مقاله پژوهشی

مجله میکروب شناسی پزشکی ایران

سال ۷ – شماره ۱ – بهار ۱۳۹۲

Journal homepage: www.ijmm.ir

مطالعه فعالیت باکتری‌کشی سرمی OMPs *بروسلا آبورتوس* RB51 همراه با واکسن زنده *بروسلا آبورتوس* RB51

عنوان کوتاه : مطالعه فعالیت باکتری‌کشی سرمی OMPs بروسلا آبورتوس

فهیمه قلیزاده بالدرلو[۱]– حجت احمدی*[۲]– بهمن تبرایی[۲] –مهدی نجاتی[۲]– مهدی ساداتی[۱]– سارا زاهدنیا[۲]

۱. دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات کردستان،کردستان، ایران

۲. بخش واکسن‌های باکتریایی و تهیه آنتی ژن، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

اطلاعات مقاله

تاریخچه مقاله

دریافت : ۹۲/۳/۲۱

پذیرش:۹۲/۳/۳۰

انتشارآنلاین :۱۳۹۲/۰۸/۱۵

IJMM 1392; 7(1): P 28-34

نویسنده مسئول :

حجت احمدی

بخش واکسن‌های باکتریایی و تهیه آنتی ژن، انستیتو پاستور ایران

تلفن: ۰۹۱۲۲۹۷۲۲۳۵

پست الکترونیک:

hojiahmadi@yahoo.com

چکیده

زمینه و اهداف: : واکسیناسیون در مبارزه علیه بروسلوز نقش اساسی دارد. با توجه به مشکلات درمان و پایین بودن کارایی واکسنهای موجود، می توان از برخی اجزاء دیواره سلولی بروسلا، برای مثالOuter Membrane Protein به عنوان ایمونوژن در تهیه واکسن استفاده کرد. بدین منظور در تحقیق حاضر میزان ایمنی زایی هومورال ترکیب OMPs *بروسلا آبورتوس* RB51 با واکسن زنده *بروسلا آبورتوس* RB51 با استفاده از آزمون باکتری‌کشی سرم مورد ارزیابی قرار گرفته است.

مواد و روش کار: در این مطالعه ابتدا سویهRB51 *Brucella abortus* درمحیط کشت بروسلا آگار کشت شد، سپسOMPs این باکتری به روش سدیمN–لوریل سارکوزینات استخراج شد وOMPs با واکسن زندهRB51 ترکیب و به عنوان واکسن ترکیبی ,امورد استفاده قرار گرفت. سپس بمنظور بررسی ایمنی زایی به تعدادی موش و خرگوش تزریق گردید. در روزهای۱۵، ۰، ۳۰ و ٤٥ خونگیری از خرگوش ها به عمل آمده و سرم ها جمع آوری و در نهایت تیتر باکتری کشی سرم ها به روش باکتری‌کشی سرم اندازه گیری شد. همچنین تزریق بروسلا آبورتوس سویه 544 بیماریزا به موش ها به منظور چالش و کشت طحال انجام شد.

یافته ها: داده‌های حاصل از آزمون باکتری‌کشی سرم نشان داد که ایمنی هومورال بسیار خوبی بصورت تیتر باکتری کشی برعلیه واکسن ترکیبی نسبت به واکسن زندهRB51 ایجاد شده و در کشت طحال کاهش تعداد کلنی‌های گروه واکسینه شده با واکسن ترکیبی قابل توجه است. تجزیه و تحلیل نتایج آنالیز واریانس، اختلاف معنی داری بین گروهها با (p <۰/۰۵) نشان می دهد.

نتیجه‌گیری: نتایج آزمون باکتری‌کشی سرم نشان داد برخلاف تحقیقات قبلی، هم واکسن ترکیبی و هم واکسن زندهRB51 توانایی فعال سازی ایمنی هومورال را داشته و واکسن ترکیبی، ایمنی هومورال بیشتری نسبت به واکسن زندهRB51 دارا است و این بدلیل اثر سینرژیسمی این واکسن است.

کلمات کلیدی: OMPs، باکتری‌کشی سرم، واکسن زنده *بروسلا آبورتوس RB51*

کپی رایت © : حق چاپ، نشر و استفاده علمی از این مقاله برای مجله میکروب شناسی پزشکی ایران محفوظ است.

