

Original Article

سنجش پاسخ‌های سایتوکایینی و آنتی‌بادی نسبت به پروتئین سطحی ۳۱ کیلودالتونی نو ترکیب بروسلا در مدل موش عفونی‌شده با بروسلا ابورتوس

نیما خرم‌آبادی^۱، اشرف محبتی مبارز^{۱*}، بهمن تیرایی^۲، مهرداد بهمنش^۳، فاطمه اطیابی^۴، هانیه آقابابا^۱

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

۲- انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران.

۳- گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیست‌شناسی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.

۴- مرکز تحقیقات نانوتکنولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۳/۰۱/۱۶

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۲/۱۰/۲۳

چکیده

زمینه و هدف: یکی از بیماری‌های شایع مشترک بین انسان و دام بروسلاز است و در کشورهای در حال توسعه جزء مشکلات سلامت محسوب می‌شود. شناسایی ترکیبات آنتی‌ژنی سلول بروسلا از نظر میزان و نوع پاسخ‌های ایمنی در میزبان‌های آلوده، در طراحی واکسن اهمیت دارند. پروتئین سطحی ۳۱ کیلودالتونی (BCSP31)، در همه سویه‌ها حضور دارد بنابراین در این مطالعه پاسخ‌های ایمنی که حین عفونت میزبان موشی با بروسلا ابورتوس، نسبت به این پروتئین شکل می‌گیرند، مطالعه شدند.

مواد و روش‌ها: BCSP31 نو ترکیب تولید و تخلیص شد. یک گروه موش BALB/c با تلقیح بروسلا ابورتوس ۵۴۴ عفونی و به مدت ۶۰ روز نگهداری شدند؛ گروه کنترل غیر عفونی نیز در نظر گرفته شد. از پروتئین خالص جهت ردیابی پاسخ‌های آنتی‌بادی اختصاصی در سرم موش‌های عفونی شده به روش ELISA استفاده شد. پاسخ‌های سایتوکایینی IL-4، IL-12 و IFN- γ نسبت به تحریک کشت سلول‌های طحالی موش‌ها با پروتئین نو ترکیب ارزیابی شدند.

نتایج: تیر قابل توجه آنتی‌بادی‌های اختصاصی IgG و مقدار IgG1 و IgG2a نسبت به BCSP31 در سرم موش‌هایی که با سویه بیماریزا عفونی شده بودند مشاهده شد. ارزیابی پاسخ سایتوکایینی سلول‌های طحالی نیز نشان‌دهنده پاسخ چشمگیر IFN- γ و IL-12 نسبت به پروتئین ذکر شده و همچنین پاسخ IL-4 قابل توجه می‌باشد. همه ارزیابی‌ها نسبت به گروه کنترل غیر عفونی معنی‌دار بوده‌اند ($p < 0.05$).

نتیجه‌گیری: مجموع این نتایج نشان می‌دهد حین عفونت میزبان موشی با بروسلا ابورتوس، پاسخ‌های اختصاصی همورال و سایتوکایینی قابل توجهی نسبت به پروتئین سطحی ۳۱ کیلودالتونی ایجاد می‌شود. براساس این یافته‌ها، از این پروتئین می‌توان در طراحی روش‌های ایمونیزاسیون استفاده نمود.

کلمات کلیدی: بروسلا ابورتوس، BCSP31، آنتی‌بادی، سایتوکایین.

مقدمه

بروسلا باکتری بیماری‌زای داخل سلولی اختیاری است. گونه‌های این ارگانیزم بیماری بروسلاز را در میزبانان مهره‌دار ایجاد می‌کنند که جزو شایع‌ترین بیماری‌های مشترک بین انسان و دام هستند (۱). پیشگیری از این بیماری در میان دام‌ها از دو طریق توأم صورت می‌گیرد؛ استفاده از سویه‌های واکسن تخفیف حدت یافته که ایمنی حفاظتی بسیار قابل توجهی در میزبان حیوانی ایجاد می‌نماید و نیز از بین بردن دام‌های آلوده. پاسخ ایمنی ایجاد شده توسط سویه‌های واکسن با روش‌های تشخیص سرولوژی تداخل دارند و آنتی‌بادی‌های تشکیل شده حین ایمن‌سازی تشخیص دام‌های واکسینه از دام‌های عفونی را دشوار می‌سازند (۲). سویه‌های واکسن تخفیف حدت یافته برای انسان به شدت بیماریزا بوده و قادر به ایجاد بیماری علامت‌دار می‌باشند و شیوع بیماری‌های انسانی در اثر آلودگی با این سویه‌ها نیز رخ داده است (۳-۵). هیچ واکسن تأیید شده‌ای جهت پیشگیری از بروسلاز

