مقاله پژوهشی

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک

سال ۱۴، شماره۶ ویژه نامه۳، زمستان ۱۳۹۰، ۸-۱

بررسی ایمنی زایی ژن P۳۹ بروسلا آبورتوس در موش بالب سی

حمید ابطحی[۱*]، علی هاتف سلمانیان[۲]، سیما رافتی[۳]، قاسم مسیبی[۴]، علیرضا آموزنده[۵]

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، دکتری 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 میکروب شناسی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران

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

چکیده

زمینه و هدف: بروسلا باکتری‌های گرم منفی داخل سلولی می‌باشند. با توجه به معضلات بهداشتی، اقتصادی و اجتماعی بروسلوز، کنترل این بیماری از اهمیت خاصی برخوردار است. واکسیناسیون رایج شامل استفاده از سویه‌های زنده و ضعیف شده این باکتری‌ها است. در این تحقیق سعی بر آن است تا ایمنی زایی ژن P۳۹ بروسلا آبورتوس در موش بالب سی بررسی شود.

مواد و روش‌ها: این مطالعه یک بررسی تجربی می باشد که ابتدا با استفاده از PCR ژن P۳۹ تکثیرگردید و سپس در ناقل یوکاریوتیکی pcDNA۳ کلون شد. پلاسمید به دست آمده در سه مرحله به موش‌های بالب سی به صورت عضلانی تزریق گردید. پس از آخرین واکسیناسیون آزمون‌های ایمنولوژیک از جمله پاسخ تکثیری لنفوسیتی، سنجش انترفرون گاما وانترلوکین ۵ و تعیین عیار IgG۲a و IgG۱ انجام شد.

یافته‌ها: میزان ضریب تحریکی در پاسخ تکثیری لنفوسیتی برابر ۳/۶، انتر فرون گاما اندازه‌گیری شده برابر ۳ نانوگرم بر میلی لیتر و انتر لوکین ۵ به مقدار ناچیزی بود. تیتر IgG۲a برابر ۱/۶۴۰ و تیتر IgG1 ۱/۴۰ به دست آمد.

نتیجه گیری: نتایج مربوط به آزمون‌های 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 باکتری‌های طحال را نیز کاهش داده است. بنابراین پروتیین 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 آبورتوس، 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

Archive of SID

www.SID.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 واکسن موثر بروسلا سویه زنده ضعیف شده بروسلا آبورتوس S۱۹ بود. گرچه این واکسن 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 واکسن‌های سالم‌تر و موثرتر برای کنترل این عفونت در حیوانات و انسان ضروری به نظر می‌رسد. دستیابی به این هدف یعنی واکسن‌های جدید بروسلوز نیازمند بررسی شاخص‌های اصلی آنتی ژنیک بروسلا است(۴).

پروتئین P۳۹ 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 P۳۹ در واقع در فضای پری پلاسمیک قرار گرفته است(۵). این پروتئین از عوامل مهم ایمنی‌زا برعلیه بروسلا بشمار می‌آید.

امروزه ثابت شده است که ایمنی موثر در برابر پاتوژن‌های داخل سلولی نظیر بروسلا نیازمند ایجاد ایمنی سلولی با تحریک پاسخ‌های Th۱ است. انتر فرون گاما (یکی از سیتوکاین‌های اصلی در پاسخ‌های Th۱) نقش عمده‌ای را در فعالیت ضد بروسلا بازی کرده و (همراه با TNFα) از عوامل اصلی مصونیت در برابر گونه‌های بروسلا است.

واکسن‌های DNA ، به علت تولید طولانی مدت آنتی ژن قادر به تحریک پاسخ‌های ایمنی سلولی و هومورال در زمان طولانی هستند. واکسن‌های 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(pcDNA۳) همراه با ژن‌های بیان کننده پروتئین P۳۹ 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 S۱۹ (تهیه شده از انستیتو پاستور ایران)، اشریشیا کلی سویه DH۵α و اشریشیا کلی سویه BL۲۱ (تهیه شده از مرکز ملی تحقیقات ژنتیک و تکنولوژی زیستی) می‌باشند. جهت کلونینگ اولیه و تعیین ترادف ژن مورد مطالعه از پلاسمید pSK^{+} و جهت تولید پروتئین P۳۹ از پلاسمید pcDNA۳ 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 سینا ژن تهیه گردید.

