

## Evaluation of the immunogenicity of *Brucella abortus* P39 gene in Balb/c mice

Abtahi H(Ph.D)<sup>1\*</sup>, Salmanian A(Ph.D)<sup>2</sup>, Rafati S(Ph.D)<sup>3</sup>, Mosayebi G (Ph.D)<sup>1</sup>  
Amouzandeh AR(MD)<sup>4</sup>

1- Molecular and Medicine Research Center, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran

2- National Research Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran

3- Department of Immunology, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

4- Department of Microbiology, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran

Received:12 Oct 2011, Accepted:28 Dec 2011

### Abstract

**Background:** *Brucella* is a gram-negative intracellular bacterium. Since *Brucella* brings about health and socio-economic problems, its control is of primary importance. The common method of vaccination includes using live attenuated strains of this bacterium. This study was done to evaluate the immunogenicity of *Brucella abortus* P39 gene in Balb/c mice.

**Materials and Methods:** In this experimental study, P39 gene was amplified by polymerase chain reaction (PCR) method and after extraction, it was sub-cloned to eukaryotic expression vector pcDNA3. The intramuscular injection of the obtained plasmid to the Balb/c mice was done in three stages. After the last vaccination, immunologic tests, such as proliferative response in lymphocytes, IFN- $\gamma$  assessment, IL-5, and determination of IgG2a and IgG1, were run.

**Results:** The level of activation in splenic lymphocytes response was 3.6 and the measured IFN- $\gamma$  was 3 ng/ml, whereas IL-5 was insignificant. IgG2a and IgG1 titers were 1.640 and 1.40, respectively.

**Conclusion:** The findings of the immunological analysis show the appropriate immune response in Balb/c mice model after the injection of P39 gene containing plasmid. The immune system response was in Th1 form which decreased the number of bacteria in spleen. Therefore, P39 gene is of appropriate immunogenicity and DNA vaccination is efficient in the activation of cell immune response against this bacterium.

**Keywords:** *B. abortus*, DNA vaccine, P39 protein

\*Corresponding author:

Address: Molecular and Medical Research Center, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran

Email: abtahi@arakmu.ac.ir

## بررسی ایمنی زایی ژن P۳۹ بروسلا آبور توس در موش بلب سی

حمید ابطی<sup>۱\*</sup>، علی هاتف سلمانیان<sup>۲</sup>، سیما رفتی<sup>۲</sup>، قاسم مسیبی<sup>۳</sup>، علیرضا آموزنده<sup>۴</sup>

- ۱- استادیار، دکترای باکتری شناسی پزشکی، مرکز تحقیقات پزشکی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران
- ۲- دانشیار، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فن آوری تهران، ایران
- ۳- استاد، دکترای ایمنی شناسی، گروه ایمنی شناسی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
- ۴- دانشیار، دکترای ایمنی شناسی پزشکی، مرکز تحقیقات پزشکی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران
- ۵- استادیار، متخصص بیماری های عفونی، گروه میکروبی شناسی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران

تاریخ دریافت ۹۰/۷/۲۰، تاریخ پذیرش ۹۰/۱۰/۷

### چکیده

**زمینه و هدف:** بروسلا باکتری های گرم منفی داخل سلولی می باشند. با توجه به معضلات بهداشتی، اقتصادی و اجتماعی بروسلا، کنترل این بیماری از اهمیت خاصی برخوردار است. واکسیناسیون رایج شامل استفاده از سویه های زنده و ضعیف شده این باکتری ها است. در این تحقیق سعی بر آن است تا ایمنی زایی ژن P۳۹ بروسلا آبور توس در موش بلب سی بررسی شود.

**مواد و روش ها:** این مطالعه یک بررسی تجربی می باشد که ابتدا با استفاده از PCR ژن P۳۹ تکثیر گردید و سپس در ناقل یوکاریوتیکی pcDNA۳ کلون شد. پلاسمید به دست آمده در سه مرحله به موش های بلب سی به صورت عضلانی تزریق گردید. پس از آخرین واکسیناسیون آزمون های ایمنولوژیک از جمله پاسخ تکثیر لنفوسیتی، سنجش انترفرون گاما و انترلوکین ۵ و تعیین عیار IgG۱ و IgG۲a انجام شد.