بروسلا باکتری بیماری‌زای داخل سلولی اختیاری است. گونه‌های این ارگانیزم بیماری بروسلاز را در میزبانان مهره‌دار ایجاد می‌کنند که جزو شایع‌ترین بیماری‌های مشترک بین انسان و دام هستند (۱). پیشگیری از این بیماری در میان دام‌ها از دو طریق توأم صورت می‌گیرد؛ استفاده از سویه‌های واکسن تخفیف حدت یافته که ایمنی حفاظتی بسیار قابل توجهی در میزبان حیوانی ایجاد می‌نماید و نیز از بین بردن دام‌های آلوده. پاسخ ایمنی ایجاد شده توسط سویه‌های واکسن با روش‌های تشخیص سرولوژی تداخل دارند و آنتی‌بادی‌های تشکیل شده حین ایمن‌سازی تشخیص دام‌های واکسینه از دام‌های عفونی را دشوار می‌سازند (۲). سویه‌های واکسن تخفیف حدت یافته برای انسان به شدت بیماریزا بوده و قادر به ایجاد بیماری علامت‌دار می‌باشند و شیوع بیماری‌های انسانی در اثر آلودگی با این سویه‌ها نیز رخ داده است (۳-۵). هیچ واکسن تأیید شده‌ای جهت پیشگیری از بروسلاز

* نویسنده مسئول: اشرف محبتی مبارز، گروه باکتری‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران. تلفن: ۰۲۱-۸۲۸۸۳۸۶۲ Email: mmmobarez@modares.ac.ir



بار با سرم نمکی ۰/۹ درصد شستشو داده شدند. توده سلولی حاصله در بافر حاوی اوره ۸ مولار (100mM NaH₂PO₄, B 10mM Tris-HCl, and 8M urea; pH 8.5) و پس از جداسازی اجسام باقیمانده نامحلول سلول با رزین نیکل مجاور شد. مخلوط حاصل پس از یکساعت مجاورت همراه با هم خوردن مداوم در دمای اتاق به ستون پلی استایرنی منتقل شد. رزین با بافر (100mM NaH₂PO₄, 10mM Tris-HCl, and 8M urea; C pH 8.5) شستشو داده شد. حذف اوره با استفاده از بافرهای حاوی شیب کاهشی غلظت اوره (۸، ۴، ۲، ۱ و ۰ مولار اوره) انجام و در نهایت پروتئین ها با استفاده از محلول ایمیدازول ۲۵۰ میلی مولار از ستون جدا و جمع آوری شدند. برای حذف ایمیدازول، محلول پروتئینی در برابر بافر فسفات نمکی (pH 7.4) به مدت یک شب دیالیز شد. خلوص و مقدار پروتئین نو ترکیب به ترتیب با روش SDS-PAGE و اسپکتروفوتومتری تعیین شد.

ایجاد مدل موشی عفونت: دو گروه شامل ۱۵ سر موش ماده BALB/c که ۷ الی ۸ هفته از عمر آنها می گذشت انتخاب و جداگانه نگهداری شدند. یک گروه از موش ها، با رعایت تمهیدات ایمنی زیستی در قرنطینه، با سوسپانسیون حاوی ۱۰^۵ CFU/ml از سویه بیماریزای بروسلا /بورتوس ۵۴۴ به صورت داخل صفاقی آلوده شدند. موش ها برای مدت ۶۰ روز نگهداری شده و رویداد علائم بیماری و بقای آنها مورد بررسی قرار گرفت. گروه موش غیر عفونی نیز به عنوان کنترل در نظر گرفته شد. انجام تمامی مراحل آزمایش روی مدل موشی تحت نظارت کمیته اخلاق پزشکی دانشگاه تربیت مدرس و با رعایت اصول استاندارد حقوق حیوانات کمیسیون اروپا^۱ انجام گرفت (۱۱).

جمع آوری نمونه های سرم: از موش های سالم و موش های عفونی شده پس از گذشت مدت ۲ ماه از تلقیح سویه بیماریزا، از طریق سینوس چشمی خون گیری به عمل آمد و سرم آنها جدا و در شرایط ۷۰- نگهداری شد.

بررسی حضور آنتی بادی های IgG اختصاصی علیه rBCSP31: ابتدا از آنتی سرم اختصاصی rBCSP31 که در موش های BALB/c تهیه شده بود (در همین آزمایشگاه) جهت تعیین مقدار بهینه برای بارگذاری پلیت های الیزا استفاده شده