مقدمه

بروسلوز هنوز در زمره معضلات بهداشتی دراکثر کشورهای جهان است و به عنوان بیماری مشترک بین انسان و دام شناخته می‌شود. عامل این بیماری باکتری بروسلا است (۳-۱). گونه‌های اصلی این جنس شامل *بروسلا آبورتوس* در گاو، *بروسلا ملیتنسیس* در بز، *بروسلا سوئیس* در خوک، *بروسلا کانیس* در سگ بیماری زا هستند (۵،۴). امروزه کنترل بیماری بروسلوز بر سه اصل کشتن دام‌های آلوده، پاستوریزه کردن محصولات لبنی و واکسیناسیون استوار است واکسیناسیون دام ها بر پایه تلقیح سویه‌های زنده ضعیف شده *بروسلا آبورتوس*(S19، RB51) و بروسلا ملیتنسیس (Rev1) است که استفاده از این واکسن‌ها در

دام با محدودیت هایی (تولید آنتی‌بادی های پس از واکسیناسیون، سقط جنین و کارایی پایین) همراه است(۶،۷).

دراین راستا، شاخص‌های آنتی‌ژنی دیوارهٔ سلولی مثل پروتئین‌های غشای خارجی به عنوان کاندیداهای بالقوه برای طراحی واکسن‌های موثرتر مورد توجه قرار گرفته اند(۸). این مطالعه روی ارزیابی میزان ایمنی زایی هومورال ترکیب OMPs بروسلا آبورتوس RB51 با واکسن زنده *بروسلا آبورتوس*RB51 با استفاده از آزمون باکتری‌کشی سرم متمرکز شده است. OMPs به عنوان آنتی‌ژن های حفاظتی محسوب شده و براساس وزن مولکولی به سه گروه عمده طبقه بندی می‌شوند :گروه۱با وزن مولکولی۹۴-۸۸کیلودالتون، گروه ۲ با وزن مولکولی ۳۸-۳۶ کیلودالتون به عنوان پورین ها و گروه ۳ با وزن مولکولی ۳۴- ۳۱ و ۲۷-۲۵ کیلودالتون (۱۱-۹). OMPs جزء ترکیبات ساختاری باکتری هستند و بعنوان فاکتورهای بیماری‌زایی عمل کرده و پاسخ‌های ایمنی را القاء می‌کنند. بدلیل اینکه بروسلا فاقد پیلی، فلاژل و کپسول می باشد، بیشترین میزان پاسخ‌های سیستم ایمنی علیه ترکیبات ساختاری دیواره آن (ازجمله OMP) ایجاد می‌شود (۱۲).

Cassataro و همکاران در سال ۲۰۰۴، نشان دادند که OMP31 از سویه‌های S و R از *بروسلا ملیتنسیس* در انسان و جانوران، ایمنی زایی زیادی دارد (۱۳).

دکتر تبرایی و دکتر احمدی و همکاران در سال ۱۹۹۴ ایمن سازی موش با پورین های *سالمونلا تیفی* را مورد بررسی قرار دادند، که لنفوسیت های این حیوان نسبت به پورینها پاسخ مثبت داد.

وینتر در سال ۱۹۸۳ نشان داد پروتئین های غشاء خارجی *بروسلا آبورتوس* در مقایسه با غشاء خارجی و سلول کامل بروسلا، عیار آنتی‌بادی بالاتری را ایجاد کرده است.

Caro-Hernandez و همکاران در سال ۲۰۰۷ نقش omp31/omp25 را درخصوصیات غشای خارجی و ویرولانس *بروسلا اویس* نشان دادند (۱۴).