تخلیص کروموزوم بروسلا آبورتوس با استفاده از CTAB/NaCl و تکثیر ژن P۳۹ 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`

Archive of SID

www.SID.ir

پرایمر جلو دارای ترادف لازم برای شناسایی و برش توسط آنزیم *Bam*HI و پرایمر عقب دارای ترادف لازم برای شناسایی و برش توسط آنزیم *Xho*I می‌باشد (ترادف آنزیم‌ها مشخص شده‌اند).

برای کلون سازی ژن P۳۹ در دو پلاسمید pSK و pcDNA۳ به ترتیب زیر عمل گردید. ابتدا محصول PCR را با آنزیم‌های *Bam*HI و *Xho*I برش داده و سپس در ناقلین ذکر شده وارد گردید. لازم به ذکر است که پلاسمیدهای فوق نیز با آنزیم‌های *Bam*HI و *Xho*I برش داده شد. عمل اتصال ژن P۳۹ در این پلاسمیدها با استفاده از آنزیمT۴ DNAligase در حرارت ۱۶ درجه سانتی گراد به مدت یک شب انجام گرفت. پلاسمیدهای pSK-P۳۹ وpcDNA۳P۳۹ به سلول مستعد اشریشیا کلی سویه DH5α 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 pcDNA۳ (گروه‌های کنترل منفی)، به گروه سوم پلاسمید pcDNA۳P۳۹ (گروه آزمایش) و به گروه چهارم تعداد ۵×۱۰^{۴} باکتری بروسلا آبورتوس سویه S۱۹ (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 ۵×۱۰^{۴} باکتری بروسلا آبورتوس سویه بیماری‌زا ۵۴۴ به صورت داخل صفاقی تزریق گردید.

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

برای تعیین نوع کلاس آنتی بادی تولید شده ابتدا پروتئین نوترکیب P۳۹ تولید گردید (منبع تولید پروتئین). برای این منظور ژن P۳۹ در پلاسمید بیانی pGEX ۴T۱ کلون گردید. پلاسمید pGEX۴T۱ – P۳۹ به باکتری E.coli BL۲۱ DE۳ 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 نوترکیب P۳۹ (با غلظت یک میکرو گرم در میلی‌لیتر) ریخته و به مدت یک شب در چهار درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از سه بار شستشو، به حفره‌ها ۱۵۰ میکرولیتر از محلول کازیین ۲/۵ درصد جهت انجام مرحله مسدود سازی ریخته شد. پلیت‌ها به مدت دو ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از سه بار شستشو، ۵۰ میکرو لیتر از سرم موش‌ها (چهار موش از هر گروه) به داخل حفره ها اضافه گردید. پلیت‌ها به مدت دو ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از شستشو، ۵۰ میکرولیتر از رقت ۱/۱۰۰۰ آنتی بادی‌های بیوتین دار بزی (فارماسیا) ضد کلاس‌های IgG۲a و IgG۱ موشی افزوده شد و به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. برای تعیین ایزوتوپ‌های IgG به حفره‌ها ۵۰ میکرولیتر از رقت ۱/۱۰۰۰ streptavidin-horseradish peroxidase (فارماسیا) اضافه گردید و به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر 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 میکرولیتر 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 ۱×۱۰^{۶} cell/ml با محیط کشت کامل تهیه گردید. به هر حفره از میکروپلیت‌های ۹۶

Archive of SID

www.SID.ir

خانه‌ای کشت سلول (NUNC) مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی مذکور ریخته و مقدار ۲/۵ میکروگرم برمیلی لیتر پروتئین نوترکیب P۳۹ به صورت سه تایی (triplicate) به حفره‌ها اضافه شد و میکروپلیت‌ها در انکوباتور کشت سلول انکوبه گردیدند. بعد از ۷۲ ساعت کشت لنفوسیت‌ها در حضور و عدم حضور آنتی ژن، به محیط کشت ۱μCi/well تایمیدین نشان دار-^{3}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) اندازه‌گیری و میانگین نتایج بر حسب شمارش در دقیقه (cpm) گزارش گردید. به عنوان کنترل مثبت از فیتوهماگلوتینین A (PHA) با غلظت ۵ میکروگرم بر میلی لیتر استفاده شد.