انسانی وجود ندارد. طراحی روش های ایمن سازی مؤثر که فاقد مشکلات فعلی واکسن های تخفیف حدت یافته باشند، به بررسی اجزاء سلول باکتری و ارزیابی پاسخ های میزبان به آنتی ژن مورد نظر حین عفونت نیازمند است (۶). هنگامی که میزبان حیوانی یا انسانی با سویه های بیماریزای بروسلا عفونی می شوند، پاسخ های اختصاصی علیه اجزای مختلف سلول باکتری در بدن میزبان شکل می گیرد. یکی از ارکان مهم طراحی واکسن های زیر واحدی شناسایی آنتی ژن های مختلفی است که در طول عفونت با باکتری بیماریزا، موجب القای پاسخ های ایمنی کارآمد در میزبان می شوند و از این ترکیبات می توان برای طراحی روش های ایمن سازی استفاده نمود. مدل های حیوانی عفونی، یکی از ابزار قابل اتکا جهت چنین بررسی هایی هستند و محققین می توانند با ارزیابی پاسخ های همورال و سلولی اختصاصی نسبت به آنتی ژن های مورد نظر که حین عفونت با باکتری بیماریزا در بدن میزبان شکل می گیرد، نسبت به طراحی آزمایشات بعدی اقدام نمایند. پروتئین سطحی ۳۱ کیلودالتنی بروسلا (BCSP31) یکی از آنتی ژن های غشای خارجی باکتری است و در میان همه سویه ها مشترک می باشد که در تشخیص مولکولی و سرولوژی بروسلوز نیز مورد استفاده قرار گرفته است (۷-۱۰). به عنوان یک آنتی ژن سطحی و یک پروتئین مشترک میان تمام گونه های بروسلا، این پروتئین می تواند یک هدف مناسب جهت طراحی واکسن زیر واحدی باشد. هدف از مطالعه حاضر بررسی پاسخ های سیستم ایمنی میزبان موشی نسبت به این آنتی ژن پروتئینی است و این که در نهایت مشخص گردد آیا آنتی ژن مذکور قابلیت استفاده در تحقیقات آتی طراحی واکسن را دارد یا خیر.

مواد و روش ها

تولید پروتئین نو ترکیب rBCSP31: ژن پروتئین سطحی ۳۱ کیلودالتنی بروسلا (شماره دست یابی embl M20404) توسط همین تیم در پلاسمید بیانی pET28a(+) کلون شده است (اطلاعات در حال انتشار). پلاسمید نو ترکیب وارد سویه بیانی *E. coli* BL21 شد و پس از رشد در محیط مایع LB، تولید پروتئین با افزودن ۱ میلی مولار IPTG القا شد. سلول های باکتری پس از ۴ ساعت اینکوباسیون متعاقب القاء، با سانتریفیوژ جمع آوری و دو

¹ The Council of European Convention ETS 123 on the Protection of Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes

بود و مقدار ۵ میکروگرم در میلی‌لیتر به عنوان غلظت بهینه معین شده بود (اطلاعات نشان داده نشده است). برای ارزیابی میزان آنتی‌بادی‌های IgG-تام، IgG1 و IgG2a پلیت‌های الی‌زای مجزا در نظر گرفته شد. ۵ میکروگرم در میلی‌لیتر از rBCSP31 در بافر بی‌کربنات تهیه و ۱۰۰ میکرولیتر از آن به چاهک‌های پلیت‌های الی‌زا وارد و پلیت‌ها یک شب در ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. متعاقب آن، همه پلیت‌ها، سه بار با بافر فسفات نمکی (PBS; pH 7.4) حاوی ۰/۰۵ درصد توئین ۲۰ (بافر PBS-T) شستشو داده شدند. جایگاه‌های فاقد پروتئین همه چاهک‌ها با افزودن ۳۰۰ میکرولیتر از محلول ۱ درصد آلبومین سرم گاوی در PBS و نگهداری به مدت ۱ ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد مسدود شدند. سپس شستشو با شرایطی که ذکر شد، سه مرتبه انجام گرفت. ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه‌های سرم موشی، هر کدام به صورت ۴ تکرار و با رقت ۱:۴۰۰ در هر چاهک قرار داده شد. پلیت‌ها در ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۲ ساعت روی صفحه متحرک دورانی نگهداری شدند. پس از طی این مدت، پلیت‌ها توسط PBS-T سه بار شستشو داده شده و متعاقب آن به صورت جداگانه به ترتیب ۱۰۰ میکرولیتر آنتی‌بادی ضد IgG موشی کانجوگه با HRP (۱:۵۰۰)، ۱۰۰ میکرولیتر آنتی‌بادی منوکلونال ضد IgG1 و ۱۰۰ میکرولیتر آنتی‌بادی منوکلونال ضد IgG2a (هر کدام با رقت ۱:۲۰۰۰) به هر چاهک در پلیت‌های الی‌زای مربوطه اضافه شد. پلیت‌ها مجدداً با شرایط فوق به مدت ۲ ساعت نگهداری شدند. پس از اینکوباسیون، پلیت‌ها با PBS-T شسته شده. سوبسترای آنزیم HRP به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر به هر چاهک پلیت مربوط به IgG-تام اضافه شد. پس از ۳۰ دقیقه از انجام واکنش رنگزایی، ۵۰ میکرولیتر اسید سولفوریک ۱ مولار به هر چاهک اضافه و جذب نوری چاهک‌ها در طول موج ۴۵۰ نانومتر ثبت شد. به پلیت‌های مربوط به IgG1 و IgG2a پس از شستشو ۱۰۰ میکرولیتر آنتی‌بادی ضد IgG بز که با HRP کانجوگه شده (با رقت ۱:۴۰۰۰) اضافه و مجدداً ۲ ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد نگهداری شد. سپس طبق شرایطی که در بالا تشریح شد، پلیت‌ها شسته شده، سوبسترای آنزیم HRP اضافه و جذب نوری در ۴۵۰ نانومتر در انتهای واکنش اندازه‌گیری شد.

