Original Article

# سنجش پاسخ‌های سایتوکاینی و آنتی‌بادی نسبت به پروتئین سطحی ۳۱ کیلودالتونی نوترکیب *بروسلا* در مدل موش عفونی‌شده با *بروسلا ابورتوس*

نیما خرم‌آبادی[۱]، اشرف محبتی مبارز[۱*]، بهمن تبرایی[۲]، مهرداد بهمنش[۳]، فاطمه اطیابی[۴]، هانیه آقابابا[۱]

۱- گروه باکتری‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.
۲- انستیتوپاستور ایران، تهران، ایران.
۳- گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیست شناسی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.
۴- مرکز تحقیقات نانوتکنولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۲/۱۰/۲۳ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۳/۰۱/۱۶

## چکیده

**زمینه و هدف**: یکی از بیماری‌های شایع مشترک بین انسان و دام بروسلوز است و در کشورهای درحال 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 نوترکیب تولید و تخلیص شد. یک گروه موش BALB/c با تلقیح *بروسلا ابورتوس* ۵۴۴ عفونی و به مدت ۶۰ روز نگهداری شدند؛ گروه کنترل غیرعفونی نیز در نظر گرفته شد. از پروتئین خالص جهت ردیابی پاسخ‌های آنتی‌بادی اختصاصی در سرم موش‌های عفونی شده به روش ELISA استفاده شد. پاسخ‌های سایتوکاینی IL-4، IL-12 و IFN-γ نسبت به تحریک کشت سلول‌های طحالی موش‌ها با پروتئین نوترکیب ارزیابی شدند.

**نتایج**: تیتر قابل توجه آنتی بادی‌های اختصاصی IgG و مقدار IgG1 و IgG2a نسبت به BCSP31 در سرم موش‌هایی که با سویه بیماریزا عفونی شده بودند مشاهده شد. ارزیابی پاسخ سایتوکاینی 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 ارزیابی ها 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 هومورال و سایتوکاینی قابل توجهی نسبت به پروتئین سطحی ۳۱ کیلودالتنی ایجاد می‌شود. براساس این یافته‌ها، از این پروتئین می‌توان در طراحی روش‌های ایمونیزاسیون استفاده نمود.

کلمات کلیدی: ***بروسلا ابورتوس*، BCSP31، آنتی‌بادی، سایتوکاین.**

## مقدمه

*بروسلا* باکتری بیماریزای داخل سلولی اختیاری است. گونه‌های این ارگانیسم بیماری بروسلوز 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 آنتی بادی‌های 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 سویه ها نیز رخ داده است (۳-۵). هیچ واکسن تأیید شده‌ای جهت پیشگیری از بروسلوز

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

انسانی وجود ندارد. طراحی روش‌های ایمن‌سازی مؤثر که فاقد مشکلات فعلی واکسن‌های تخفیف حدت یافته باشند، به بررسی اجزاء سلول باکتری و ارزیابی پاسخ‌های میزبان به آنتی‌ژن مورد نظر حین عفونت نیازمند است (۶). هنگامی که میزبان حیوانی یا انسانی با سویه‌های بیماریزای بروسلا عفونی می‌شوند، پاسخ‌های اختصاصی علیه اجزای مختلف سلول باکتری در بدن میزبان شکل می‌گیرد. یکی از ارکان مهم طراحی واکسن‌های زیرواحدی شناسایی آنتی‌ژن‌های مختلفی است که در طول عفونت با باکتری بیماریزا، موجب القای پاسخ‌های ایمنی کارآمد در میزبان می‌شوند و از این ترکیبات می‌توان برای طراحی روش‌های ایمن‌سازی استفاده نمود. مدل‌های حیوانی عفونی، یکی از ابزار قابل اتکا جهت چنین بررسی‌هایی هستند و محققین می‌توانند با ارزیابی پاسخ‌های هومورال و سلولی اختصاصی نسبت به آنتی‌ژن‌های مورد نظر که حین عفونت با باکتری بیماریزا در بدن میزبان شکل می‌گیرد، نسبت به طراحی آزمایشات بعدی اقدام نمایند. پروتئین سطحی ۳۱ کیلودالتنی *بروسلا* (BCSP31) یکی از آنتی‌ژن‌های غشای خارجی باکتری است و در میان همه سویه‌ها مشترک می‌باشد که در تشخیص مولکولی و سرولوژی بروسلوز نیز مورد استفاده قرار گرفته است (۷-۱۰). به عنوان یک آنتی‌ژن سطحی و یک پروتئین مشترک میان تمام گونه‌های *بروسلا*، این پروتئین می‌تواند یک هدف مناسب جهت طراحی واکسن زیرواحدی باشد. هدف از مطالعه حاضر بررسی پاسخ‌های سیستم ایمنی میزبان موشی نسبت به این آنتی‌ژن پروتئینی است و این‌که در نهایت مشخص گردد آیا آنتی‌ژن مذکور قابلیت استفاده در تحقیقات آتی طراحی واکسن را دارد یا خیر.

