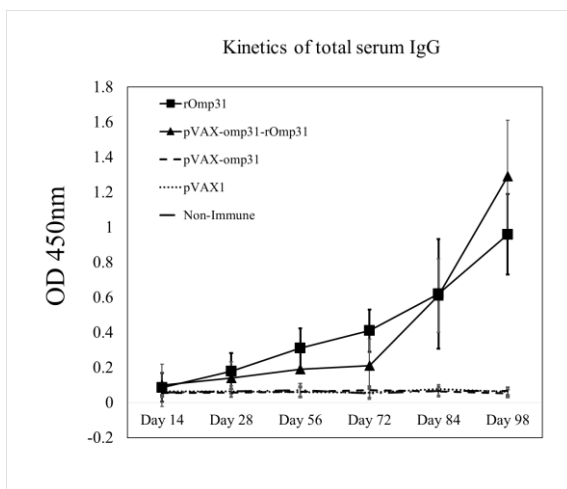
طحال موش‌ها خارج شد و در بافر PBS استریل به صورت سوسپانسیون درآمد و در لوله‌های پلی‌اتیلنی مخروطی (فالکون) برای هر موش به طور جداگانه جمع‌آوری و روی یخ نگهداری شد. سلول‌ها توسط سانتریفوژ در ۳۵۰ ×g به مدت ۱۵ دقیقه در ۴ درجه سلسیوس جمع‌آوری و دو بار با PBS حاوی ۵ درصد FBS شستشو داده شدند. پس از شستشوی آخر، مایع رویی به صورت کامل دور ریخته شد و سلول‌ها در مقدار ناچیز باقیمانده بافر در لوله معلق شدند. از بافر لیز هیپوتونیک جهت حذف گلبول‌های قرمز موش شامل محلول‌های A و B استفاده شد که به این شکل تهیه می‌شود: ۸/۳ گرم از پودر کلرید آمونیم در آب دیونیزه حل و به حجم یک لیتر رسانده شد (محلول A). ۲۰ گرم پودر تریس‌بازی در آب دیونیزه حل و با HCl اسیدیته آن روی ۷/۵ pH تنظیم و به حجم نهایی یک لیتر رسانده شد (محلول B). نسبت ۹۰ درصد از (محلول A) با ۱۰ درصد از (محلول B) مخلوط و ۷/۵ pH تنظیم گردید. بافر توسط فیلتر ۰/۲ استریل و در ۴ درجه سلسیوس نگهداری شد. به محتوای سلولی حاصل از هر لوله، یک میلی‌لیتر بافر هیپوتونیک لیز گلبول‌های قرمز اضافه شد و پس از ۱۲ دقیقه مجاورت در دمای اتاق، با افزودن PBS

One-way Anova و آزمون Games-Howell و LSD انجام گرفت.

#### یافته‌ها

#### ایمونوگلوبولین G اختصاصی سرمی

ایمونوگلوبولین G اختصاصی علیه Omp31 نو ترکیب در سرم و همچنین زیرکلاس‌های IgG با روش ELISA ی غیرمستقیم اندازه‌گیری شدند. گروهی که هم DNA-واکسن و هم پروتئین را دریافت کرده بود تیترا بالایی از IgG سرمی را نشان داد؛ درحالی‌که گروهی که تنها DNA-واکسن را دریافت کرده بودند تیترا قابل توجهی از IgG علیه Omp31 نو ترکیب نداشتند (شکل ۱). تیترا IgG سرمی علیه Omp31 نو ترکیب، در گروهی که پروتئین را دریافت کرده بود، تفاوت معنی‌داری با گروهی که پروتئین و DNA-واکسن را دریافت کرده بود نشان نمی‌دهد. سطح IgG1 در دو گروه اخیر نیز اختلاف معنی‌داری را باهم نشان نمی‌دهد، ولی گروهی که با پروتئین و DNA-واکسن ایمن‌سازی شده بود، به‌طور معنی‌داری، مقدار بالاتری از IgG2a سرمی را تولید نموده بود (شکل ۲).