در واکسن زنده RB51، که سویه‌ای ناصاف است پروتئین های غشای خارجی آن به خوبی در معرض سیستم ایمنی هستند. طی تحقیقات قبلی مشخص شده است که این واکسن توانایی فعالسازی ایمنی هومورال را نداشته و همچنین ایمنی هومورال در حفاظت بخشی بر علیه بروسلوز نقش چندانی ندارد. بلکه ایمنی سلولی تحریک شده برعلیه این پروتئین ها نقش اصلی حفاظت را برعهده دارند. در واقع در تحقیقات قبلی که جهت بررسی ایمنی هومورال بروسلا انجام شده است اکثراً از روش الیزا استفاده گردیده است که دراین روش از LPS خالص بروسلا به عنوان آنتی ژن برای سنجش تیتر آنتی‌بادی استفاده شده است که این روش می تواند فقط تیتر آنتی‌بادی ایجاد شده برعلیه LPS را نشان دهد و نه برعلیه OMPs (۱۵)، اما در روش پیشنهادی ما یعنی سنجش باکتری‌کشی سرم، تیتر باکتری‌کشی (تیتر آنتی‌بادی‌هایی از کلاس‌های مختلف برعلیه آنتی‌ژن های بروسلا که از رشد و تکثیر باکتریها جلوگیری می نماید) برعلیه تمام عوامل آنتی‌ژنیک که میزان عمده آنOMPs است ارزیابی می‌شود(سویهRB51 سویه‌ای کاملاً خشن است که درسطح خود LPS کامل ندارد). بنابراین روش سنجش باکتری‌کشی سرم می تواند هم میزان آنتی ژنیسیته و هم ایمونوژنیسیته (ایمنی هومورال) عوامل آنتی ژنیک ازجمله OMPs را نشان دهد که در روش های دیگر این گونه نیست و نیز چون آزمون الیزا که امروزه انجام می گیرد و بر پایه آنتی ژن LPS است نمی تواند نتایج دقیقی در آزمایشات واکسن های ساخته شده با سویهRB51 که یک سویه خشن بدونLPS کامل است نشان دهد، روش باکتری‌کشی سرم طراحی و مورد ارزیابی قرار گرفت. از این رو واکسن زنده RB51 را با OMPs استخراج شده از *بروسلا آبورتوس RB51* ترکیب نموده تا اثر سینرژیسمی آن، بر روی ایمنی هومورال با استفاده از آزمون باکتری‌کشی سرم بررسی گردد.

مواد و روش ها:

سویه های باکتریایی و شرایط کشت:

سویه خشن *بروسلا آبورتوس*RB51 و سویه *بروسلا آبورتوس*544 از مرکز کلکسیون سویه‌های استاندارد بخش واکسن‌های باکتریایی و تهیه آنتی‌ژن انستیتو پاستور ایران تهیه شد. سویه *بروسلا آبورتوس RB51* ابتدا در محیط کشت بروسلا آگار در دمای°C ۳۷ به مدت۷۲ ساعت کشت داده شد. سپس به منظور تهیه بذر سلولی محتوای باکتری در یک لیتر بروسلا براث به تعلیق درآمد و ۵ میلی لیتر بذر به هر بطری بوات دورو که

حاوی مقدار کافی بروسلا آگار بود، اضافه و به مدت۷۲ ساعت درانکوباتور°C ۳۷ کشت داده شد.محتوای باکتری جمع آوری و دو مرتبه شستشو داده شد به این ترتیب توده سلولی تهیه گردید(۱۶).

استخراج OMPs بروسلا آبورتوس RB51 :

جهت استخراج OMPs، ۲۵ گرم بیوماس سلولی *بروسلا آبورتوس*RB51 در۷/۵ برابر وزن مرطوب خود با تریس بافر۰/۱مولار حاوی اتیلن دی آمین تتراکلرواستیک اسید۱۰ میلی مولار (EDTA) W/V بصورت تعلیقی یکنواخت درآمد. سپس با قدرت۱۰۰ ٪ به فاصله نیم دقیقه به مدت۴دقیقه سونیکه انجام شد و در دور۳۵۰۰rpmبه مدت۳۰ دقیقه در°C ۴سانتریفوژ گردید. سپس مایع سانتریفوژ شده عاری ازسلول به مدت۱ساعت در دورrpm ۴۲۰۰۰و°C ۴ اولتراسانتریفوژ شد. و تعلیقی از رسوب به دست آمده را در۲۰میلی لیتر سدیمN-لوریل سارکوزینات۲ درصد و تریس بافر۰/۱مولار حاویEDTA ۱۰میلی مولار تهیه گردید و دردمای اتاق به مدت۱ساعت نگهداری شد. سپس در دورrpm ۴۲۰۰۰ به مدت ۱ساعت و°C ۴ سانتریفوژ شد. OMPs ته نشین شده را در۱۵میلی لیترآب مقطرحل نموده و برعلیه NaCl ۰/۲مولار با سه تعویض در هر ۸ ساعت به مدت۲۴ساعت در°C ۴دیالیز نموده و نمونه دیالیز شده با عبور از فیلتر میلی پور ۰/۲۲ میکرون در ویالهای۲۰و۵۰ میلی لیتری تقسیم گردید و درفریزر°C ۲۰- نگهداری شد (۱۸-۱۶).

