Original Article

Iranian Journal of Medical Microbiology

Iran J Med Microbiol: Volume 11, Number 1 (March - April)

Journal homepage: www.ijmm.ir

Farname Inc.

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

Naser Harzandi[1], **Haniyeh Aghababa**[2], **Nima Khoramabadi**[2], **Bahman Tabaraie**[3]

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@kiau.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 immunological 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 *BamHI* and *XhoI* 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.

Downloaded from ijmm.ir at 13:18 +0330 on Monday January 22nd 2018

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

مقاله پژوهشی

مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران

سال ۱۱ – شماره ۱ – فروردین و اردیبهشت ۱۳۹۶

Journal homepage: www.ijmm.ir

Farname Inc.

استفاده توأم از Omp31 نوترکیب و DNA–واکسن pVAX-*omp31* جهت محافظت ایمونولوژیک علیه *بروسلا ملی تنسیس* در مدل تجربی موش BALB/c

ناصر هرزندی[۱]، هانیه آقابابا[۲]، نیما خرم‌آبادی[۲]، بهمن تبرایی[۳]

۱. گروه میکروب‌شناسی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران
۲. گروه باکتری‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۳. انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

اطلاعات مقاله

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 میکروب‌شناسی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران

تلفن: ۰۹۸۲۶۳۴۱۸۲۴۰۴

پست الکترونیک:
naser.harzandi@kiau.ac.ir

چکیده

زمینه و اهداف: بروسلوزیس یک بیماری مشترک بین انسان و حیوان می‌باشد و ارزیابی آنتی‌ژن‌های مختلف آن ازنظر پاسخ‌های ایمونولوژیکی و بررسی استراتژی‌های مختلف ایمن‌سازی در طراحی واکسن‌های مؤثر نقشی اساسی دارند. در این تحقیق هدف ما ارزیابی ایمونولوژیکی وکتور یوکاریوتی pVAX1 حامل ژن پروتئین غشای خارجی ۳۱ 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 ازمایشگاهی انستیتو پاستور ایران)به‌صورت 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-γ، IL-4 و IL-12، ایمونوگلوبولین G تام سرمی و IgG1 و IgG2a نسبت به پروتئین نوترکیب Omp31 انجام شد. درنهایت پاسخ ایمنی حفاظت کننده به دنبال مواجه‌سازی با *بروسلا ملی تنسیس* 16M مورد ارزیابی قرار گرفت.

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

نتیجه‌گیری: بررسی سطح سایتوکین‌ها حاکی از مقدار بالاتر IFN-γ، IL-12 در موش‌هایی بود که با رژیم DNA–واکسن و پروتئین نوترکیب ایمن شده بودند. میزان بالاتر IgG2a سرمی در گروه یادشده به‌موازات پاسخ سایتوکینی نشانگر شکل‌گیری ایمنی سلولی در گروه ذکرشده 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 میکروب‌شناسی پزشکی ایران محفوظ است.

Downloaded from ijmm.ir at 13:18 +0330 on Monday January 22nd 2018

مقدمه

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 به‌خصوص در فاگوسیت‌های تک‌هسته‌ای مستقر می‌شوند. *بروسلا ملی تنسیس* به‌عنوان بیماری‌زاترین گونه شناخته می‌شود و اگرچه میزبان‌های ترجیحی 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 تأییدشده‌ای جهت پیشگیری از بروسلوزیس انسانی وجود ندارد و ممانعت از شیوع آن در انسان تنها به‌واسطه کنترل بیماری در دام‌ها قابل دست‌یابی است که آن‌هم به‌واسطه

Downloaded from ijmm.ir at 13:18 +0330 on Monday January 22nd 2018

واکسیناسیون حیوانات و معدوم کردن دام‌های آلوده انجام می‌شود. مرسوم‌ترین واکسن برای کنترل بیماری در دام‌ها سویه *بروسلا ملی تنسیس* Rev-1 است که بیماری‌زایی آن در دام‌ها نسبت به سویه وحشی بسیار کمتر است. بااین‌حال این سویه قادر است بیماری شدیدی در انسان ایجاد کند که از معضلات مهم آن محسوب می‌شود و اختلال سرولوژیک در تشخیص بیماری در دام‌های واکسینه نیز استفاده از آن را تا حدی با مشکل مواجه می‌سازد (۳،۴).