شکل ۱: تیترا ایمونوگلوبولین اختصاصی تام سرمی علیه Omp31 نو ترکیب. گروه‌های دریافت‌کننده واکسن زیر واحدی تنها و نیز رژیم DNA-واکسن و پروتئین تیترا قابل توجهی از IgG اختصاصی سرمی را نشان دادند ولی اختلاف آن‌ها معنی‌دار نبود ( $p > 0.05$ ). گروهی که فقط با DNA واکسن ایمن شده بودند تیترا محسوسی علیه پروتئین نشان ندادند

حاوی ۵ درصد FBS خنثی شد و سپس در 350×g برای مدت ۱۵ دقیقه در ۴ درجه سلسیوس سانتریفوژ گردید. سلول‌های سفید لوله‌ها با PBS همراه با ۵ درصد FBS دو بار شستشو داده‌شده و در نهایت در محیط RPMI کامل حاوی ۱۰ درصد FBS، اسیدهای آمینه غیر ضروری، پنی‌سیلین-استرپتومایسین و گلوتامین معلق و روی یخ نگهداری شدند. تعداد سلول‌های لنفوسیت شمارش و سوسپانسیون‌های یکنواخت ۴ میلیون سلول در میلی‌لیتر تهیه و به مقدار ۱ میلی‌لیتر در چاهک‌های پلیت کشت سلول ۲۴ خانه‌ای به‌صورت سه‌گانه کشت داده شد. به هر چاهک غلظت نهایی ۵ میکروگرم در میلی‌لیتر از پروتئین نو ترکیب Omp31 اضافه گردید (این مقدار قبلاً از طریق آزمایشات مربوطه در همین آزمایشگاه تعیین و بهینه‌شده بود). کشت‌ها در انکوباتور ۳۷ درجه با اتمسفر حاوی ۵ درصد CO2 برای ۷۲ ساعت نگهداری شدند. سپس محیط رویی کشت سلول‌ها جمع‌آوری، سانتریفوژ و در ۷۰- نگهداری شد. میزان پاسخ IL-4 و IL-12، IFN- $\gamma$  در کشت‌های سلولی با کیت‌های سنجش سایتوکاین موشی (R&D) اندازه‌گیری شد.

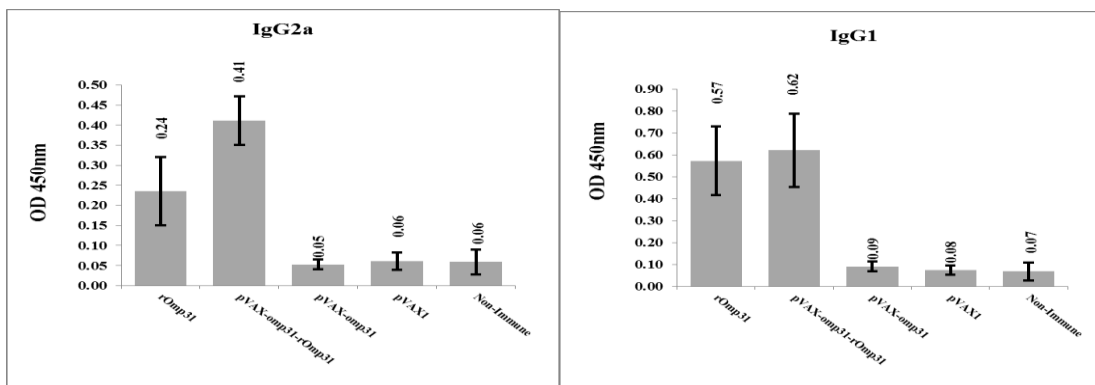
#### ارزیابی ایمنی حفاظت‌کننده

۴ هفته بعد از آخرین تزریق،  $5 \times 10^4$  CFU از سویه بیماری‌زای *Brucella melitensis* 16M به‌صورت تزریق داخل صفاقی به موش‌ها تلقیح شد. سه هفته بعد از مواجهه، موش‌ها به‌وسیله اتر بیهوش و سپس نخاعی گردیدند. بعد از باز کردن شکم، طحال حیوان جدا گردید و در داخل یک پلیت قرار داده شد. یک میلی‌لیتر نرمال سالین استریل به پلیت اضافه گردید و با ته‌سرنگ طحال له شد. از سوسپانسیون درون پلیت رقت‌های ۱/۱۰، ۱/۱۰۰ و ۱/۱۰۰۰ تهیه و بر روی محیط بروسلا آگار در دمای ۳۷°C به همراه ۵٪ CO2 برای سه روز کشت داده شد. تعداد کلنی‌های رشد کرده در هر گروه با توجه به رقت آن به‌صورت لگاریتم در مبنای ۱۰ محاسبه شد.