میزان انترفرون گاما و انترلوکین ۵ ترشح شده در مایع رویی سلول‌های لنفوسیتی موشی که با آنتی ژن P۳۹ تحریک شده‌اند با استفاده از کیت الیزا شرکت فارماسیا اندازه‌گیری شد.

برای مقایسه میانگین میزان پاسخ تکثیری از روش آماری غیر پارامتریک و آزمون من ویتنی استفاده گردید. $p<۰/۰۵$ به عنوان سطح معنی‌دار بودن در نظر گرفته شد.

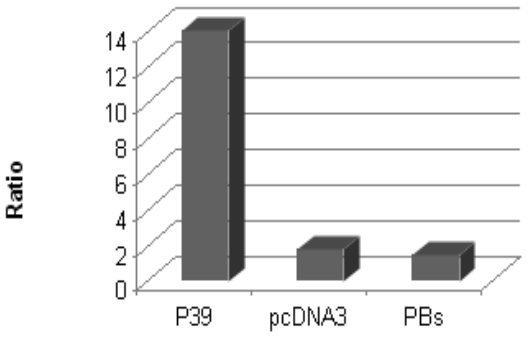
یافته‌ها

پاسخ ایمنی هومورال به ژن P۳۹ در ساختار pcDNA ۳P۳۹

سرم‌های جمع‌آوری شده پس از آخرین واکسیناسیون از نظر وجود آنتی بادی بر علیه پروتئین نوترکیب P۳۹ خالص شده با استفاده از روش الیزا (ELISA) بررسی گردید. همان طور که در جدول ۱ دیده می‌شود؛ پس از آخرین واکسیناسیون تیتر IgG۲a در موش‌های واکسینه شده با pcDNA۳P۳۹ در مقایسه با موش‌های شاهد کنترل بسیار بالاتر می‌باشد(نمودار ۱). اندازه‌گیری تیتر IgG۱ در موش‌های واکسینه شده و موش‌های شاهد افزایش اندک آن را نشان می‌دهد.

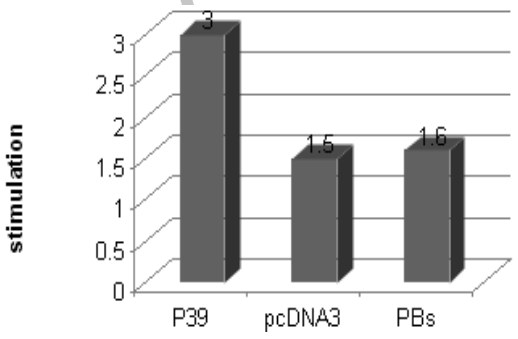
جدول ۱. تیتر آنتی بادی IgG۱ و IgG۲a در گروه‌های مورد مطالعه

آنتی بادیها	گروهها		کنترل منفی
	pcDNA۳P۳۹	pcDNA۳	PBS
IgG۲a	۵۳۳+۱۸۴/۷۵	۳۰+۱۴/۱۴	۳۰+۱۴/۱۴
IgG۱	۳۰+۱۴/۱۴	۳۰+۱۴/۱۴	۳۰+۱۴/۱۴



نمودار ۱. اندازه گیری میزان آنتی بادی IgG۲a و IgG۱ (IgG۲a/IgG۱) موشی با استفاده از روش ELISA ؛ سه هفته پس از آخرین واکسیناسیون

برای بررسی بیشتر پاسخ ایمنی سلولی به ناقلین پلاسمیدی از پاسخ تکثیری لنفوسیت‌ها استفاده شد. همان طور که در نمودار ۲ نشان داده شده است؛ ناقل پلاسمیدی حاوی ژن P۳۹ در مقایسه با نمونه‌های کنترل دارای قدرت بالای تحریک تکثیر لنفوسیت‌های B است. به طوری که اندکس تحریک لنفوسیت‌ها در موش‌های واکسینه شده با pcDNA۳P۳۹ در حدود ۳/۶ است.