بروسلا قادر است از شناسایی شدن و متعاقب آن، پاسخ‌های ایمنی میزبان بگریزد (۵،۶) . این باکتری بیماری‌زا با روش‌های هوشمندانه‌ای قادر است پس از فاگوسیته شدن توسط ماکروفاژها، جلوی تخریب و کشته شدن خود را در داخل سلول فاگوسیت بگیرد و به‌این‌ترتیب یک عفونت پایدار ایجاد نماید (۷). بنابراین، با توجه به جایگزینی و قدرت بقای باکتری درون ماکروفاژها، پاک‌سازی آن وابسته به فعال شدن سلول‌های ماکروفاژی آلوده از طریق ایمنی وابسته به لنفوسیت‌های T می‌باشد (۸،۹).

گزارش‌های متعددی از به‌کارگیری پروتئین‌های غشای خارجی به‌عنوان کاندیدای واکسن‌های زیر واحدی در دسترس است که نشان‌دهنده قدرت القای پاسخ‌های ایمنی از نوع Th-1 و حفاظت بخشی نسبی در برابر سویه‌های بیماری‌زا می‌باشند (۱۰-۱۳). بسیاری از این پروتئین‌ها قادرند پاسخ‌های قوی سایتوکینی و ایمونوگلوبولینی ازجمله اینترلوکین ۱۲ (IL-12)، اینترفرون گاما (IFN-γ) و IgG2a را در میزبان ایمن شده برانگیزند. نیاز به پاسخ سلولی قوی‌تر، مشوق برخی پژوهشگران برای استفاده از فن‌آوری DNA-واکسن شده است (۱۴-۱۸).

پروتئین ۳۱ کیلودالتونی غشای خارجی *بروسلا ملی تنسیس* (Omp31)، ساختاری باقدرت اتصال به هِمین است (۱۹) که خاصیت آنتی‌ژنیک داشته و اثرات ایمنی‌زایی نسبی آن علیه *بروسلا* قبلاً مورد آزمایش قرارگرفته است (۲۰-۲۲، ۱۸). این واکسن زیر واحدی قادر است پاسخ سلولی ایجاد کند ولی به نظر می‌رسد با استفاده از DNA-واکسنی که در آن ژن مذکور در یک وکتور کارآمد واردشده باشد، در کنار تجویز پروتئین نوترکیب به‌عنوان واکسن زیر واحدی، بتوان پاسخ ایمنی سلولی و متعاقب آن حفاظت بیشتری علیه سویه بیماری‌زای *بروسلا ملی تنسیس* در مدل موشی القا نمود. مطالعه حاضر به بررسی نتیجه ایمن‌سازی مدل موشی به‌طور هم‌زمان با DNA-واکسن pVAX1 حامل ژن *omp31* و پروتئین نوترکیب Omp31 می‌پردازد.

مواد و روش‌ها

این مطالعه در سال ۱۳۹۲ به انجام رسید.

سویه‌های 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 سویه‌ها به شکل متداول، از محیط لوریا-برتانی (LB) استفاده شد. *بروسلا ملی تنسیس* 16M و *بروسلا ملی تنسیس* Rev-1 از بانک میکروبی بخش باکتری‌شناسی دانشگاه تربیت مدرس تهیه گردید. برای کشت این سویه‌ها از محیط بروسلا آگار و انکوباسیون در دمای ۳۵ درجه سلسیوس استفاده شد (۲۸). کار با سویه‌های بروسلا، تحت تدابیر ایمنی زیستی سطح ۲ انجام گردید.