#### روش‌های آماری

داده‌های مربوط به هر کدام از آزمایشات با نرم‌افزار SPSS IBM 22.0 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. میانگین و شاخص‌های پراکندگی برای داده‌های هر کدام از گروه‌ها محاسبه شد. مقایسه هر کدام از گروه‌ها با همه گروه‌های دیگر از طریق



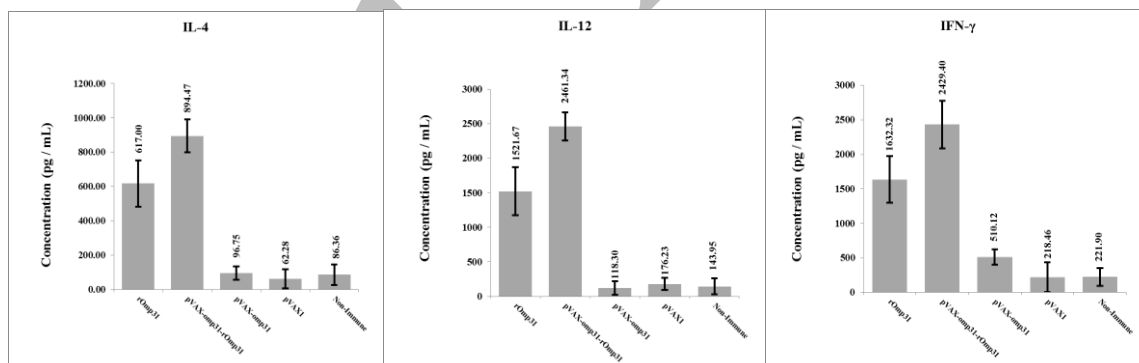


شکل ۲: سطح IgG1 و IgG سرمی اختصاصی علیه Omp31 نوترکیب. گروه‌های دریافت‌کننده واکسن زیر واحدی تنها و نیز رژیم DNA-واکسن و پروتئین اختلاف معنی‌داری در تولید IgG1 نشان ندادند ( $p > 0.05$ ) ولی سطح IgG2a تولیدشده در گروه ایمن شده با رژیم DNA-واکسن و پروتئین با اختلاف معنی‌داری بیشتر از واکسن زیر واحدی تنها بود ( $p < 0.05$ ).

شده با پروتئین نوترکیب تنها و نیز DNA-واکسن تنها بیشتر بود. موش‌های ایمن شده با DNA-واکسن تنها پاسخ‌های سایتوکینی ضعیف‌تری نسبت به گروه ایمن شده با پروتئین نوترکیب نشان دادند (شکل ۳).

### تولید سایتوکین‌ها از لنفوسیت‌های طحالی

تحریک اختصاصی آنتی‌ژنی کشت لنفوسیت‌های طحالی موش‌های ایمن شده با DNA-واکسن و پروتئین نوترکیب سبب تولید سطح بالایی از سایتوکین‌های IL-4، IL-12، و IFN- $\gamma$  شد. سطح پاسخ IL-12 و IFN- $\gamma$  به‌طور معنی‌داری از میزان سایتوکین‌های تولیدشده در کشت لنفوسیت‌های موش‌های ایمن



شکل ۳: سطح اینترلوکین ۴، اینترلوکین ۱۲ و اینترفرون گاما اختصاصی لنفوسیت‌های طحالی نسبت به Omp31 نوترکیب. گروه‌هایی که فقط واکسن زیر واحدی دریافت می‌کردند و نیز گروهی که رژیم DNA-واکسن و پروتئین دریافت می‌کردند اختلاف معنی‌داری در تولید سایتوکین‌ها با گروه‌های دیگر و نیز بین خود این گروه‌ها نشان دادند ( $p < 0.05$ ).