ارزیابی پاسخ لنفوسیت‌های طحالی موش نسبت به rBCSP31: طحال موش‌های سالم و عفونی‌شده خارج و در بافر

PBS استریل به صورت سوسپانسیون درآمد و در لوله‌های پلی‌اتیلنی مخروطی (فالكون) برای هر موش بطور جداگانه جمع آوری و روی یخ نگهداری شد. سلول‌ها توسط سانتریفیوژ در ۳۵۰ به مدت ۱۵ دقیقه در ۴ درجه سانتیگراد جمع آوری و دو بار با PBS حاوی ۵ درصد FBS شستشو داده شدند. پس از شستشوی آخر، مایع رویی به صورت کامل دور ریخته شد و تنها سلول‌ها نگهداری و در مقدار ناچیز باقیمانده بافر در لوله معلق شدند. از بافر لیز هاپیوتونیک جهت حذف گلبول‌های قرمز استفاده شد که به این شکل تهیه می‌شود: ۸/۳ گرم از پودر کلرید آمونیوم در آب دیونیزه حل و به حجم یک لیتر رسانده می‌شود (Sol A). ۲۰ گرم پودر تریس‌باز در آب دیونیزه حل و با HCL قدرت یونی روی ۷/۵ pH تنظیم می‌شود (Sol B). نسبت ۹۰ درصد از Sol A با ۱۰ درصد از Sol B مخلوط و ۷/۵ pH تنظیم می‌گردد. بافر توسط فیلتر ۰/۲ استریل و در ۴ درجه سانتیگراد نگهداری می‌شود. به محتوای سلولی حاصل از هر لوله، بافر هاپیوتونیک لیز گلبول‌های قرمز اضافه شد و پس از ۱۲ دقیقه مجاورت در دمای اتاق، با افزودن PBS حاوی ۵ درصد FBS خنثی و سپس در ۳۵۰ برای مدت ۱۵ دقیقه در ۴ درجه سانتیگراد، سانتریفیوژ شد. سلول‌های سفید لوله‌ها با PBS همراه با ۵ درصد FBS دو بار شستشو داده شده و در نهایت در محیط RPMI کامل حاوی ۱۰ درصد FBS، اسیدهای آمینه غیر ضروری، پنی‌سیلین-استرپتومایسین و گلوتامین معلق و روی یخ نگهداری شدند. تعداد سلول‌های لمفوسیت شمارش و سوسپانسیون‌های یکنواخت ۴ میلیون سلول در میلی‌لیتر تهیه و به مقدار ۱ میلی‌لیتر در چاهک‌های پلیت کشت سلول ۲۴ خانه‌ای به صورت سه‌گانه کشت داده شد. به هر چاهک غلظت نهایی ۵ میکروگرم در میلی‌لیتر از پروتئین نوترکیب rBCSP31 اضافه شد (این مقدار قبلاً از طریق آزمایشات مربوطه در همین آزمایشگاه تعیین شده بود). کشت‌ها در اینکوباتور با اتمسفر حاوی ۵ درصد CO₂ برای ۷۲ ساعت نگهداری شدند. سپس محیط رویی کشت سلول‌ها جمع آوری، سانتریفیوژ و در ۷۰- نگهداری شد. میزان پاسخ IFN- γ ، IL-12 و IL-4 در کشت‌های سلولی با کیت‌های سنجش سایتوکاین موشی (R&D) اندازه‌گیری شد.

تجزیه و تحلیل آماری: داده‌های بدست آمده از هر سری سنجش‌ها در نرم‌افزار Excel[®] 2013 جمع‌آوری و آرشیو شد.