تعیین غلظت پروتئین در نمونه استخراج شده :

غلظت پروتئین با روش برادفورد و با استفاده از بوین سرم آلبومین به عنوان استاندارد پروتئین تعیین شد. حجم های۵۰ و۱۰۰ میکرولیتر از نمونه مورد آزمایش به صورت دو تایی در لوله های آزمایش ریخته و به لوله اول۵۰ میکرولیتر آب مقطر افزوده و سپس۱میلی لیتر معرف برادفورد به لوله ها افزوده و جذب لوله های مجهول نیز در ۵۹۵ نانومتر قرائت شد و با استفاده از منحنی استاندارد غلظت نمونه های مجهول محاسبه گردید.

SDS-PAGE

سدیم دودسیل سولفات پلی آکریل آمید ژل الکتروفورزیس روی ژل۱۲٪ و با مقایسه مارکر پروتئینی استاندارد به منظور تعیین وزن مولکولی نمونه OMPs استخراج شده انجام گردید (۲۰،۱۹).

۱- تهیه واکسن ترکیبی(ترکیبOMP با واکسن زنده):

۵۰۰ میکروگرم از OMPs خالص *بروسلا آبورتوس*RB51 تخلیص شده به روش سدیم N- لوریل سارکوزینات با ۱۰ میلی لیتر از واکسن زنده RB51 (دارای رقت CFU/ml ۱۰^۸) مخلوط شد (۲۳-۲۱).

ایمونیزاسیون :

الف- تزریق به خرگوش: ۲ گروه دوتایی خرگوش سفید نیوزلندی با وزن۲کیلوگرم انتخاب شدند. به گروه اول۱میلی لیتر واکسن زنده RB51و به گروه دوم۱میلی لیتر واکسن ترکیبی حاوی۵۰ میکروگرمOMP به صورت زیرجلدی تزریق شد. به گروه دوم در روز۱۵ به مقدار۱۰۰میکروگرم در میلی لیترOMP به صورت زیرجلدی تزریق گردید. خونگیری از قلب خرگوش ها در زمانهای۰ ، ۱۵ ،۳۰ و ۴۵ روز بعد از تزریق اول در شرایط کاملاً استریل انجام شد و با استفاده از سانتریفوژ سرم ها جدا شد و در یخچال°C ۴ نگهداری شدند.

ب- تزریق به موش: ۳ گروه پنج تایی موش سفیدBALB/C با وزن ۲۰- ۱۸گرم که همه آنها ماده بودند، انتخاب شدند. به گروه اول ۵/ ۰میلی لیتر واکسن زنده RB51 و به گروه دوم ۰/۵ میلی لیتر واکسن ترکیبی حاوی۲۵ میکروگرم OMP و به گروه سوم۰/۵میلی لیتر سرم فیزیولوژی به صورت زیر جلدی تزریق شد. به گروه دوم در روز ۱۵ به مقدار۵۰ میکروگرم در ۰/۵ میلی لیترOMP به صورت زیرجلدی تزریق گردید.

آزمون بررسی فعالیت باکتری‌کشی سرم خرگوش های واکسینه شده (SBA):

سرم ها ابتدا در ۵۶ درجه سلسیوس به مدت نیم ساعت غیرفعال شد و از هر سرم در میکروپلیت ۹۶ خانه ای استریل در هر ردیف با استفاده ازDPBS (بافر فسفات سالین دالبکوس) رقتهای سریالی در ۸ خانه تا رقت ۱۲۸تهیه گردید. به هر چاهک حاوی سرم، ۵۰ میکرولیتر سوسپانسیون باکتریایی حاوی CFU/ml ۱۰^۳ و۵۰ میکرولیتر سرم نوزاد خرگوش (به عنوان منبع کمپلمان خارجی) افزوده شد. بعد از اضافه نمودن سرم حیوان واکسینه شده، سوسپانسیون باکتری (CFU/ml ۱۰^۳) و منبع کمپلمان خارجی (حجم کل۱۵۰ میکرولیتر) به هرویال میکروپلیت و مخلوط نمودن کامل آنها، میکروپلیت به مدت یک

ساعت در ۳۷ °C انکوبه گردید. هم چنین کنترل منفی، کنترل سلولی، کنترل سرمی، کنترل کمپلمان و کنترل باکتریایی نیز گذاشته شد. پس از یک ساعت ۱۰۰ میکرولیتر از هر ویال به پلیت حاوی بروسلا آگار منتقل گردید و به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ °C انکوبه شد.