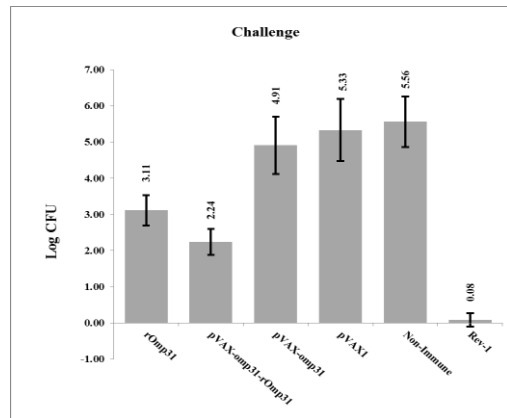
پروتئین تنها ایمن‌سازی شده بودند نیز پاسخ محافظتی معنی‌داری در مقابل سویه بیماری‌زا نشان دادند و در مقایسه این دو، گروه دریافت‌کننده DNA-واکسن و پروتئین حفاظت بیشتری را نشان داد ( $p < 0.05$ ). موش‌هایی که با DNA-واکسن تنها ایمن شده بودند، پاسخ حفاظتی قابل‌ملاحظه‌ای را نشان ندادند.

### پاسخ ایمنی محافظت‌کننده

گروه‌های تحت آزمایش به‌صورت داخل صفاقی با بروسلا ملی تنسیس 16M مواجه گشته و پاسخ ایمنی محافظت‌کننده از طریق بازبایی بروسلاها از طحال موش‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت (شکل ۴). بالاترین میزان حفاظت مربوط به گروه کنترل واکسن Rev-1 بود. موش‌هایی که با DNA-واکسن و پروتئین و نیز

DNA-واکسن و پروتئین ایمن‌سازی شدند، سطح بالایی از IgG اختصاصی سرمی را نشان دادند که تفاوت معنی‌داری بین این دو گروه نداشت. در مقایسه IgG1 و IgG2a که شاخص پاسخ‌های Th1 و Th2 هستند، گروهی که DNA-واکسن و پروتئین Omp31 نوترکیب را دریافت کرده بود، سطح بالاتری از IgG2a را نشان داد که نشان‌دهنده القای پاسخ‌های قوی‌تر سلولی در این گروه می‌باشد. گروهی که تنها با DNA-واکسن ایمن شده بود، پاسخ‌های سرمی قابل‌توجهی نداشت که نشان می‌دهد DNA-واکسن به‌تنهایی قادر به القای پاسخ‌های کافی نمی‌باشد. پاسخ‌های سایتوکینی گروه‌های دریافت‌کننده واکسن نوترکیب زیر واحدی و نیز DNA-واکسن و پروتئین حاکی از توانایی بالای این ترکیبات در القای پاسخ‌های ایمنی در میزبان می‌باشد. بالا بودن سطح IL-12 و IFN- $\gamma$  در گروهی که با DNA-واکسن و پروتئین نوترکیب ایمن شده بود نشان می‌دهد استفاده توأم از این دو ساختار می‌تواند ایمنی سلولی قوی‌تری ایجاد کند. از آنجایی که سلول هدف بروسلها در بدن میزبان، ماکروفاژها می‌باشد، بالاتر بودن میزان IL-12، به نظر می‌رسد موجب تقویت بیشتر فعالیت ماکروفاژی در گروه ایمن شده با DNA-واکسن و پروتئین گردد. Cassataro و همکاران در سه مطالعه پی‌درپی نشان دادند که پروتئین نوترکیب Omp31 قدرت برانگیختن آنتی‌بادی در سرم مدل حیوانی را دارد، و زمانی که از رژیم DNA-واکسن و پروتئین برای ایمن‌سازی استفاده شود، پاسخ‌های قوی‌تری القا می‌شود (۲۹، ۲۱، ۲۰). نتایج مطالعه حاضر نیز مؤید این مطلب است با این تفاوت که استفاده از pVAX1 به‌عنوان وکتور پلاسمیدی یوکاریوتی کارآمدتر از pcDNA و pCI میزان بالاتری از ایمونوگلوبولین G را القا نمود و از طرف دیگر، نسبت IgG2a به IgG1 بیشتر است که نشان‌دهنده قدرت بیشتر pVAX1 در القای ایمنی سلولی می‌باشد. پاسخ‌های سرمی قوی‌تر نسبت به گزارش Doosti و همکاران نیز به همین نحو قابل توجیه است (۱۷).