تولید پروتئین نوترکیب

از پلاسمید نوترکیب pET28a که حامل توالی کامل ژن کد کننده پروتئین Omp31 بود جهت تولید پروتئین استفاده شد (۲۳). پلاسمید نوترکیب وارد سویه بیانی *E. coli* BL21 شد و پس از رشد در محیط مایع LB، تولید پروتئین با افزودن غلظت نهایی ۱ میلی‌مولار IPTG القا شد. سلول‌های باکتری ۴ ساعت بعد از القاء و انکوباسیون در شرایط متعادل، با سانتریفوژ جمع‌آوری و دو بار با سرم نمکی ۰/۹ درصد شستشو داده شدند. توده سلولی حاصله در بافر حاوی اوره ۸ مولار (100mM NaH2PO4, 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 پلی‌استایرنی منتقل شد. رزین با بافر شستشو (100mM NaH2PO4, 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 درنهایت پروتئین‌ها با استفاده از محلول ایمیدازول ۳۵۰ میلی‌مولار از ستون جدا و جمع‌آوری شدند. برای حذف ایمیدازول، محلول پروتئینی در برابر بافر فسفات نمکی (pH 7.4) به مدت یک‌شب دیالیز شد. خلوص و مقدار پروتئین نوترکیب به

Final Proof

Downloaded from ijmm.ir at 13:18 +0330 on Monday January 22nd 2018

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 - AATGGATCCACCACCATGAACTCCGTAATTTTGG CGTCCATC و معکوس - ACACTCGAGTTAGAACTTGTAGTTCAGACCGACG CG که واحد توالی کوزاک پیش از رمز آغاز نیز هستند سنتز و بین جایگاه‌های *Bam*HI و *Xho*I در پلاسمید pVAX1™ (Invitrogen™, V260-20) کلون شد(۲۵). پلاسمید نوترکیب pVAX-*omp31* پس از تأیید با روش تعیین توالی، به سویه *E. coli* DH$_5$α منتقل، تکثیر و با استفاده از کیت EndoFree Plasmid Giga Kit (QIAGEN, Catalog no. 12391) به‌صورت عاری از اندوتوکسین تخلیص شد. تخلیص پلاسمید طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. غلظت و مقدار پلاسمید نوترکیب خالص به روش اسپکتروفوتومتری و با استفاده از NanoDrop (NanoDrop™ 2000; Thermo Sientific, 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 ازمایشگاهی انستیتو پاستور ایران) با استفاده از ترکیب کتامین و زایلازین بیهوش شده و ۱۰۰ میکروگرم از پلاسمید نوترکیب pVAX-*omp31* به دو گروه شامل ۱۵ سر موش در هر گروه تزریق شد (۲۹). یکی از گروه‌ها بافاصله دو هفته پس از ایمن‌سازی اولیه، ۲۰ میکروگرم پروتئین نوترکیب Omp31 فرموله شده در ادجوانت ناقص فروند را به‌عنوان یادآور و به‌صورت زیر جلدی دریافت نمودند که این دوز دو هفته بعد نیز تکرار شد. گروه دیگر در فواصل دوهفته‌ای، دوز یادآور پلاسمیدی را مانند ایمن‌سازی اولیه دریافت نمود (۲۸). یک گروه در روزهای صفر، ۱۴ و ۲۸ با ۲۰ میکروگرم پروتئین نوترکیب Omp31 فرموله شده در ادجوانت فروند و تزریق زیر جلدی ایمن‌سازی شدند. گروه کنترل مثبت، با یک دوز حاوی 10^4 CFU سویه *بروسلا ملی تنسیس* Rev-1 به‌صورت تزریق داخل صفاقی ایمن‌سازی شد. یک گروه غیر ایمن نیز در نظر گرفته شد که PBS استریل را به‌صورت تزریق داخل ماهیچه دریافت می‌نمود.

ارزیابی پاسخ اختصاصی آنتی‌بادی سرمی

ایمونوگلوبولین G تام سرمی به همراه IgG1 و IgG2a با روش ELISA ی غیرمستقیم و باکمی تغییر نسبت به آنچه پیش‌ازاین گزارش‌شده 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® با ۱۰۰ میکرولیتر محلول PBS حاوی ۵ $\mu g.mL^{-1}$ پروتئین Omp31 نوترکیب بارگذاری و پس از یک‌شب انکوباسیون در ۴ درجه سلسیوس با محلول ۵٪ آلبومین گاوی مسدود شدند (۳۷ درجه سلسیوس–یک ساعت). تیتر 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 به‌صورت سوسپانسیون درآمد و در لوله‌های پلی‌اتیلنی مخروطی (فالکون) برای هر موش به‌طور جداگانه جمع‌آوری و روی یخ نگهداری شد. سلول‌ها توسط سانتریفوژ در g× ۳۵۰ 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 به‌صورت 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