پلیت هائی که تعداد کلنی های رشد یافته در آنها ۵۰ درصد یا کمتر از کلنی های پلیت کنترل باکتریایی بود رقت سرمی آنها تیتر مثبت در نظر گرفته شد (۲۶-۲۴).

تزریق *بروسلا آبورتوس* سویه 544 بیماریزا به موش ها:

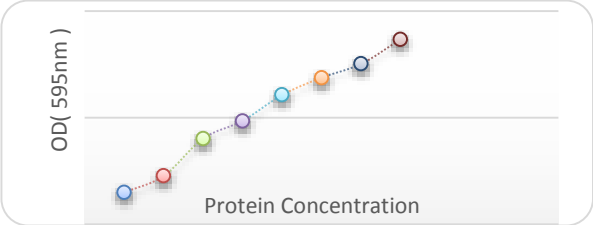
سویه استاندارد *بروسلا آبورتوس*544 در محیط بروسلا آگار به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ °C انکوبه شد. از آن سوسپانسیونی تازه در PBS (pH=۶/۴) تهیه شد. سپس با استفاده از استاندارد مک فارلند آن را به رقت CFU/ml ۵×۱۰^۵ رساندیم.

برای بررسی شمارش باکتری های طحال، ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون تهیه شده به دو گروه موش واکسینه شده و گروه کنترل تزریق گردید. این تزریق داخل صفاقی و دو هفته پس از آخرین تزریق، در موش های هر ۳ گروه انجام گردید.

چهار هفته بعد از چالش، طحال موش های هر گروه را خارج نموده و با استفاده از سرم فیزیولوژی رقتهای متفاوت از آن تهیه گردید و از رقت های فوق به پلیت حاوی بروسلا آگار منتقل شد و در دمای ۳۷ °C به مدت ۷۲ ساعت انکوبه گردید. پس از این مدت تعداد کلنی های باکتریهای رشد یافته شمارش گردید و تعداد آن درعکس رقت ضرب شده و میانگین تعداد هرگروه موش محاسبه شد(۲۷).

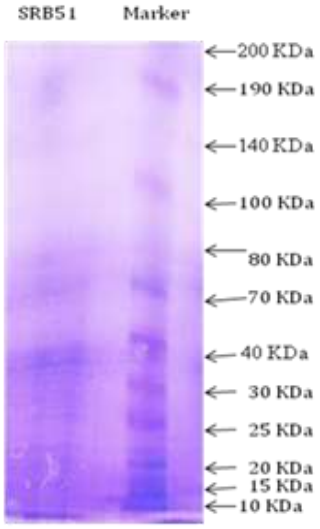
یافته‌ها:

غلظت پروتئین موجود در نمونه، با روش برادفورد و با استفاده از بوین سرم آلبومین به عنوان استاندارد درطول موج ۵۹۵ نانومتر، برابر µg/ml ۳۰۵۵ بود. (نمودار شماره ۱)



نمودار ۱: نمودار استاندارد برادفورد با استفاده از بوین سرم آلبومین

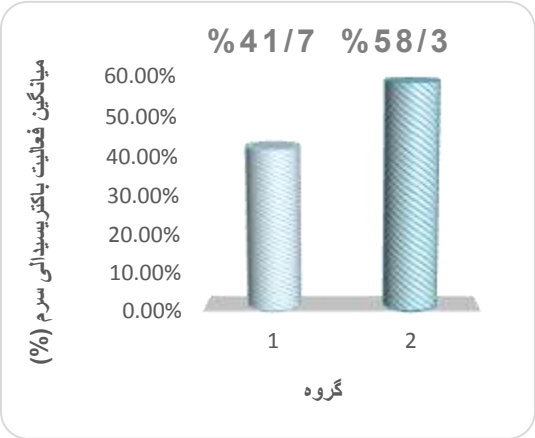
آنالیزSDS – PAGE نمونه روی ژل پلی آکریل آمید۱۲٪، در مقایسه با مارکر پروتئینی، باندهای نسبتاً قوی در محدوده ۱۴ تا ۱۰۷ کیلو دالتون را نشان داد (شکل شماره ۱)