**یافته ها:** میزان ضریب تحریکی در پاسخ تکثیر لنفوسیتی برابر ۳/۶، انتر فرون گاما اندازه گیری شده برابر ۳ نانوگرم بر میلی لیتر و انتر لوکین ۵ به مقدار ناچیزی بود. تیترا IgG۲a برابر ۱/۶۴۰ و تیترا IgG1 برابر ۱/۴۰ به دست آمد.

**نتیجه گیری:** نتایج مربوط به آزمون های ایمنولوژیک نشان دهنده تحریک مناسب سیستم ایمنی موش پس از تزریق پلاسمید حاوی ژن P۳۹ است. تحریک سیستم ایمنی از نوع Th۱ بوده که تعداد باکتری های طحال را نیز کاهش داده است. بنابراین پروتئین P۳۹ نقش ایمنی زایی نسبتاً خوبی را دارد. استفاده از روش DNA Vaccine در تحریک ایمنی سلولی علیه این باکتری قابل توجه است.

**واژگان کلیدی:** بروسلا آبور توس، واکسن DNA، پروتئین P۳۹

\* نویسنده مسئول: اراک، دانشگاه علوم پزشکی اراک، مرکز تحقیقات پزشکی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی اراک، گروه باکتری شناسی پزشکی

Email: abtahi@arakmu.ac.ir

## مقدمه

بروسلا باکتری‌های گرم منفی و داخل سلولی اختیاری هستند که باعث بروز بروسلوز در انسان و حیوانات می‌شوند. با این که بروسلوز در محدوده جغرافیایی خاصی گسترش دارد ولی در بسیاری از مناطق از جمله نواحی مدیترانه‌ای، آسیای غربی و بخش‌هایی از آفریقا و آمریکای لاتین هنوز از مشکلات اصلی بهداشتی بشمار می‌آید (۱).

شیوع واقعی بروسلوز در انسان کاملاً مشخص نیست. گزارشات به دست آمده از مناطق آندمیک بسیار متغیر است. کنترل بروسلوز بر اساس شناسایی و حذف حیوانات آلوده، پاستوریزاسیون محصولات لبنی و واکسیناسیون حیوانات اهلی است. اولین واکنش موثر بروسلا سویه زنده ضعیف شده بروسلا آبورتوس S19 بود. گرچه این واکنش باعث حفاظت دام در برابر بروسلا آبورتوس می‌گردد ولی عوارض ناشی از آن باعث شده است تا استفاده آنها در دام‌ها با احتیاط انجام گردد و در عین حال تجویز آن در انسان ممنوع باشد (۲، ۳).

بنابر این تحقیق برای ساخت واکنش‌های سالم‌تر و موثرتر برای کنترل این عفونت در حیوانات و انسان ضروری به نظر می‌رسد. دستیابی به این هدف یعنی واکنش‌های جدید بروسلوز نیازمند بررسی شاخص‌های اصلی آنتی ژنیک بروسلا است (۴).

پروتئین P39 با وزن حدود ۴۱ کیلودالتون یکی از اجزاء مهم بروسلرژن (Brucellergene) است. ژن سازنده این پروتئین با ۱۲۰۵ باز اولین بار توسط دانیل (Donoel) شناخته و ترادف آن تعیین گردید. پروتئین P39 در واقع در فضای پری پلاسمیک قرار گرفته است (۵). این پروتئین از عوامل مهم ایمنی‌زا بر علیه بروسلا بشمار می‌آید.

امروزه ثابت شده است که ایمنی موثر در برابر پاتوژن‌های داخل سلولی نظیر بروسلا نیازمند ایجاد ایمنی سلولی با تحریک پاسخ‌های Th1 است. انتر فرون گاما (یکی از سیتوکاین‌های اصلی در پاسخ‌های Th1) نقش عمده‌ای را در فعالیت ضد بروسلا بازی کرده و (همراه با

TNF $\alpha$ ) از عوامل اصلی مصونیت در برابر گونه‌های بروسلا است.

واکنش‌های DNA، به علت تولید طولانی مدت آنتی ژن قادر به تحریک پاسخ‌های ایمنی سلولی و هومورال در زمان طولانی هستند. واکنش‌های DNA قادر به تولید آنتی ژن به شکل ایمنو ژنیک خود هستند که در نتیجه در کنار ملکول‌های سازگار نسجی کلاس یک و دو عرضه می‌شوند.