## مواد و روش‌ها

**تولید پروتئین نوترکیب rBCSP31:** ژن پروتئین سطحی ۳۱ کیلودالتنی *بروسلا* (شماره دست‌یابی embl M20404) توسط همین تیم در پلاسمید بیانی pET28a(+) کلون شده‌است (اطلاعات در حال انتشار). پلاسمید نوترکیب وارد سویه بیانی *E. coli* BL21 شد و پس از رشد در محیط مایع LB، تولید پروتئین با افزودن ۱ میلی‌مولار IPTG القا شد. سلول‌های باکتری پس از ۴ ساعت اینکوباسیون متعاقب القاء، با سانتریفیوژ جمع آوری و دو بار با سرم نمکی ۰/۹ درصد شستشو داده شدند. توده سلولی حاصله در بافر حاوی اوره ۸ مولار B (100mM NaH2PO4, 10mM Tris-HCl, and 8M urea; pH 8.5) حل و پس از جداسازی اجسام باقیمانده نامحلول سلول با رزین نیکل مجاور شد. مخلوط حاصل پس از یکساعت مجاورت همراه با هم‌خوردن مداوم در دمای اتاق به ستون پلی‌استایرنی منتقل شد. رزین با بافر C (100mM NaH2PO4, 10mM Tris-HCl, and 8M urea; pH 8.5) شستشو داده شد. حذف اوره با استفاده از بافرهای حاوی شیب کاهشی غلظت اوره (۸، ۶، ۴، ۲، ۱ و ۰ مولار اوره) انجام و در نهایت پروتئین ها با استفاده از محلول ایمیدازول ۲۵۰ میلی‌مولار 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 نوترکیب 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 می‌گذشت انتخاب و جداگانه نگهداری شدند. یک گروه از موش‌ها، با رعایت تمهیدات ایمنی‌زیستی در قرنطینه، با سوسپانسیون حاوی $10^5$ CFU/ml از سویه بیماریزای *بروسلا ابورتوس* ۵۴۴ به صورت داخل صفاقی آلوده شدند. موش‌ها 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 درنظر 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[1] انجام گرفت (۱۱).

**جمع‌آوری نمونه‌های سرم:** از موش‌های سالم و موش‌های عفونی‌شده پس از گذشت مدت ۲ ماه از تلقیح سویه بیماریزا، از طریق سینوس چشمی خون‌گیری به عمل آمد و سرم آنها جدا و در شرایط ۷۰- نگهداری شد.

**بررسی حضور آنتی‌بادی‌های IgG اختصاصی علیه rBCSP31:** ابتدا از آنتی‌سرم اختصاصی rBCSP31 که در موش‌های BALB/c تهیه شده بود (در همین آزمایشگاه) جهت تعیین مقدار بهینه برای بارگذاری پلیت‌های الایزا استفاده شده

[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 الایزای مجزا درنظر گرفته شد. ۵ میکروگرم در میلی‌لیتر از rBCSP31 در بافر بی‌کربنات تهیه و ۱۰۰ میکرولیتر از آن به چاهک‌های پلیت‌های الایزا 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 داده‌شد. 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 (۱:۵۰۰۰)، ۱۰۰ میکرولیتر آنتی‌بادی منوکلونال ضد IgG1 و ۱۰۰ میکرولیتر آنتی‌بادی منوکلونال ضد IgG2a (هرکدام با رقت ۱:۲۰۰۰) به هر چاهک در پلیت‌های الایزای مربوطه اضافه شد. پلیت‌ها مجددا 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 ۱مولار 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 مجددا 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 اندازی‌گیری شد.