بحث و نتیجه گیری

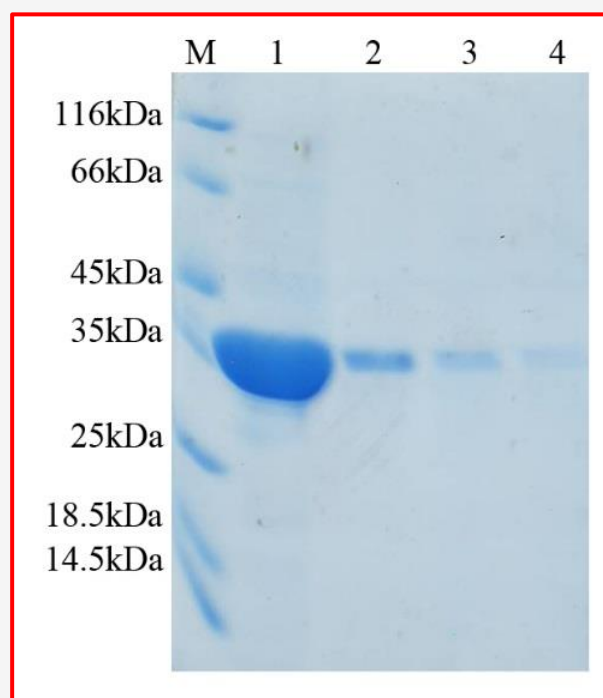
سال‌هاست از سویه‌های تخفیف حدت یافته جهت ایمن‌سازی دام‌ها استفاده می‌شود. از این سویه‌های واکسن نمی‌توان جهت ایمن‌سازی انسان استفاده نمود چراکه موجب بیماری شدید می‌گردند. تجویز سویه‌های واکسن نیز مشکلات زیادی را هم در زمینه تشخیص عفونت در دام‌ها و هم در بروز بیماری‌های انسانی سبب می‌شوند (۵). حین عفونت در میزبان، برهم‌کنش‌هایی میان اجزای مختلف سول ارگانیزم بیماریزا و سیستم ایمنی میزبان ایجاد شده و منجر به بروز پاسخ‌های ایمنی می‌گردد. شناسایی اجزایی از سلول باکتری که در طول عفونت، با سیستم ایمنی میزبان برخورد داشته و علیه آنها پاسخ اختصاصی شکل می‌گیرد و نیز ارزیابی سطح و نوع پاسخ‌های ایمنی در ابداع واکسن‌های مؤثر برای پیشگیری از بروسلاز اهمیت دارند. بروسلا یک باکتری بیماریزای داخل سلولی است و فعال شدن پاسخ‌های ایمنی سلولی میزبان جهت پاکسازی آن ضروری می‌باشد (۱۲-۱۶). بررسی ترکیبات آنتی‌ژنی که قادر باشند پاسخ ایمنی سلولی را در میزبان تحریک کنند، می‌توانند در طراحی سیستم‌های ایمن‌سازی علیه گونه‌های بروسلا مورد استفاده قرار گیرند (۱۲، ۱۴، ۱۶).

بررسی پاسخ‌های میزبان از طریق مطالعه برهم‌کنش سلول‌های طحالی با آنتی‌ژن‌های بروسلا و نیز بررسی اجزای ایمنی همورال معیاری برای پی‌بردن به نوع عملکرد ایمنی میزبان علیه عفونت بروسلاها وجود دارد و از لحاظ وزن مولکولی دسته‌بندی شده‌اند (۱۸). Brooks-Worrell و همکارانش در ۱۹۹۲ از عصاره آنتی‌ژنی استخراج شده از سویه ۱۹ بروسلا/بورتوس جهت ردیابی نوع پاسخ‌های ایجاد شده نسبت به ارگانیزم بهره گرفتند (۱۹). Kazak و همکارانش در سال ۲۰۱۰ پاسخ سایتوکاینی لمفوسیت‌های خون محیطی را نسبت به L7/L12 ارزیابی نمودند. پاسخ $IFN-\gamma$ و نیز $CD8^+$ حاکی از این است که در افراد آلوده نسبت به این پروتئین مهم پاسخ قابل توجهی پدید می‌آید که با پاسخ‌های حاصل از ارزیابی‌های مدل حیوانی که پیش از این انجام شده بود نیز هم‌خوانی دارد و این پروتئین می‌تواند در طراحی واکسن‌ها کاربرد داشته باشد (۲۰، ۲۱). در این مطالعه، پروتئین سطحی ۳۱ کیلودالتنی بروسلا به عنوان یک آنتی‌ژن مشترک بین گونه‌های مختلف باکتری به عنوان هدف ارزیابی تعیین شده است.

تجزیه و تحلیل و مقایسه داده‌ها، با استفاده از نرم‌افزار IBM® SPSS® (V. 20.0) و به کارگیری آزمون مقایسه دوتایی استاندارد Student *t-test* انجام گرفت. اختلاف داده‌ها با مقدار *p* کمتر از ۰/۰۵ به عنوان معنی‌دار در نظر گرفته شد.