در این مطالعه، تهیه یک ساختار پلاسمیدی بیانی یوکاریوتی (pcDNA3) همراه با ژن‌های بیان کننده پروتئین P39 انجام گرفته و توانایی ساختار فوق، در تحریک پاسخ‌های ایمنی و مصون کننده در موش بالب سی (Balb/c) بررسی شده است.

## مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی باکتری‌ها و پلاسمیدهای مورد استفاده شامل بروسلا آبورتوس سویه S19 (تهیه شده از انستیتو پاستور ایران)، اشریشیا کلی سویه DH5 $\alpha$  و اشریشیا کلی سویه BL21 (تهیه شده از مرکز ملی تحقیقات ژنتیک و تکنولوژی زیستی) می‌باشند. جهت کلونینگ اولیه و تعیین ترادف ژن مورد مطالعه از پلاسمید pSK<sup>+</sup> و جهت تولید پروتئین P39 از پلاسمید pcDNA3 استفاده شد. پلاسمیدهای ذکر شده از مرکز ملی مهندسی ژنتیک و تکنولوژی زیستی تهیه شد. آنزیم‌ها و پرایمرهای مورد استفاده در این تحقیق از شرکت سیناژن تهیه گردید.

تخلیص کروموزوم بروسلا آبورتوس با استفاده از CTAB/NaCl و تکثیر ژن P39 با استفاده از PCR انجام گردید (منبع تولید پروتئین). تکثیر ژن فوق با استفاده از پرایمرهای جلو (Forward) و عقب (Reverse) زیر انجام شد:

Forward: 5'GCC GGA TCC ATG GGC GCC TGT TGC CAA 3'  
Reverse: 5' C CGC CTC GAG TTA TTT TGC GGC TTC AA 3'

برای این منظور ژن P39 در پلاسمید بیانی pGEX 4T1 کلون گردید. پلاسمید P39 - pGEX4T1 به باکتری E.coli BL21 DE3 ترانسفرم گردید و در نهایت تولید پروتئین با استفاده از القا باکتری با استفاده از IPTG انجام گرفت. پروتئین تولید شده با استفاده از کیت GST-sepharose شرکت فارماسیا تخلیص گردید.

به هر حفره از میکروپلیت‌های ۹۶ خانه‌ای کشت سلول (NUNC) ۵۰ میکرو لیتر از پروتئین نو ترکیب P39 (با غلظت یک میکرو گرم در میلی لیتر) ریخته و به مدت یک شب در چهار درجه سانتی گراد قرار گرفت. پس از سه بار شستشو، به حفره‌ها ۱۵۰ میکرو لیتر از محلول کازین ۲/۵ درصد جهت انجام مرحله مسدود سازی ریخته شد. پلیت‌ها به مدت دو ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار گرفت. پس از سه بار شستشو، ۵۰ میکرو لیتر از سرم موش‌ها (چهار موش از هر گروه) به داخل حفره‌ها اضافه گردید. پلیت‌ها به مدت دو ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار گرفت. پس از شستشو، ۵۰ میکرو لیتر از رقت ۱/۱۰۰۰ آنتی بادی‌های بیوتین دار بزی (فارماسیا) ضد کلاس‌های IgG1 و IgG2a موشی افزوده شد و به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار گرفت. برای تعیین ایزوتوپ‌های IgG به حفره‌ها ۵۰ میکرو لیتر از رقت ۱/۱۰۰۰ streptavidin-horseradish peroxidase (فارماسیا) اضافه گردید و به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار گرفت. به هر چاهک ۱۰۰ میکرو لیتر از محلول سوبسترای OPD (O-phenyl-diamin) (شرکت داکو) تازه تهیه شده افزوده و به مدت ۳۰-۱۰ دقیقه در تاریکی قرار گرفت. پس از این زمان و جهت خاتمه واکنش به هر چاهک ۱۰۰ میکرو لیتر اسید سولفوریک ۲۰ درصد اضافه گردید. میزان جذب نوری با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۹۰ نانومتر تعیین شد.