Final Proof

Downloaded from ijmm.ir at 13:18 +0330 on Monday January 22nd 2018

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 درنهایت در محیط RPMI کامل حاوی ۱۰ درصد FBS، اسیدهای آمینه غیرضروری، 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 نوترکیب 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 IFN-γ، IL-12 و IL-4 درکشت‌های سلولی با کیت‌های سنجش سایتوکاین موشی (R&D) اندازه‌گیری شد.

ارزیابی ایمنی حفاظت کننده

۴ هفته بعد از آخرین تزریق، CFU $۵×۱۰^{۴}$ 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 ته سرنگ 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.

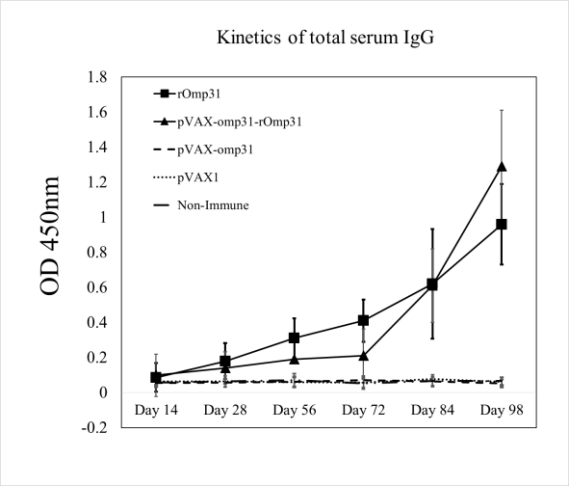
روش‌های آماری

داده‌های مربوط به هرکدام از آزمایشات با نرم‌افزار SPSS 22.0 IBM مورد تجزیه‌وتحلیل قرار گرفت. میانگین و شاخص‌های پراکندگی برای داده‌های هرکدام از گروه‌ها محاسبه شد. مقایسه هرکدام از گروه‌ها با همه گروه‌های دیگر از طریق One-way Anova و آزمون Games-Howell و LSD انجام گرفت.

یافته‌ها

ایمونوگلوبولین G اختصاصی سرمی

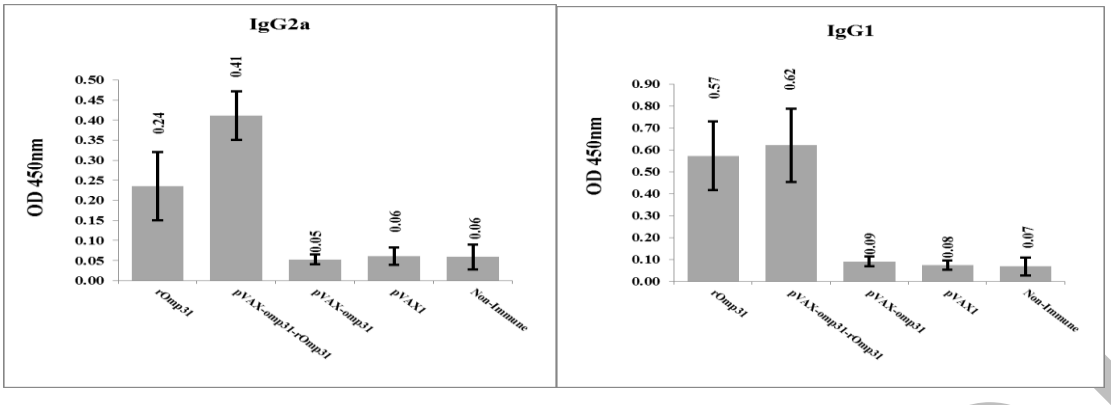
ایمونوگلوبولین G اختصاصی علیه Omp31 نوترکیب در سرم و همچنین زیرکلاس‌های IgG با روش ELISA ی غیرمستقیم اندازه‌گیری شدند. گروهی که هم DNA-واکسن و هم پروتئین را دریافت کرده بود تیتر بالایی از IgG سرمی را نشان داد؛ درحالی‌که گروهی که تنها DNA-واکسن را دریافت کرده بودند تیتر قابل‌توجهی از IgG علیه Omp31 نوترکیب نداشتند (شکل ۱). تیتر IgG سرمی علیه Omp31 نوترکیب، 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: تیتر ایمونوگلوبولین اختصاصی تام سرمی علیه Omp31 نوترکیب. گروه‌های دریافت‌کننده واکسن زیر واحدی تنها و نیز رژیم DNA-واکسن و پروتئین تیتر قابل‌توجهی از IgG اختصاصی سرمی را نشان دادند ولی اختلاف آن‌ها معنی دار نبود ($p>0.05$). گروهی که فقط با DNA واکسن ایمن شده بودند تیتر محسوسی علیه پروتئین نشان ندادند