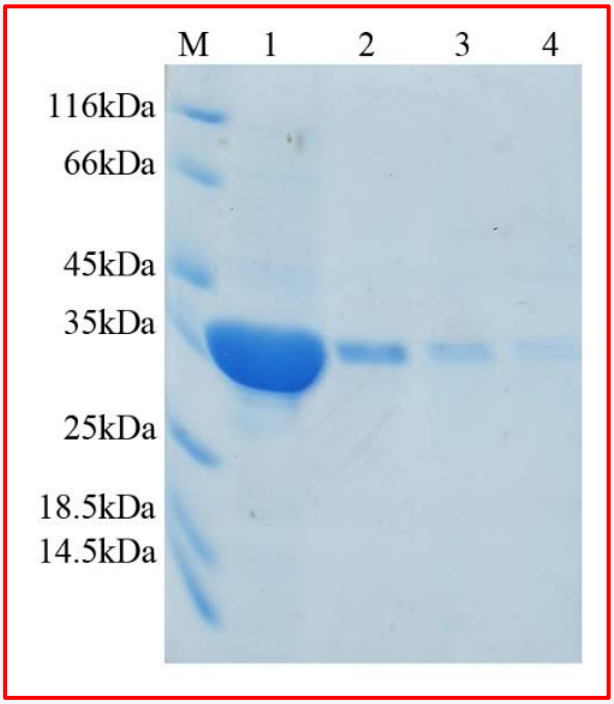
**ارزیابی پاسخ لنفوسیت‌های طحالی موش نسبت به rBCSP31:** طحال موش‌های سالم و عفونی‌شده خارج و در بافر PBS استریل به صورت سوسپانسیون درآمد و در لوله‌های پلی‌اتیلنی مخروطی (فالکون) برای هر موش بطور جداگانه جمع آوری و روی یخ نگهداری شد. سلول‌ها توسط سانتریفیوژ در xg ۳۵۰ به مدت ۱۵ دقیقه در ۴ درجه سانتیگراد جمع آوری و دو بار با PBS حاوی ۵ درصد FBS شستشو داده شدند. پس از شستشوی آخر، مایع رویی به صورت کامل دور ریخته‌شد و تنها سلول‌ها نگهداری و در مقدار ناچیز باقیمانده بافر در لوله معلق شدند. از بافر لیز هایپوتونیک جهت حذف گلبول‌های قرمز استفاده شد که به این شکل تهیه می‌شود: ۸/۳ گرم از پودر کلریدآمونیوم 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 pH ۷/۵ تنظیم می‌شود (Sol B). نسبت ۹۰ درصد از Sol A با ۱۰ درصد از Sol B مخلوط و pH ۷/۵ تنظیم می‌گردد. بافر توسط فیلتر ۰/۲ استریل و در ۴ درجه سانتیگراد نگهداری می‌شود. به محتوای سلولی حاصل از هر لوله، بافر هایپوتونیک 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 ×g ۳۵۰ برای مدت ۱۵ دقیقه در ۴ درجه سانتیگراد، سانتریفوژ 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 سوسپانسیون های 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 قبلا از طریق آزمایشات مربوطه در همین آزمایشگاه تعیین شده بود). کشت‌ها در اینکوباتور با اتمسفر حاوی ۵ درصد $CO_2$ 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.

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



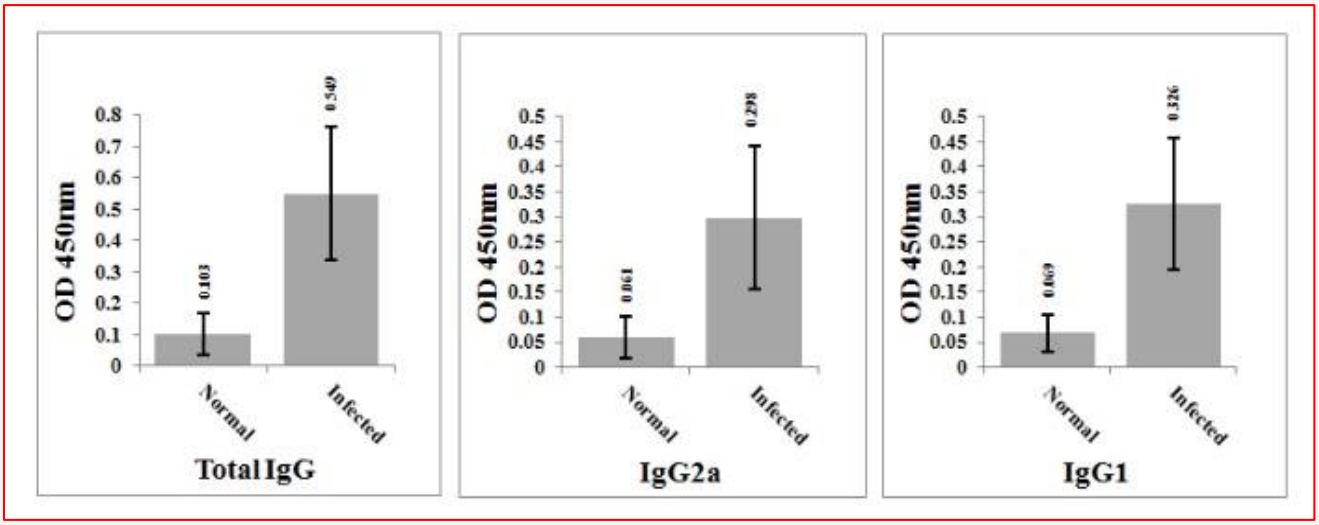

**شکل ۱:** نتیجه الکتروفورز پروتئین نوترکیب rBCSP31 در ژل پلی‌اکریلامید ۱۲/۵ درصد که با کوماسی G-250 کلوئیدال رنگ‌آمیزی شده است. M: مارکر پرو تئینی و ردیف ۱ تا ۴ نمونه پروتئین rBCSP تخلیص شده را نمایش می‌دهد.