پس از جداسازی سلول‌های تک هسته‌ای طحالی (چهار موش از هر گروه) با استفاده از محیط گرادیان فایکول، یک سوسپانسیون سلولی  $1 \times 10^6$  cell/ml با محیط کشت کامل تهیه گردید. به هر حفره از میکروپلیت‌های ۹۶

پرایمر جلو دارای ترادف لازم برای شناسایی و برش توسط آنزیم BamHI و پرایمر عقب دارای ترادف لازم برای شناسایی و برش توسط آنزیم XhoI می‌باشد (ترادف آنزیم‌ها مشخص شده‌اند).

برای کلون سازی ژن P39 در دو پلاسمید pSK و pcDNA3 به ترتیب زیر عمل گردید. ابتدا محصول PCR را با آنزیم‌های BamHI و XhoI برش داده و سپس در ناقلین ذکر شده وارد گردید. لازم به ذکر است که پلاسمیدهای فوق نیز با آنزیم‌های BamHI و XhoI برش داده شد. عمل اتصال ژن P39 در این پلاسمیدها با استفاده از آنزیم DNA ligase T4 در حرارت ۱۶ درجه سانتی گراد به مدت یک شب انجام گرفت. پلاسمیدهای pSK-P39 و pcDNA3-P39 به سلول مستعد اشریشیا کلی سویه DH5a وارد گردید.

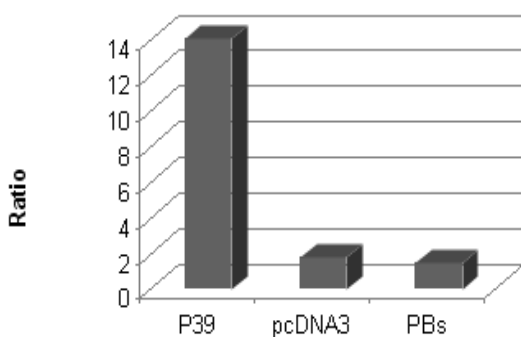
گروه‌های مورد مطالعه شامل چهار گروه موش ماده Balb/c ۶ هفته‌ای با وزن حدود ۶۰ گرم (هر گروه حاوی ۱۶ سر موش) که به ترتیب به گروه اول بافر فسفات، به گروه دوم پلاسمید pcDNA3 (گروه‌های کنترل منفی)، به گروه سوم پلاسمید pcDNA3-P39 (گروه آزمایش) و به گروه چهارم تعداد  $5 \times 10^4$  باکتری بروسلا آبورتوس سویه S19 (گروه کنترل مثبت) تزریق گردید. تزریقات در سه نوبت به فاصله سه هفته به صورت عضلانی انجام گرفت. برای بررسی ایمنی‌زایی به هر یک از گروه‌های مورد مطالعه (از هر گروه چهار موش) به تعداد  $5 \times 10^4$  باکتری بروسلا آبورتوس سویه بیماری‌زا ۵۴۴ به صورت داخل صفاقی تزریق گردید.

برای سنجش پاسخ‌های ایمنی سلولی از پاسخ تکثیر لنفوسیتی، سنجش انترفرون گاما و انترلوکین ۵ (IL5) و جهت سنجش پاسخ‌های ایمنی همورال از تعیین عیار IgG1 و IgG2a استفاده شد. مطالعه پاسخ‌های همورال و سلولی یک هفته پس از آخرین مرحله واکنش انجام گردید.

برای تعیین نوع کلاس آنتی بادی تولید شده ابتدا پروتئین نو ترکیب P39 تولید گردید (منبع تولید پروتئین).

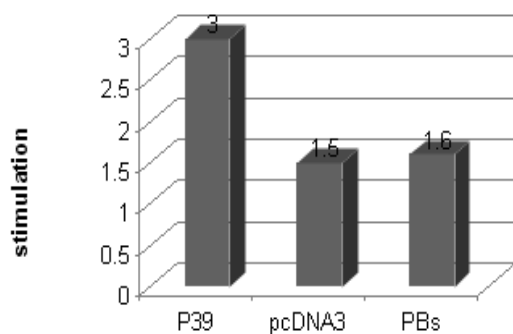
جدول ۱. تیتراژ آنتی بادی IgG1 و IgG2a در گروه‌های مورد مطالعه