Final Proof

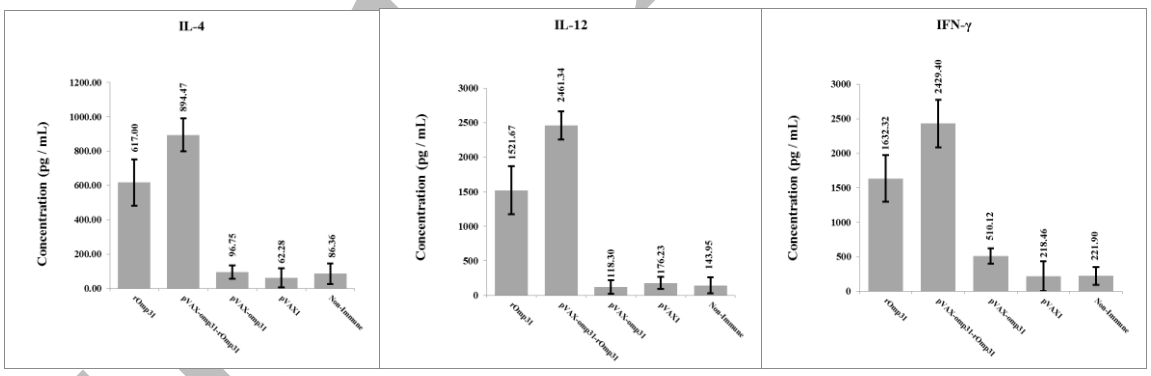
Downloaded from ijmm.ir at 13:18 +0330 on Monday January 22nd 2018



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 ($p<0.05$).

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-γ شد. سطح پاسخ IL-12 و IFN-γ به‌طور معنی‌داری از میزان سایتوکین‌های تولیدشده درکشت لنفوسیت‌های موش‌های ایمن 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).

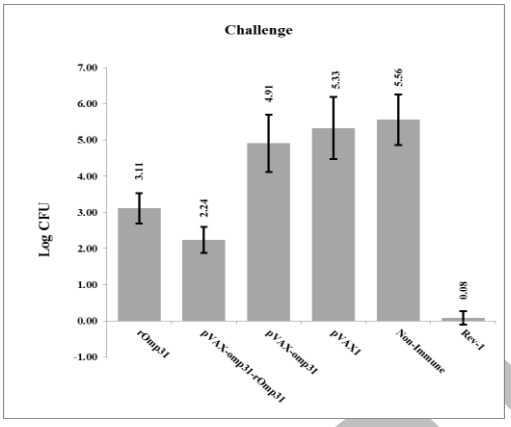


شکل ۳: سطح اینترلووکین ۴، اینترلوکین ۱۲ و اینترفرون گاما اختصاصی لنفوسیت‌های طحالی نسبت به Omp31 نوترکیب. گروه‌هایی که فقط واکسن زیر واحدی دریافت می‌کردند و نیز گروهی که رژیم DNA-واکسن و پروتئین دریافت می کرداختلاف معنی‌داری در تولید سایتوکین‌ها با گروه‌های دیگر و نیز بین خود این گروه‌ها نشان دادند ($p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

پاسخ ایمنی محافظت‌کننده

گروه‌های تحت آزمایش به‌صورت داخل صفاقی با *بروسلا ملی تنسیس* 16M مواجه گشته و پاسخ ایمنی محافظت‌کننده از طریق بازیابی 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 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.