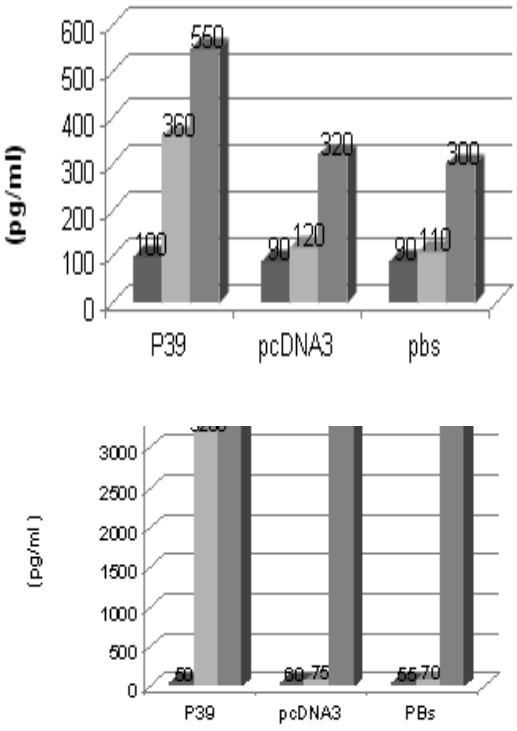
نمودار ۲. میزان پاسخ لنفوسیتی در گروه‌های مورد مطالعه

Archive of SID

www.SID.ir

سنجش اینترفرون گاما و انترلوکین ۵

تعیین نوع سایتوکاین های 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 P۳۹ را دریافت کرده‌اند (در حدود ۳/۶ نانو گرم در میلی‌لیتر) در عین حال میزان تولید انتر لوکین ۵ در این موش‌ها بسیار ناچیز است.



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

ایمنی زایی pcDNA۳P۳۹ در موش در برابر بروسلا آبورتوس سویه ۵۴۴

برای بررسی توانایی ایمنی‌زایی pcDNA۳P۳۹ 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 طحال حیوان شمارش شد. همان طور که در جدول ۲ نشان داده شده است؛ تعداد باکتری‌ها در موش‌های واکسینه شده با pcDNA۳P۳۹ اندکی کمتر از تعداد اولیه باکتری تلقیح شده بود در حالی که تعداد باکتری‌ها در موش‌های واکسینه شده با سویه S۱۹ بروسلا آبورتوس بسیار پایین‌تر از موش‌های واکسینه شده با pcDNA۳P۳۹ است.

جدول ۲. تعداد باکتریها در گروه‌های مورد مطالعه

گروه‌ها	واکسن	تعداد باکتری در طحال ($\log_{10}$)
۱	PBS	۴/۹±۰/۹ (۹×۱۰^{۴})
۲	pcDNA۳	۴/۹± ۰/۰۱۷ (۹×۱۰^{۴})
۳	pcDNA۳P۳۹	۴/۵±۰/۰۸ (۳/۵×۱۰^{۴})
۴	B.abortus S۱۹	۲/۹ ±۰/۰۸ (۸۰۰)

بحث

در این مطالعه، با تهیه ساختار ناقلی که توانایی عرضه پروتئین P۳۹ 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 تکثیری لنفوسیتی و نوع سیتوکین‌های تولید شده پس از تحریک سلول‌های طحال با استفاده از پروتیین نو ترکیب P۳۹ بررسی شده است. پاسخ تکثیری لنفوسیتی بالا به همراه تولید مقدار بالای اینترفرون گاما (در مقابل تولید مقدار ناچیز انترلوکین ۵) نشان‌دهنده تحریک قوی پاسخ ایمنی سلولی از نوع Th۱ است. نتایج مربوط به آزمون‌های 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 باکتری‌های طحال را نیز کاهش داده است. بنابر این پروتیین P۳۹ 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