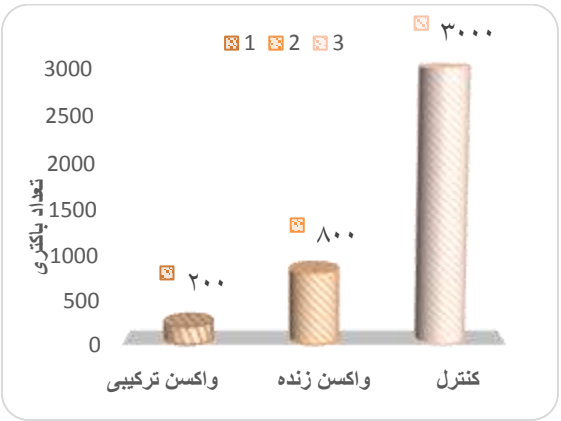
شکل ۱ الگوی SDS-PAGE الکتروفورز از *OMPs بروسلا آبورتوس* RB51 در ژل ۱۲٪ . ستون a : ۱۰ میکرولیتر از نمونه *OMP* - ستون b مارکر های استاندارد

نتایج آزمون باکتریسیدال اسی نشان داد هر دو گروه توانایی فعال سازی ایمنی هومورال را داشته با این وجود واکسن زنده به تنهایی تأثیر کمی در القاء سنتز آنتی‌بادی باکتریسیدال دارد، اما بصورت ترکیبی (OMP به همراه واکسن زنده) تأثیر بیشتری دارد به این ترتیب روش آماری t- test نشان دهنده اختلاف معنی داری در میانگین فعالیت باکتری‌کشی سرم در دو گروه است (p<۰/۰۵) (نمودار شماره ۲).

نتایج کشت طحال نشان داد تعداد باکتریهای جدا شده از طحال گروه واکسینه شده با واکسن ترکیبی به میزان محسوسی پایین تر از گروه واکسینه شده با واکسن زنده است (نمودار شماره ۳).



نمودار ۲: مقایسه میانگین فعالیت باکتری‌کشی سرم برعلیه سویه ۵۴۴ *بروسلا آبورتوس* در سرم ۲ گروه خرگوش ایمن شده پس از تزریق واکسن ترکیبی و واکسن زند(گروه ۱: واکسن زنده، گروه ۲ : واکسن ترکیبی)



نمودار ۳: مقایسه میانگین باکتری های شمارش شده در طحال موش های واکسینه شده

بحث

واکسیناسیون در مبارزه علیه بروسلوز، نقشی اساسی دارد. در حال حاضر پیشگیری از بروسلوز در گاو و گوسفند با بکارگیری دو نوع واکسن زنده تخفیف حدت یافته بروسلا انجام می گیرد، که شامل واکسن زنده ضعیف شدهS19 از *بروسلا آبورتوس* و واکسن زنده ضعیف شدهRB51 است(۲۸).

ازآنجا که این باکتری درون سلولی بوده بنابراین واکسنی ارزشمند است که بتواند ایمنی سلولی و هومورال را با هم فعال سازد. واکسنS19 ایمنی هومورال را فعال می سازد و یکی از معایب آن تولید آنتی‌بادی های پس از واکسیناسیون بوده که مشکلات ناشی از آن همیشه مطرح است. واکسن زندهRB51 طبق تحقیقات قبلی، محرک ایمنی سلولی بوده و قابلیت ایمنی زایی هومورال را ندارد (۲۹،۳۰).

معمولاً در مطالعات قبلی که انجام گرفته گزارش شده ایمنی هومورال در حفاظت بخشی واکسن ها برعلیه بروسلوز نقش مهمی ندارد، اما ما در این مطالعه با انجام آزمایش باکتری‌کشی سرم نشان دادیم که ایمنی هومورال، با ایجاد آنتی‌بادی برعلیه OMPs و هم آنتی‌بادی باکتری کش از انتشار و وارد شدن بروسلا به داخل سلول و ایجاد بیماری جلوگیری می نماید که این موضوع با بررسی کاهش کلنی ها در نتایج کشت طحال موش های واکسینه شده به خوبی مشهود است. در روش الیزا چنانچه قبلاً گفته شدLPS بروسلا به عنوان آنتی ژن جهت سنجش میزان تیتر ایمنی هومورال مورد بررسی قرار می گیرد که در واکسنی که از سویه RB51 تهیه شده OMPs به عنوان آنتی ژن در ایجاد ایمنی هومورال نقش دارد، بنابراین اگر از روش الیزا جهت سنجش تیتر آنتی‌بادی بخواهیم استفاده نماییم باید ازOMPs خالص استفاده کنیم(۳۱).