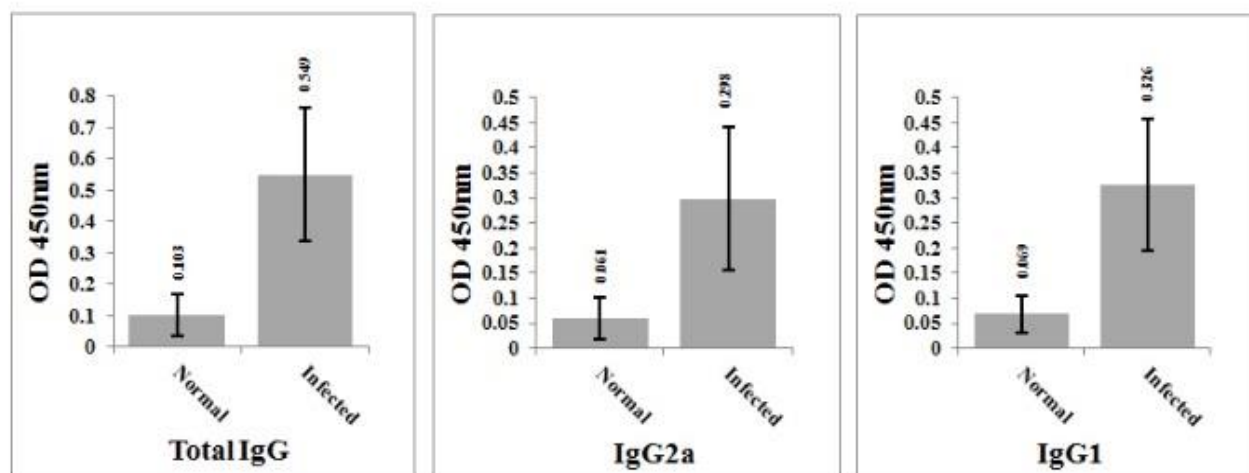
نتایج

پروتئین نوترکیب rBCSP31 بیان و با غلظت ۱،۳ میلی‌گرم در میلی‌لیتر خالص شد (شکل ۱). میانگین جذب نوری نتایج

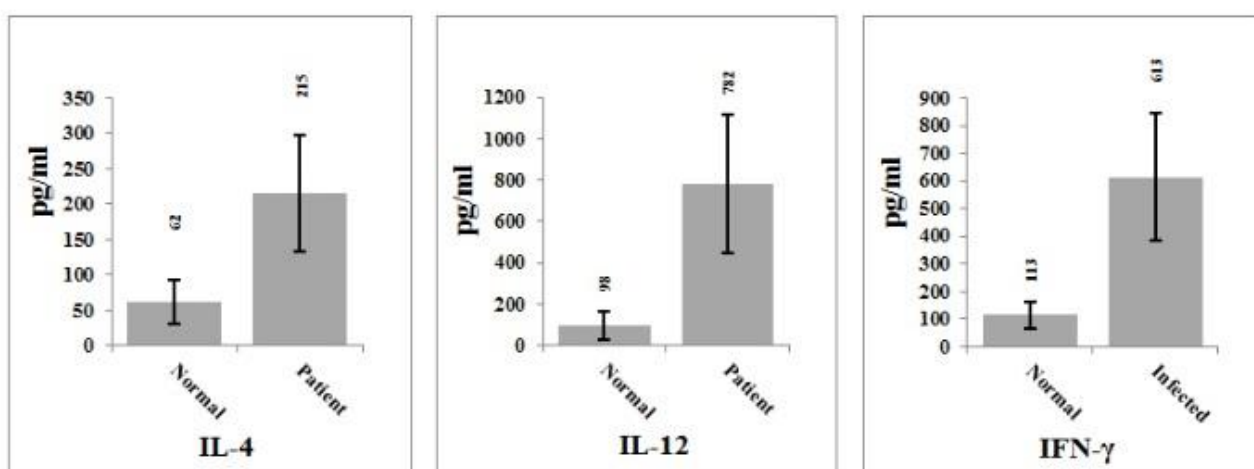


شکل ۱: نتیجه الکتروفورز پروتئین نوترکیب rBCSP31 در ژل پلی‌اکریلامید ۱۲/۵ درصد که با کوماسی G-250 کلئیدال رنگ‌آمیزی شده است. M: مارکر پروتئینی و ردیف ۱ تا ۴ نمونه پروتئین rBCSP31 تخلیص شده را نمایش می‌دهد.

سنجش IgG-تام، IgG1 و IgG2a در شکل ۲ نمایش داده شده است. مقادیر با آزمون *t-test* ارزیابی شدند و در هر سه مورد، اختلاف معنی‌داری بین سطح آنتی‌بادی‌ها در موش‌های عفونی و موش‌های سالم مشاهده شد ($p < 0.05$). مقادیر سایتوکاین‌های تولید شده در شکل ۳ نمایش داده شده است. تجزیه و تحلیل داده‌های آماری به روش *t-test*، نشان می‌دهد پاسخ $IFN-\gamma$ و IL-12 و IL-4 نسبت به تحریک با rBCSP31 اختلاف معنی‌داری را بین موش‌های عفونی و سالم نشان می‌دهد ($p < 0.05$).



شکل ۲: سطح تولید آنتی‌بادی‌های IgG اختصاصی علیه rBCSP31 که با روش الایزای مستقیم بدست آمده است. در هر سه ارزیابی، پروتئین rBCSP31 به عنوان آنتی‌ژن هدف کف پلیت‌ها متصل شده و آنتی‌بادی‌های اختصاصی موجود علیه آن در سرم موش‌های عفونی و کنترل سنجیده شده‌اند. در همه آزمایشات، گروه موش‌های عفونی با گروه موش‌های سالم اختلاف معنی‌داری را نشان می‌دهند ($p < 0.05$).



شکل ۳: سطح تولید سایتوکاین‌ها در پاسخ به تحریک کشت سلول‌های طحالی با rBCSP31. سلول‌های طحالی موش‌های عفونی و غیر عفونی استخراج و به تعداد ۴ میلیون در میلی‌لیتر محیط تقویت شده RPMI در پلیت‌های ۲۴ خانه کشت داده شدند. این سلول‌ها توسط ۵ میکروگرم در میلی‌لیتر از پروتئین نوترکیب rBCSP31 تحریک و ۷۲ ساعت اینکوبه شدند. میزان IL-4، IL-12 و IFN-γ ترشح شده از این سلول‌ها در محیط کشت با روش الایزا سنجیده شد. این در همه آزمایشات، گروه موش‌های عفونی با گروه موش‌های سالم اختلاف معنی‌داری را نشان می‌دهند ($p < 0.05$).