گروه‌ها	آنتی بادیها	کنترل منفی
pcDNA3	pcDNA3P39	PBS
۳۰+۱۴/۱۴	۵۳۳+۱۸۴/۷۵	۳۰+۱۴/۱۴
۳۰+۱۴/۱۴	۳۰+۱۴/۱۴	۳۰+۱۴/۱۴



نمودار ۱. اندازه گیری میزان آنتی بادی IgG1 و IgG2a ( IgG2a/IgG1 ) موشی با استفاده از روش ELISA ؛ سه هفته پس از آخرین واکسیناسیون

برای بررسی بیشتر پاسخ ایمنی سلولی به ناقلین پلاسمیدی از پاسخ تکثیری لئوسیت‌ها استفاده شد. همان طور که در نمودار ۲ نشان داده شده است؛ ناقل پلاسمیدی حاوی ژن P39 در مقایسه با نمونه‌های کنترل دارای قدرت بالای تحریک تکثیر لئوسیت‌های B است. به طوری که اندکس تحریک لئوسیت‌ها در موش‌های واکسینه شده با pcDNA3P39 در حدود ۳/۶ است.



نمودار ۲. میزان پاسخ لئوسیتی در گروه‌های مورد مطالعه

خانه‌ای کشت سلول (NUNC) مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی مذکور ریخته و مقدار ۲/۵ میکروگرم بر میلی لیتر پروتئین نوترکیب P39 به صورت سه تایی (triplicate) به حفره‌ها اضافه شد و میکروپلیت‌ها در انکوباتور کشت سلول انکوبه گردیدند. بعد از ۷۲ ساعت کشت لئوسیت‌ها در حضور و عدم حضور آنتی ژن، به محیط کشت ۱ μCi/well تایمیدین نشان دار-<sup>3</sup>H (thymidine, Amersham) اضافه و ۱۸ ساعت بعد سلول‌ها توسط دستگاه cell harvester (Titertek) بر روی فیلتر مخصوص هاروست شدند. میزان جذب تایمیدین توسط سلول‌های تکثیر شده با دستگاه بتا کانتر (wallav ۱۴۴۱۰) اندازه گیری و میانگین نتایج بر حسب شمارش در دقیقه (cpm) گزارش گردید. به عنوان کنترل مثبت از فیتوماگلو تینین A (PHA) با غلظت ۵ میکروگرم بر میلی لیتر استفاده شد.

میزان انترفون گاما و انترلوکین ۵ ترشح شده در مایع روپی سلول‌های لئوسیتی موشی که با آنتی ژن P39 تحریک شده‌اند با استفاده از کیت الیزا شرکت فارماسیا اندازه گیری شد.

برای مقایسه میانگین میزان پاسخ تکثیری از روش آماری غیر پارامتریک و آزمون من ویتنی استفاده گردید.  $p < 0.05$  به عنوان سطح معنی دار بودن در نظر گرفته شد.

### یافته‌ها

#### پاسخ ایمنی هومورال به ژن P39 در ساختار pcDNA3P39

سرم‌های جمع‌آوری شده پس از آخرین واکسیناسیون از نظر وجود آنتی بادی بر علیه پروتئین نوترکیب P39 خالص شده با استفاده از روش الیزا (ELISA) بررسی گردید. همان طور که در جدول ۱ دیده می‌شود؛ پس از آخرین واکسیناسیون تیتراژ IgG2a در موش‌های واکسینه شده با pcDNA3P39 در مقایسه با موش‌های شاهد کنترل بسیار بالاتر می‌باشد (نمودار ۱). اندازه‌گیری تیتراژ IgG1 در موش‌های واکسینه شده و موش‌های شاهد افزایش اندک آن را نشان می‌دهد.

طحال حیوان شمارش شد. همان طور که در جدول ۲ نشان داده شده است؛ تعداد باکتری‌ها در موش‌های واکسینه شده با pcDNA3P39 اندکی کمتر از تعداد اولیه باکتری تلقیح شده بود در حالی که تعداد باکتری‌ها در موش‌های واکسینه شده با سویه S19 بروسلا آبورتوس بسیار پایین‌تر از موش‌های واکسینه شده با pcDNA3P39 است.