با انجام آزمون باکتری‌کشی سرم در این تحقیق مشخص شد که هم واکسن زندهRB51 وهم واکسن ترکیبی توانایی فعالسازی ایمنی هومورال را داشته، و هم چنین ایمنی هومورال در حفاظت بخشی بر علیه برسلوز از طریق ایجاد آنتی‌بادی های باکتری کش نقش مهمی دارد که این ایمنی هومورال بدلیل وجود اثر سینرژیسمی در واکسن ترکیبی تشدید و تقویت می شود. بنابراین این واکسن ترکیبی هم می تواند بر مشکلات موجود غلبه نمود و هم نسبت به واکسن های قبلی ایمنی بهتری در دامها ایجاد نمایید.

نتایج آزمون باکتری‌کشی سرم نشان می دهد که واکسن ترکیبی و واکسن زندهRB51 قابلیت ایجاد ایمنی هومورال را داشته و این ایمنی دارای نقش حفاظت بخشی است این یافته ها همچنین بیان می نماید ایمنی هومورال در واکسن ترکیبی تقویت شده و می توان از آن به جای واکسن زنده RB51 در واکسیناسیون استفاده کرد.

References:

1. Corbel MJ. Brucellosis: an overview. Emerg Infect Dis. 1997; 3(2): 213-21.
2. Young EJ. An overview of human brucellosis. Clin Infect Dis. 1995; 21: 283-9.
3. Arenas GN, Staskevich AS, Aballay A, Mayorga L. Intracellular trafficking of Brucella abortus in J774 macrophages. Infect Immun. 2000; 68(7): 4255-63.
4. Corbel MJ. Brucella. In: Parker MT, Collier LH, (eds), Topley and Wilson's principles of bacteriology, virology, and immunology. 8th ed, London, Arnold. 1990; 339-53.
5. Siadat SD, Aghasadeghi MR, Karami S, Sadat SM, Moshiri A. Biological and immunological characteristics of Brucella abortus S99 major outer membrane proteins. Jundishapur J Microbiol. 2011; 4 (1): 29-36.
6. Lapaque N, Moriyon I, Moreno E, Gorvel JP. Brucella lipopolysaccharide acts as a virulence factor.Opin Microbial. 2005 Feb; 8(1): 60-6.
7. Ragan VE. The animal and plant health inspection service (APHIS) brucellosis eradication program in the United States.Vet Microbiol. 2002 Dec; 90(1-4): 11-8.
8. Cloeckaert A, Zygmunt MS, de wergifosse P, Dubray G, Limet JN. Demonstration of peptidoglycan-associated Brucella outer-membrane proteins by use of monoclonal antibodies. J Gen Microbiol. 1992; 138(7):1543-50.
9. Gamazo C, vitas AI, Moriyon I, Lopez–Goni I, Diaz R. Brucella group 3 outer membrane proteins containa heat-modifiable protein. FEMS Microbiol Lett. 1993; 112(2): 141-6.
10. Salhi I, Boigegerain RA, Machold J, weise C, cloeckaert A, Rouot B. Characterization of new members of the group 3 outer membrane protein family of Brucella spp. Infect Immun. 2003; 71(8): 4326-32.
11. Douglas JT, Rosenberg EY, Nikaido H, Verstreate DR, Winter AJ. Porins of Brucella species. Infect Immun. 1984; 44(1): 16-21.
12. Jap BK, Walian P.J. Structure and functional mechanism of porins. Physiol Rev. 1996;76(4):1073-88.
13. Cassataro J, et al. Antibody Reactivity to Omp31 from Brucella melitensis in Human and Animal Infections by Smooth and Rough Brucellae. Clinical & Vaccine Immunology. 2004; 11(1): 111-114.
14. Carlo-Hernandez P. et al. Role of the Omp25/Omp31 Family in Outer Membrane Properties and Virulence of Brucella ovis. Infection & Immunity. 2007; 75(8): 4050-4061.
15. Siadat SD, Shirdast H, Aghasadeghi MR, Norouzian D, Atyabi SM, Sadat SM, et al. Determination of cytokine profile following the immunization with Brucella abortus S99 lipopolysaccharide_Neisseria meningitidis serogroup B outer membrane vesicle complex in animal model. J medical Sciences. 2010; 10(3):223-231.
16. 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): 578-80.