Archive

www.SID.ir

موش‌های واکسینه شده چهار هفته پس از دوره واکسیناسیون است. با این که موش‌های واکسینه شده با pcDNA۳P۳۹ 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 S۱۹ بروسلا آبورتوس سطح ایمنی‌زایی pcDNA۳P۳۹ چندان بالا نیست.

اندازه‌گیری آنتی بادی‌های IgG۲a و IgG۱ سه هفته پس از آخرین واکسیناسیون نشان‌دهنده تیتر نسبتاً بالای این آنتی بادی در حیوانات واکسینه شده با pcDNA۳P۳۹ است. در حالی که تیتر آنتی بادی 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 Th۱ است. اینترفرون گاما که یکی از سایتوکاین‌های کلیدی پاسخ‌های Th۱ بشمار می‌آید، نقش مهمی را در تحریک پاسخ ماکروفاژها بر علیه این باکتری بازی می‌کند. به طور معمول تولید این سیتوکین در روند طبیعی آلودگی با بروسلا دیده می‌شود. بنابر این 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 آنتی ژن‌های مختلفی از بروسلا به شکل طبیعی و یا نوترکیب بررسی شده است. از جمله این آنتی ژن‌ها می‌توان HtrA (پروتئازی که در شرایط استرس تولید می‌شود)، GroEL، GroES (پروتئین‌های شوک حرارتی)، Cu-Zn SOD (آنزیم سوپراکسید دیسموتاز سیتوپلاسمی)، YajC(پروتئین غشاط تسهیل کننده انتقال)، UvrA(نوعی از هلی کازها)، L۷/L۱۲ (پروتئین ریبوزومی)و P۳۹ (پروتئین پری پلاسمیک)را نام برد. این بررسی نشان می‌دهند که تنها سه آنتی ژن P۳۹ ، L۷/L۱۲ و Cu-Zn SOD توانایی تحریک پاسخ‌های ایمنی سلولی و هومورال را دارند(۷).

تحقیقاتی که برروی واکسن‌های آنتی ژنیک و یا حتی شکل کشته 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 عرضه کننده آنتی ژن نبوده و در نتیجه توانایی تحریک پاسخ‌های سیتوتوکسیک را ندارند.

امروزه برای حل این مشکلات از روش‌های جدید عرضه آنتی ژن به بدن استفاده می‌شودتا 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 آنتی ژن در بدن را حل نموده است. در این واکسن‌ها بیان آنتی ژن تحت کنترل یک پروموتور قوی است که توانایی ابراز آن در سلول‌های یوکاریوتیک را دارند. واکسن‌های DNA با دو ویژگی ارایه طولانی مدت آنتی ژن و عرضه آن در کنار آنتی ژن‌های 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 آنتی ژن‌های بروسلا آبورتوس نقش ایمنی‌زایی این آنتی زن‌ها با استفاده از روش DNA vaccine به اثبات رسیده است. برخی از انواع این پروتئین‌ها نظیرL۷/L۱۲ قادر به تحریک پاسخ‌های ایمنی بر علیه بروسلا هستند. به طور کلی به نظر می‌رسد برای ایجاد ایمنی‌زایی بالا توسط آنتی ژن‌های این باکتری استفاده تنها از یک آنتی ژن نتایج مطلوبی را به همراه نخواهد داشت. لذا به نظر می‌رسد استفاده هم‌زمان از دو یا

Archive of SID

www.SID.ir

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

نتیجه گیری

آنتی ژن P۳۹ 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 TH۱ 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.

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, Lestrate 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. Brocellosis 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-γ responses. Journal of Wildlife Diseases. 2011;47(3):501-10.

8. Refai M. Incidence and control of brocellosis 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.

Archive of SID

www.SID.ir