گروه‌هایی که با رژیم DNA-واکسن و پروتئین نوترکیب و پروتئین تنها ایمن‌سازی شدند، ایمنی حفاظتی قابل‌ملاحظه‌ای در برابر سویه بیماری‌زای بروسلها نشان دادند. بااینکه این میزان حفاظت، از آنچه در مورد واکسن Rev-1 مشاهده شد کمتر می‌باشد، ولی قدرت حفاظت بخشی این آنتی‌ژن را اثبات می‌نماید. رژیم DNA-واکسن و پروتئین نوترکیب Omp31 حفاظت بخشی بالاتری نسبت به واکسن زیر واحدی تنها نشان داد. با توجه به نتایج ارزیابی ایمونوگلوبولین‌های سرمی و



شکل ۴: پاسخ ایمنی محافظت‌کننده پس از مواجهه داخل صفاقی با سویه بیماری‌زای بروسلای ملی تنسیس 16M. بیشترین حفاظت را واکسن Rev-1 ایجاد نمود. گروهی که فقط واکسن زیر واحدی دریافت می‌کرد و نیز گروهی که رژیم DNA-واکسن و پروتئین نوترکیب دریافت می‌کرد حفاظت نسبی علیه سویه بیماری‌زا نشان دادند و اختلاف آن‌ها با هم معنی‌دار بود ( $p < 0.05$ ).

#### بحث

در مطالعه حاضر، ایمن‌سازی مدل موشی با یک رژیم DNA-واکسن و پروتئین نوترکیب در برابر باکتری بروسلای ملی تنسیس مورد ارزیابی قرار گرفته است. بروسلها عوامل بیماری‌زای داخل سلولی هستند که فعال شدن پاسخ‌های ایمنی وابسته به لنفوسیت‌های T برای مهار قدرت بقای داخل سلول و تکثیر آن‌ها ضروری است. گزارش‌های متعددی مبنی بر استفاده از DNA-واکسن‌ها در برانگیختن پاسخ‌های سلولی علیه بروسل وجود دارد که شامل پروتئین‌های غشای خارجی نیز می‌شود (۳۱-۲۷، ۱۶، ۱۵). در این مطالعه از پروتئین غشای خارجی ۳۱ کیلو دالتونی بروسلای ملی تنسیس استفاده شده که گزارش‌هایی مبنی بر ایمنی‌زا بودن آن در دسترس می‌باشد (۲۲، ۱۸). توالی کامل ژن پروتئین در پلاسمید pVAX1 کلون شد که پیش‌از این به‌عنوان یکی از وکتورهای کارا جهت ساخت DNA-واکسن شناخته شده است (۳۳، ۳۲، ۱۴).

در این مطالعه اثر DNA-واکسن در افزایش پاسخ سلولی نسبت به پروتئین Omp31 به‌عنوان یک واکسن زیر واحدی مورد بررسی قرار گرفت. موش‌های BALB/c با DNA-واکسن حامل ژن این پروتئین و نیز پروتئین نوترکیب ایمن‌سازی شدند. استفاده هم‌زمان از DNA-واکسن و پروتئین قبلاً به‌عنوان یک راهکار مؤثر در القای پاسخ‌های ایمنی شناخته شده بود (۲۰). موش‌هایی که با واکسن زیر واحدی Omp31 نوترکیب و نیز

مرتفع نماید. نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که بهینه‌سازی استراتژی واکسیناسیون توأم با DNA-واکسن و پروتئین می‌تواند گامی مؤثر در بهبود عملکرد کاندیداهای واکسن بروسلوزیس باشد. مقایسه میزان حفاظت در مقابل سویه بیماری‌زا که در مطالعه حاضر به‌دست‌آمده با آنچه پیش‌ازاین گزارش شده است، نشان می‌دهد که علاوه بر استفاده از کل ژن جهت ساختن واکسن که دربرگیرنده همه اپی‌توپ‌های مؤثر است، بکار بردن pVAX1 نیز در افزایش قابل‌ملاحظه ایمنی حفاظتی نقش مؤثری دارد.

#### تقدیر و تشکر

این پروژه با حمایت دانشگاه آزاد اسلامی-واحد کرج به انجام رسیده است.

#### تعارض منافع

بین نویسندگان و مجله میکروبی‌شناسی پزشکی ایران هیچ‌گونه تعارض منافی وجود ندارد.