جدول ۲. تعداد باکتریها در گروه‌های مورد مطالعه

گروه‌ها	واکسن	تعداد باکتری در طحال (log.)
۱	PBS	$4/9 \pm 0/9 (9 \times 10^4)$
۲	pcDNA3	$4/9 \pm 0/017 (9 \times 10^4)$
۳	pcDNA3P39	$4/5 \pm 0/08 (3/5 \times 10^4)$
۴	B.abortus S19	$2/9 \pm 0/08 (8 \times 10^3)$

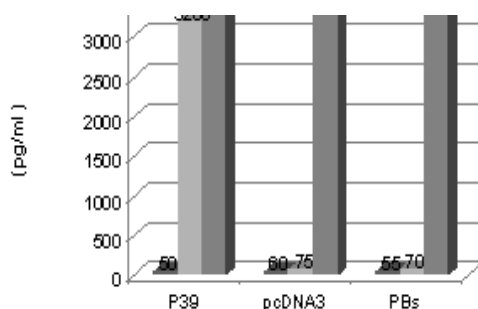
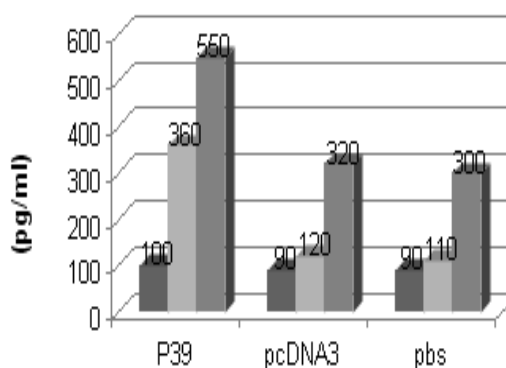
### بحث

در این مطالعه، با تهیه ساختار ناقصی که توانایی عرضه پروتئین P39 را در سلول‌های اوکاریوت دارد، توانایی این ساختار را در تحریک پاسخ‌های ایمنی و ایمنی‌زایی آن در موش Balb/c بررسی شده است. تحریک پاسخ‌های ایمنی سلولی با استفاده از اندازه‌گیری پاسخ تکثیر لنفوسیتی و نوع سیتوکین‌های تولید شده پس از تحریک سلول‌های طحال با استفاده از پروتئین نو ترکیب P39 بررسی شده است. پاسخ تکثیر لنفوسیتی بالا به همراه تولید مقدار بالای اینترفرون گاما (در مقابل تولید مقدار ناچیز اینترفرون ۵) نشان‌دهنده تحریک قوی پاسخ ایمنی سلولی از نوع Th1 است. نتایج مربوط به آزمون‌های ایمونولوژیک نشان‌دهنده تحریک مناسب سیستم ایمنی موش پس از تزریق پلاسمید حاوی ژن P39 است. تحریک سیستم ایمنی از نوع Th1 بوده که تعداد باکتری‌های طحال را نیز کاهش داده است. بنابر این پروتئین P39 نقش ایمنی‌زایی نسبتاً خوبی را دارد. این نوع پاسخ‌ها به خصوص برای محدود سازی عوامل داخل سلولی ضروری می‌باشد.

اساس بررسی ایمنی‌زایی در این تحقیق تلقیح سویه‌های بیماری‌زا (بروسلا آبورتوس سویه ۵۴۴) به

### سنجش اینترفرون گاما و اینترفرون ۵

تعیین نوع سایتوکاین‌های تولید شده در موش‌های واکسینه شده سه هفته پس از آخرین تلقیح واکسن انجام گرفت. همان طور که در نمودار ۳ دیده می‌شود؛ بالاترین میزان تولید اینترفرون گاما مربوط به موش‌هایی است که ژن P39 را دریافت کرده‌اند (در حدود ۳/۶ نانو گرم در میلی‌لیتر) در عین حال میزان تولید اینترفرون ۵ در این موش‌ها بسیار ناچیز است.



نمودار ۳. میزان تولید اینترفرون گاما (منحنی بالا) و اینترفرون ۵ (منحنی پایین) در گروه‌های مورد مطالعه

### ایمنی‌زایی pcDNA3P39 در موش در برابر بروسلا آبورتوس سویه ۵۴۴

برای بررسی توانایی ایمنی‌زایی pcDNA3P39 در موش‌های واکسینه شده؛ به این موش‌ها سویه بیماری‌زا بروسلا آبورتوس تزریق گردید. چهار هفته پس از تلقیح باکتری‌های بیماری‌زا تعداد بروسلا آبورتوس موجود در

موش‌های واکسینه شده چهار هفته پس از دوره واکسیناسیون است. با این که موش‌های واکسینه شده با pcDNA3P39 قدرت حفاظتی نسبتاً خوبی در برابر سویه بیماری‌زا بروسلا آبورتوس در مقایسه با موش‌های کنترل از خود نشان می‌دهند ولی در مقایسه با موش‌های واکسینه شده با سویه S19 بروسلا آبورتوس سطح ایمنی‌زایی با pcDNA3P39 چندان بالا نیست.