Final Proof



شکل ۴: پاسخ ایمنی محافظت‌کننده پس از مواجهه داخل صفاقی با سویه بیماری‌زای بروسلا 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 باهم معنی دار بود ($p<0.05$).

بحث

در مطالعه حاضر، ایمن‌سازی مدل موشی با یک رژیم DNA-واکسن و پروتئین نوترکیب در برابر باکتری *بروسلا ملی تنسیس* مورد ارزیابی قرارگرفته است. *بروسلاها* 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 *بروسلا* وجود دارد که شامل پروتئین‌های غشای خارجی نیز می‌شود (۱۵،۱۶،۲۷-۳۱). در این مطالعه از پروتئین غشای خارجی ۳۱ کیلو دالتونی *بروسلا ملی تنسیس* استفاده‌شده که گزارش‌هایی مبنی بر ایمنی‌زا بودن آن در دسترس می‌باشد (۲۲, ۱۸). توالی کامل ژن پروتئین در پلاسمید pVAX1 کلون شد که پیش‌ازاین به‌عنوان یکی از وکتورهای کارا جهت ساخت DNA-واکسن شناخته‌شده است (۱۴،۳۲،۳۳).

در این مطالعه اثر DNA-واکسن در افزایش پاسخ سلولی نسبت به پروتئین Omp31 به‌عنوان یک واکسن زیر واحدی موردبررسی 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 شناخته‌شده بود (۲۰). موش‌هایی که با واکسن زیر واحدی Omp31 نوترکیب 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-γ 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. ازآنجایی‌که سلول هدف بروسلاها 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 بروسلا نشان دادند. بااینکه این میزان حفاظت، ازآنچه 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

Downloaded from ijmm.ir at 13:18 +0330 on Monday January 22nd 2018

Final Proof

سایتوکین‌های طحالی، موش‌هایی که واکسن زیر واحدی و DNA-واکسن را دریافت کرده‌اند، پاسخ‌های وابسته به لنفوسیت‌های T بیش ازآنچه در واکسن زیر واحدی تنها مشاهده می‌شود فعال‌شده است و پاسخ ایمنی حفاظتی نیز ثابت می‌کند استفاده از DNA-واکسن، می‌تواند در افزایش پاسخ مؤثر نسبت به واکسن زیر واحدی نوترکیب نقش داشته باشد. Cassataro و همکاران و نیز Doosti و همکاران نتایج مشابهی را در القای سایتوکین‌های شاخص ایمنی وابسته به لنفوسیت‌های T گزارش نموده‌اند (۱۷،۲۰،۲۱،۲۹).

استفاده از DNA-واکسن باوجوداینکه می‌تواند پاسخ‌های وابسته به لنفوسیت T ایجاد کند، به‌تنهایی قادر نخواهد بود سطح ایمنی لازم برای مقابله با بروسلاهای داخل سلولی را فراهم آورد. موارد زیادی از واکسن‌های زیر واحدی نوترکیب علیه *بروسلا* استفاده‌شده که آن‌ها نیز نتوانسته‌اند ایمنی کاملی نسبت به این باکتری بیماری‌زا ایجاد نمایند (۱۷،۲۰،۲۱،۲۹). تجمیع قابلیت‌های این دودسته از عوامل ایمن‌زا ممکن است بتواند تا حدی ضعف کاندیداهای واکسن زیر واحدی علیه این عفونت داخل سلولی را 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 گزارش‌شده 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 میکروب‌شناسی پزشکی ایران هیچ‌گونه تعارض منافعی وجود ندارد.

References

1. von Bargen 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.

Downloaded from ijmm.ir at 13:18 +0330 on Monday January 22nd 2018

Final Proof

Downloaded from ijmm.ir at 13:18 +0330 on Monday January 22nd 2018

Final Proof

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. Sislema-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, Velikovsky 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, Velikovsky 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.