#### References

1. von Bagen K, Gorvel JP, Salcedo SP. Internal affairs: investigating the Brucella intracellular lifestyle. *FEMS Microbiol Rev* 2012; 36(3):533-62.
2. Ramin B, Macpherson P. Human brucellosis. *Bmj* 2010; 341:c4545.
3. Mitka S, Ifantidou A, Chaidouli E, Vavatsi N, Kansouzidou A. Human brucellosis from Rev. 1 vaccine strain. Differentiation of the field Brucella strains from Rev. 1 vaccine strain. *Acta Microbiologica Hellenica* 2005; 50(6):352-64.
4. Schurig GG, Sriranganathan N, Corbel MJ. Brucellosis vaccines: past, present and future. *Vet Microbiol* 2002; 90(1-4):479-96.
5. Martirosyan A, Moreno E, Gorvel JP. An evolutionary strategy for a stealthy intracellular Brucella pathogen. *Immunol Rev* 2011; 240(1):211-34.
6. Celli J. Surviving inside a macrophage: the many ways of Brucella. *Res Microbiol* 2006; 157(2):93-8.
7. Martirosyan A, Gorvel JP. Brucella evasion of adaptive immunity. *Fut Microbiol* 2013; 8(2):147-54.
8. Dornand J, Gross A, Lafont V, Liautard J, Oliaro J, Liautard JP. The innate immune response against Brucella in humans. *Vet Microbiol* 2002; 90(1-4):383-94.
9. Ko J, Splitter GA. Molecular host-pathogen interaction in brucellosis: current understanding and future approaches to vaccine development for mice and humans. *Clin Microbiol Rev* 2003; 16(1):65-78.
10. Sung KY, Jung M, Shin MK, Park HE, Lee JJ, Kim S, et al. Induction of immune responses by two recombinant proteins of brucella abortus, outer membrane proteins 2b porin and Cu/Zn superoxide dismutase, in mouse model. *J Microbiol Biotechnol* 2014; 24(6):854-61.
11. Ibanez AE, Smaldini P, Coria LM, Delpino MV, Pacifico LG, Oliveira SC, Risso GS, Pasquevich KA, Fossati CA, Giambartolomei GH, Docena GH, Cassataro J. Unlipidated Outer Membrane Protein Omp16 (U-Omp16) from Brucella spp. as Nasal Adjuvant Induces a Th1 Immune Response and Modulates the Th2 Allergic Response to Cow's Milk Proteins. *PloS one* 2013; 8(7):e69438.
12. Goel D, Bhatnagar R. Intradermal immunization with outer membrane protein 25 protects Balb/c mice from virulent B. abortus 544. *Mol Immunol* 2012; 51(2):159-68.
13. Kaushik P, Singh DK. Cytokine profile of mice immunized with 28kDa outer membrane protein of brucella melitensis. *Indian Vet J* 2011; 88(8):15-7.