پروتئین نوترکیب حاصل نقش دارد اما می‌تواند پاسخ‌های ایمنی نسبت به هدف را تحت تأثیر منفی قرار دهد. در مطالعه حاضر، BCSP31 در سیستم pET28a(+) تولید شده و تنها تعداد کمی آمینو اسید به ابتدای آن اضافه شده است. پروتئین حاصل از تحقیق حاضر به طور کامل محلول بوده با توجه به عدم حضور

این پروتئین در سال ۲۰۱۲ توسط Zhang و همکارانش به صورت فیوژن با پروتئین متصل شونده به مانوز (Y) و پیش از آن نیز توسط همین شخص و همکارانش به صورت فیوز شده با پروتئین GST تولید شده بود (۸). در هر دو مطالعه مذکور یک بخش پروتئینی بزرگ به BCSP31 اضافه شده که با اینکه در حلالیت



می‌باشد. تولید سایتوکاین‌ها نیز از سویی قدرت این آنتی‌ژن مستقر در دیواره را در برانگیختن پاسخ‌ها نشان می‌دهد و از سوی دیگر بالا بودن سطح پاسخ IL-12 و IFN- γ نشان می‌دهد این پروتئین در القای و تقویت پاسخ‌های ایمنی سلولی نقش دارد. پاکسازی ارگان‌یسم بیمارها از بدن فرد مبتلا نیز وابسته به پاسخ‌های سلولی است و به نظر می‌رسد از BCSP31 به عنوان یک آنتی‌ژن ایمن‌زا که قادر به تحریک پاسخ‌های ایمنی سلولی است جهت مطالعات واکسن بروسلا استفاده نمود.

بخش‌های پروتئینی بزرگ، پاسخ‌های قابل اعتماد تری را بدست می‌دهد.

نتایج مطالعه حاضر حاکی از قدرت برانگیختن پاسخ همورال و سایتوکاین‌های IL-4، IL-12 و IFN- γ لمفوسیتی توسط BCSP31 بروسلا می‌باشد. سطوح آنتی‌بادی نشان می‌دهد که این پروتئین حین عفونت میزبان موشی به طور قابل ملاحظه‌ای با سیستم ایمنی برهم‌کنش داشته و مقدار آن در سلول باکتری به حدی است که قادر به القای میزان قابل توجهی آنتی‌بادی

References

1. Diaz Aparicio E. Epidemiology of brucellosis in domestic animals caused by *Brucella melitensis*, *Brucella suis* and *Brucella abortus*. *Rev Sci Tech*. 2013;32(1):53-60.
2. Gonzalez D, Grillo MJ, De Miguel MJ, Ali T, Arce-Gorvel V, Delrue RM, et al. Brucellosis vaccines: assessment of *Brucella melitensis* lipopolysaccharide rough mutants defective in core and O-polysaccharide synthesis and export. *PLoS One*. 2008;3(7):e2760.
3. Bardenstein S, Mandelboim M, Ficht TA, Baum M, Banai M. Identification of the *Brucella melitensis* vaccine strain Rev.1 in animals and humans in Israel by PCR analysis of the PstI site polymorphism of its omp2 gene. *J Clin Microbiol*. 2002;40(4):1475-80.
4. 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.
5. Wallach JC, Ferrero MC, Victoria Delpino M, Fossati CA, Baldi PC. Occupational infection due to *Brucella abortus* S19 among workers involved in vaccine production in Argentina. *Clin Microbiol Infect*. 2008;14(8):805-7.
6. Gomez G, Adams LG, Rice-Ficht A, Ficht TA. Host-*Brucella* interactions and the *Brucella* genome as tools for subunit antigen discovery and immunization against brucellosis. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 2013; 3:17.
7. Zhang L, Wu XA, Zhang FL, An CH, Sun YX, Bai WT, et al. Soluble expression and purification of *Brucella* cell surface protein (BCSP31) of *Brucella melitensis* and preparation of anti-BCSP31 monoclonal antibodies. *Mol Biol Rep*. 2012;39(1):431-8.
8. Zhang L, Bai W, Zhang F, Wu X, Shi M, Wang H, et al. Expression and purification of BCSP31 protein of *Brucella melitensis* and preparation of monoclonal antibodies against BCSP31. *Journal of the Fourth Military Medical University*. 2009;30(3):221-4.
9. Cao X, Qiu C, Zhou J, Lin G. High-dissolved expression of BCSP31 gene of *Brucella abortus* in *E. coli*. *Journal of Jilin Agricultural University*. 2007;29(6):683-6.
10. Bounaadja L, Albert D, Chenais B, Henault S, Zygmunt MS, Poliak S, et al. Real-time PCR for identification of *Brucella* spp.: a comparative study of IS711, bcsp31 and per target genes. *Vet Microbiol*. 2009;137(1-2):156-64.
11. Ferdowsian HR, Beck N. Ethical and scientific considerations regarding animal testing and research. *PLoS One*. 2011;6(9):e24059.
12. Skendros P, Boura P. Immunity to brucellosis. *Rev Sci Tech*. 2013;32(1):137-47.
13. Cannella AP, Tsolis RM, Liang L, Felgner PL, Saito M, Sette A, et al. Antigen-specific acquired immunity in human brucellosis: implications for diagnosis, prognosis, and vaccine development. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 2012;2:1.
14. Skendros P, Pappas G, Boura P. Cell-mediated immunity in human brucellosis. *Microbes Infect*. 2011;13(2):134-42.
15. Ireniev SI, Tarkhov AE, Ponomareva OG, Sokolova TF. [Humoral immunity parameters in occupational brucellosis patients]. *Med Tr Prom Ekol*. 2010(3):28-33.
16. Yingst S, Hoover DL. T cell immunity to brucellosis. *Crit Rev Microbiol*. 2003;29(4):313-31.
17. Weynants V, Walravens K, Didembourg C, Flanagan P, Godfroid J, Letesson JJ. Quantitative assessment by