اندازه‌گیری آنتی‌بادی‌های IgG1 و IgG2a سه هفته پس از آخرین واکسیناسیون نشان‌دهنده تیتراژ نسبتاً بالای این آنتی‌بادی در حیوانات واکسینه شده با pcDNA3P39 است. در حالی که تیتراژ آنتی‌بادی IgG1 در این حیوانات اندکی افزایش یافته است. نتیجه اخیر به همراه بالا بودن نسبت IgG2a/IgG1 نشان از تحریک سلول‌های T-helper می‌دهد.

از جمله روش‌های کنترل بیماری‌های عفونی، واکسیناسیون بر علیه عوامل عفونت‌زا است. ارایه نسل‌های جدید واکسن‌های ضد بروسلوزیس که عاری از معایب واکسن‌های رایج است، بیش از پیش اهمیت خود را نشان می‌دهد. کنترل بروسلوزیس در بدن وابسته به تحریک ایمنی سلولی در جهت پاسخ‌های Th1 است. اینترفرون گاما که یکی از سایتوکاین‌های کلیدی پاسخ‌های Th1 بشمار می‌آید، نقش مهمی را در تحریک پاسخ ماکروفاژها بر علیه این باکتری بازی می‌کند. به طور معمول تولید این سایتوکین در روند طبیعی آلودگی با بروسلا دیده می‌شود. بنابراین تنها واکسن‌هایی می‌توانند اثر ایمنی‌زایی مطلوبی را داشته باشند که روند تحریک پاسخ‌های ایمنی در آنها نظیر آلودگی طبیعی با سویه بیماری‌زا بروسلا باشد (۶).

در همین راستا ایمنی زایی آنتی‌ژن‌های مختلفی از بروسلا به شکل طبیعی و یا نو ترکیب بررسی شده است. از جمله این آنتی‌ژن‌ها می‌توان HtrA (پروتئین‌سازی که در شرایط استرس تولید می‌شود)، GroEL، GroES (پروتئین‌های شوک حرارتی)، Cu-Zn SOD (آنزیم سوپراکسید دیسموتاز سیتوپلاسمی)، YajC (پروتئین غشای تسهیل‌کننده انتقال)، UvrA (نوعی از هلی‌کازها)،

Lv/L12 (پروتئین ریپوزومی) و P39 (پروتئین پری پلاسمیک) را نام برد. این بررسی نشان می‌دهند که تنها سه آنتی‌ژن P39، Lv/L12 و Cu-Zn SOD توانایی تحریک پاسخ‌های ایمنی سلولی و همورال را دارند (۷).

تحقیقاتی که بر روی واکسن‌های آنتی‌ژنیک و یا حتی شکل‌گرفته شده بروسلا انجام شده است ثابت می‌کند که این عوامل قادر به تحریک پاسخ‌های ایمنی سلولی نیستند. به طور کلی این گونه واکسن‌ها قادر به تولید پروتئین‌ها در داخل سلول‌های عرضه‌کننده آنتی‌ژن نبوده و در نتیجه توانایی تحریک پاسخ‌های سیتوتوکسیک را ندارند.

امروزه برای حل این مشکلات از روش‌های جدید عرضه آنتی‌ژن به بدن استفاده می‌شود تا تحریک پاسخ‌های ایمنی سلولی مناسب را برای حذف عوامل داخلی سلولی به همراه داشته باشد. از جمله این روش‌ها DNA واکسیناسیون است که بسیاری از مشکلات و مسایل مربوط به آزادسازی آنتی‌ژن در بدن را حل نموده است. در این واکسن‌ها بیان آنتی‌ژن تحت کنترل یک پروموتور قوی است که توانایی ابراز آن در سلول‌های یوکاریوتیک را دارند. واکسن‌های DNA با ویژگی ارایه طولانی مدت آنتی‌ژن و عرضه آن در کنار آنتی‌ژن‌های سیستم ناسازگاری نسجی کلاس I و II تحریک سیستم نظیر آلودگی طبیعی با باکتری بیماری‌زا را انجام می‌دهد. در نتیجه این واکسن‌ها می‌توانند جایگزین مناسبی برای واکسن‌های متشکل از سویه‌های زنده ضعیف شده باشند (۸).