14. Jain S, Afley P, Dohre SK, Saxena N, Kumar S. Evaluation of immunogenicity and protective efficacy of a plasmid DNA vaccine encoding ribosomal protein L9 of *Brucella abortus* in BALB/c mice. *Vaccine* 2014; 32(35):4537-42.
15. Riquelme-Neira R, Retamal-Diaz A, Acuna F, Riquelme P, Rivera A, Saez D, Onate A. Protective effect of a DNA vaccine containing an open reading frame with homology to an ABC-type transporter present in the genomic island 3 of *Brucella abortus* in BALB/c mice. *Vaccine* 2013; 31(36):3663-7.
16. Sisilema-Egas F, Cespedes S, Fernandez P, Retamal-Diaz A, Saez D, Onate A. Evaluation of protective effect of DNA vaccines encoding the BAB1\_0263 and BAB1\_0278 open reading frames of *Brucella abortus* in BALB/c mice. *Vaccine* 2012; 30(50):7286-91.
17. Doosti A, Ghasemi-Dehkordi P, Javadi GR, Sardari S, Shokrgozar MA. DNA vaccine encoding the Omp31 gene of *Brucella melitensis* induces protective immunity in BALB/c mice. *Res J Bio Sci* 2009; 4(1):126-31.
18. Gupta VK, Rout PK, Vihan VS. Induction of immune response in mice with a DNA vaccine encoding outer membrane protein (omp31) of *Brucella melitensis* 16M. *Res Vet Sci* 2007; 82(3):305-13.
19. Delpino MV, Cassataro J, Fossati CA, Goldbaum FA, Baldi PC. *Brucella* outer membrane protein Omp31 is a haemin-binding protein. *Microbes Infect* 2006; 8(5):1203-8.
20. Cassataro J, Velikovskiy CA, Bruno L, Estein SM, de la Barrera S, Bowden R, Fossati CA, Giambartolomei GH. Improved immunogenicity of a vaccination regimen combining a DNA vaccine encoding *Brucella melitensis* outer membrane protein 31 (Omp31) and recombinant Omp31 boosting. *Clin Vaccine Immunol* 2007; 14(7):869-74.
21. Cassataro J, Pasquevich KA, Estein SM, Laplagne DA, Zwerdling A, de la Barrera S, et al. A DNA vaccine coding for the chimera BLSOmp31 induced a better degree of protection against *B. ovis* and a similar degree of protection against *B. melitensis* than Rev.1 vaccination. *Vaccine* 2007; 25(32):5958-67.
22. Estein SM, Cheves PC, Fiorentino MA, Cassataro J, Paolicchi FA, Bowden RA. Immunogenicity of recombinant Omp31 from *Brucella melitensis* in rams and serum bactericidal activity against *B. ovis*. *Vet Microbiol* 2004; 102(3-4):203-13.
23. Khodadadi S, Mohabati Mobarez A, Harzandi N, Tabaraei B, Khoramabadi N, Bakhtiyari A, et al. Cloning and expression of 31 KDa outer membrane protein of *Brucella melitensis* in *E. coli*. *J Ardabil Univ Med Sci* 2012;12(1):33-39
24. Aghababa H, Mohabati Mobarez A, Khoramabadi N, Behmanesh M, Mahdavi M, Tebianian M, et al. A comparative approach to strategies for cloning, expression, and purification of *Mycobacterium tuberculosis* mycolyl transferase 85B and evaluation of immune responses in BALB/c mice. *Mol Biotechnol* 2014; 56(6):487-97.
25. Kozak M. An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic Acid Res* 1987; 15(20):8125-48.
26. Cassataro J, Pasquevich K, Bruno L, Wallach JC, Fossati CA, Baldi PC. Antibody Reactivity to Omp31 from *Brucella melitensis* in Human and Animal Infections by Smooth and Rough Brucellae. *Clin Diagn Lab Immunol* 2004; 11(1):111-4.
27. Al-Mariri A, Abbady AQ. Evaluation of the immunogenicity and the protective efficacy in mice of a DNA vaccine encoding SP41 from *Brucella melitensis*. *J Infect dev Ctries* 2013; 7(4):329-37.
28. Yu DH, Hu XD, Cai H. A combined DNA vaccine encoding BCSP31, SOD, and L7/L12 confers high protection against *Brucella abortus* 2308 by inducing specific CTL responses. *DNA Cell Biol* 2007; 26(6):435-43.
29. Cassataro J, Velikovskiy CA, de la Barrera S, Estein SM, Bruno L, Bowden R, et al. A DNA vaccine coding for the *Brucella* outer membrane protein 31 confers protection against *B. melitensis* and *B. ovis* infection by eliciting a specific cytotoxic response. *Infect Immun* 2005; 73(10):6537-46.
30. Singha H, Mallick AI, Jana C, Isore DP, Goswami TK, Srivastava SK, et al. Escheriosomes entrapped DNA vaccine co-expressing Cu-Zn superoxide dismutase and IL-18 confers protection against *Brucella abortus*. *Microbes Infect* 2008; 10(10-11):1089-96.
31. Luo D, Ni B, Li P, Shi W, Zhang S, Han Y, et al. Protective immunity elicited by a divalent DNA vaccine encoding both the L7/L12 and Omp16 genes of *Brucella abortus* in BALB/c mice. *Infect Immun* 2006; 74(5):2734-41.
32. Saez D, Guzman I, Andrews E, Cabrera A, Onate A. Evaluation of *Brucella abortus* DNA and RNA vaccines expressing Cu-Zn superoxide dismutase (SOD) gene in cattle. *Vet Microbiol* 2008; 129(3-4):396-403.
33. Imani Fooladi AA, Bagherpour G, Khoramabadi N, Fallah Mehrabadi J, Mahdavi M, Halabian R, Amin M, Izadi Mobarakeh J, Einollahi B. Cellular immunity survey against urinary tract infection using pVAX/fimH cassette with mammalian and wild type codon usage as a DNA vaccine. *Clin Exp Vaccine Res* 2014; 3(2):185-93.