flow cytometry of T-lymphocytes producing antigen-specific gamma-interferon in Brucella immune cattle. *Vet Immunol Immunopathol.* 1998;66(3-4):309-20.

18. Verstrete DR, Creasy MT, Caveney NT, Baldwin CL, Blab MW, Winter AJ. Outer membrane proteins of *Brucella abortus*: isolation and characterization. *Infect Immun.* 1982;35(3):979-89.

19. Brooks-Worrell BM, Splitter GA. Sodium dodecyl sulfate- and salt-extracted antigens from various *Brucella* species induce proliferation of bovine lymphocytes. *Infect*

Immun. 1992;60(5):2136-8.

20. Kazak E, Oliveira SC, Goral G, Akalin H, Yilmaz E, Heper Y, et al. *Brucella abortus* L7/L12 recombinant protein induces strong Th1 response in acute brucellosis patients. *Iran J Immunol.* 2010;7(3):132-41.

21. Oliveira SC, Zhu Y, Splitter GA. Recombinant L7/L12 ribosomal protein and gamma-irradiated *Brucella abortus* induce a T-helper 1 subset response from murine CD4+ T cells. *Immunology.* 1994;83(4):659-64.



Original Article

The Assessment of Cytokine and Antibody Responses to Recombinant 31kDa Brucella Cell-Surface Protein in *Brucella Abortus* Infected Mouse Model

Khoramabadi N¹, Mohabati Mobarez A^{1*}, Tabaraie B², Behmanesh M³, Atyabi F⁴, Aghababa H¹

1- Department of Bacteriology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

2- Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran.

3- Department of Genetics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

4- Nanotechnology Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

Received: 13 Jan 2013

Accepted: 05 Apr 2014

Abstract

Background & Objective: One of the most common diseases between zoonosis - especially in developing countries – is brucellosis. Identification of *Brucella* cell antigen combinations in terms of the amount and type of immune response in infected hosts, are important in vaccine design. 31kDa *Brucella* cell surface protein (BCSP31) is shared among all *Brucellae*. We aimed to define specific immune responses to BCSP31 which are elicited during infection of murine host with *B. abortus*. Surface protein of 31 kDa (BCSP31) is present in all strains, and here, the host immune response during murine infection with *Brucella abortus* which are formed in proportion to the proteins are studied.

Materials & Methods: Recombinant BCSP31 (rBCSP31) of *B. abortus* was produced and purified. One group of BALB/c mice were infected with pathogenic *B. abortus* 544 and maintained for 60 days; a no-infected group of mice also was considered. Specific serum antibodies directed to rBCSP31 was evaluated through ELISA. Splenocytes of mice were cultured and stimulated with rBCSP31; thereafter, IL-4, IL-12 and IFN- γ cytokine responses of spleen lymphocytes were assessed.

Results: We detected a remarkable IgG titer along with IgG1 and IgG2a specific to recombinant BCSP31 in serum samples from infected mice. Significant titers of IgG, IgG1 and IgG2a antibodies than BCSP31 in the the serum of mice infected with the virulent strain were observed. The Evaluation of Splenocytes responses to rBCSP31 also showed a significant IL-12 and IFN- γ production along with remarkable IL-4 production in infected mice. All responses were significantly different from that of non-infected mice ($p < 0.05$).

Conclusion: These findings suggest that specific humoral and cell-mediated responses to BCSP31 is formed during murine host infection with *B. abortus*. Based on these findings, rBCSP31 can be used in further design of immunogenic strategies for vaccination against brucellosis.

Keywords: *Brucella abortus*, BCSP31, antibody, Cytokine.

*Corresponding author: Mohabati Mobarez Ashraf, Department of Bacteriology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran .

Tel: +982182883862, Fax: +982182884555

Email: mmmobarez@modares.ac.ir.