17. Sharifat Salmani A, Siadat SD, Norouzian D, Izadi Mobarakeh J, Kheirandish M, et al. Outer Membrane Vesicle of Neisseria meningitides serogroup B as an adjuvant to induce specific antibody response againstthe lipopolysaccharide of Brucella abortus S99. Annals of Microbiology. 2009; 59(1): 145-149.
18. Siadat SD, Norouzian D, Tabaraei B, Behzadiannejad Q, Ahmadi H, Najar-Peerayeh S, et al. Compractive studies of conjugated capsular polysaccharide of Neisseria meningitidis serogroup B. Res J Microbiol. 2007; 2(4): 337-45.
19. Moriyon I, Berman DT. Effects of nonionic, ionic, and dipolar ionic detergents and EDTA on the Brucella cell envelope. J Bacteriol. 1982; 152(2): 822-8.
20. Verstreate DR, winter AJ. Comparison of sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis profiles and antigenic relatedness among outer membrane proteins of 49 Brucella abortus strains. Infect Immun. 1984; 46(1): 182-7.
21. -Ariful Islam MD, Minara Khatun MST, Baek BK, Lee SI. Efficacy of strain RB51 vaccine in protecting infection and vertical transmission against Brucella abortus in Sprague-Dawley rats. J. Vet. Sci. 2009; 10(3): 211-218.
22. Moriyona L, Grillo MJ, Monreal D, Gonzalez D, Marin C, Lopez-Goni I, et al. Rough vaccines in animal brucellosis: Structural and genetic basis and present status. Vet. Res. 2004; 35: 1–38.
23. Mark G, Mitchell V, Pogh JR. Immune Responses and Resistance to Brucellosis in Mice Vaccinated Orally with Brucella abortus RB51. Infection & Immunity. 1996; 64(11) : 4534-4541.
24. Behzadiyannejad Q, Siadat SD, Ahmadi H, et al. Comparison Among Opsonic Activity and Serum Bactericidal Activity Against Meningococci in Rabbit sera from Vaccines After Immunization with Outer Memberane Vesicle of Neisseria meningitides serogroup B. Res J Microbiol. 2008; 3(3): 105- 113.
25. Rezaei N, Aghamohammadi A, Nejati M, Ahmadi H, et al. Serum Bactericidal Antibody Responses to Meningococcal Polysaccharide Vaccination as a Basis for Clinical Classification of Common Variable Immunodeficiency. American Society for Microbiology. 2008; 607-611.
26. Ahmadi H, Tabaraie B, Maleknia S, Shapouri R, Nejati M, PoorMirza Gholi F, et al. Immunological evaluation of Vi capsularpolysaccharide of Salmonella enterica subsp. Typhi vaccine by serum bactericidal assay. Journal of Medical Microbiology (2013); 62: 000–000

27. Al-Mariri A. Protection of BALB/CMice against Brucella abortus 544 Challenge By Vaccination with Bacterioferritin or P39 Recombinant Proteins with CpG Oligodeoxynucleotides as Adjuvants. Infection & Immunity. 2001; 69(8): 4816-482.
28. World Health Organization. Fact sheet N173. 1997. World Health organization, Geneva, Switzerland
29. Bhattacharjee KA. Protection of mice against brucellosis by intranasal immunization With Brucella melitensis lipopolysaccharide as a noncovalent complex with Neisseria meningitidis group B outer membrane-protein. Infec Immun. 2002; 70(7): 3324-3336.
30. Pasquevich KA, Estein SM, Garcia Samartino C, Zwerdling A, Coria LM, Barrionuevo P, et al. Immunization with recombi-nant Brucella species outer membrane protein Omp16 or Omp19 in adjuvant induces specific CD4+ and CD8+ T cells as well as systemic and oral protection against Brucella abortus infection. Infect Immun. 2009; 77(1): 436-45.
31. Guilloteau LA, Laroucau K, Vizcaino N, Jacques I, Dubray G. Immunogenicity of recombinant Escherichia coli express-ing the omp31 gene of Brucella melitensis in BALB/c mice. Vaccine. 1999; 17(4): 353-61.