سنجش IgG-تام، IgG1 و IgG2a در شکل ۲ نمایش داده‌شده 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-γ و IL-12 و IL-4 نسبت به تحریک با rBCSP31 اختلاف معنی‌داری را بین موش‌های عفونی و سالم نشان می‌دهد ($p<0.05$).

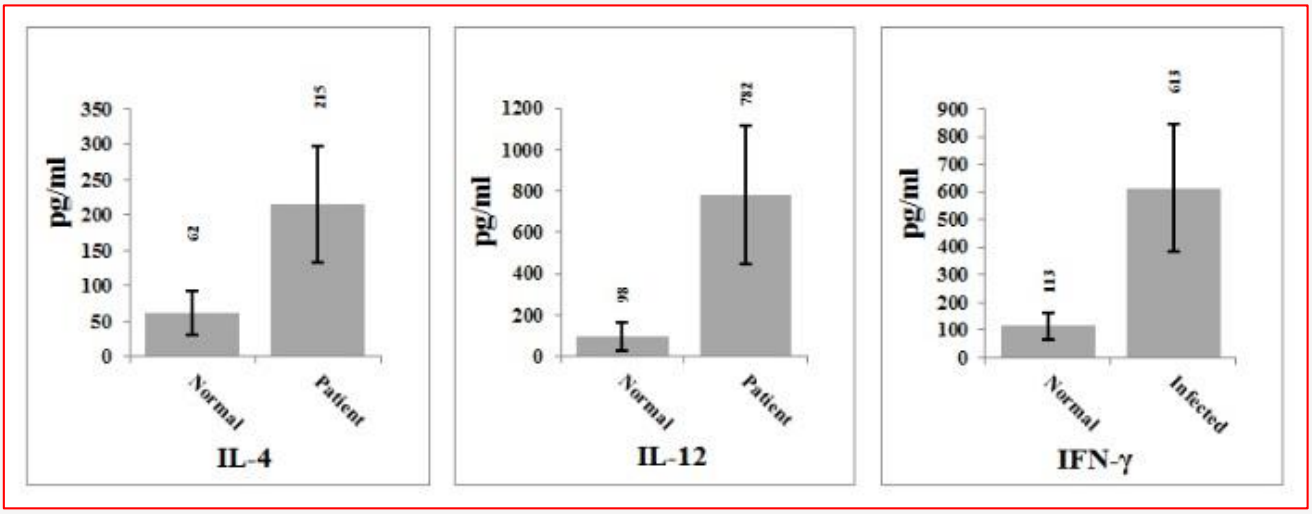
## بحث و نتیجه گیری

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 ارگانیسم 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 بروسلوز 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 هومورال معیاری برای پی‌بردن به نوع عملکرد ایمنی میزبان علیه عفونت *بروسلا*ها 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 ابورتوس* جهت ردیابی نوع پاسخ‌های ایجاد شده نسبت به ارگانیسم بهره گرفتند (۱۹). Kazak و همکارانش در سال ۲۰۱۰ پاسخ سایتوکاینی لمفوسیت‌های خون محیطی را نسبت به L7/L12 ارزیابی نمودند. پاسخ IFN-γ 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 ارزیابی های 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.




**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 اسنجیده شد. این در همه آزمایشات، گروه موش‌های عفونی با گروه موش‌های سالم اختلاف معنی‌داری را نشان می‌دهند ($p<0.05$).

این پروتئین در سال ۲۰۱۲ توسط Zhang و همکارانش به صورت فیوژن با پروتئین متصل شونده به مانوز (۷) 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 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 امینو اسید به ابتدای آن اضافه شده است. پروتئین حاصل از تحقیق حاضر به طور کامل محلول بوده با توجه به عدم حضور

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

نتایج مطالعه حاضر حاکی از قدرت برانگیختن پاسخ هومورال 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 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 بیماریزا 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.

## 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. Verstreate 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 N[1], Mohabati Mobarez A[1*], Tabaraie B[2], Behmanesh M[3], Atyabi F[4], Aghababa H[1]**

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,