در تحقیقات انجام شده بر روی سایر آنتی‌ژن‌های بروسلا آبورتوس نقش ایمنی‌زایی این آنتی‌ژن‌ها با استفاده از روش DNA vaccine به اثبات رسیده است. برخی از انواع این پروتئین‌ها نظیر Lv/L12 قادر به تحریک پاسخ‌های ایمنی بر علیه بروسلا هستند. به طور کلی به نظر می‌رسد برای ایجاد ایمنی‌زایی بالا توسط آنتی‌ژن‌های این باکتری استفاده تنها از یک آنتی‌ژن نتایج مطلوبی را به همراه نخواهد داشت. لذا به نظر می‌رسد استفاده هم‌زمان از دو یا

2. Mukhtar F. Brucellosis in a high risk occupational group: seroprevalence and analysis of risk factors. *Journal of the Pakistan Medical Association*. 2010;60(12):1031-4.
3. Tesfaye G, Tsegaye W, Chanie M, Abinet F. Seroprevalence and associated risk factors of bovine brucellosis in Addis Ababa dairy farms. *Tropical Animal Health and Production*. 2011;43(5):1001-5.
4. Al-Mariri A. Protection of BALB/c mice against *Brucella melitensis* 16 M infection induced by vaccination with live *Escherchia coli* expression *Brucella* P39 protein. *Vaccine*. 2010;28(7):1766-70.
5. Al-Mariri A, Tibor A, Lestrade P, Mertens P, De Bolle X, Letesson JJ. *Yersinia enterocolitica* as a vehicle for a naked DNA vaccine encoding *Brucella abortus* bacterioferritin or P39 antigen. *Infection and immunity*. 2002;70(4):1915-23.
6. Schuring GG, Sriragana TN, Corbel MG. *Brucellosis Vaccines: past, present and future*. *Vet Microb*. 2002;90:479 - 96.
7. Clapp B, Walters N, Thornburg T, Hoyt T, Yang X, Pascual DW. DNA vaccination of bison to brucellar antigens elicits elevated antibody and IFN- $\gamma$  responses. *Journal of Wildlife Diseases*. 2011;47(3):501-10.
8. Refai M. Incidence and control of brucellosis in the near east region *Vet, Microb*. 2002;90:81-111.
9. Leclercq S, Harms JS, Costa OS. Enhanced efficacy of DNA vaccines against an intracellular bacterial pathogen by genetic adjuvants. *Current Pharmaceutical Biotechnology*. 2003;4(2):99-107.

چند پروتئین یا ژن‌های آنها در ایمنی‌زایی اهمیت بالاتری را خواهند داشت (۹).

### نتیجه گیری

آنتی ژن P39 بروسلا آبورتوس نقش مهمی را در ایمنی‌زایی تب مالت دارد. این اثر به خصوص با استفاده از روش DNA Vaccine بیشتر خود را نشان می‌دهد. به طوری که تحریک پاسخ‌های ایمنی در موش بر علیه این پروتئین از نوع TH<sub>1</sub> بود. این نوع پاسخ ایمنی باعث حذف عوامل داخل سلولی نظیر بروسلا می‌گردد. در عین حال برای کسب ایمنی‌زایی بالاتر علیه این بیماری استفاده از چند آنتی ژن ضروری به نظر می‌رسد.

### تشکر و قدردانی

بدینوسیله از ریاست محترم انیستیتو پاستور ایران و پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری تهران جهت فراهم آوردن برخی امکانات این طرح تشکر و قدردانی می‌شود.

### منابع

1. Yang Y, Yin J, Guo D, Lang X, Wang X. Immunization of mice with recombinant S-adenosyl-l-homocysteine hydrolase protein confers protection against *Brucella melitensis* infection. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*. 2011,61(2):159-67.