مجله دنیای میکروب‌ها
سال دوازدهم شماره دوم (پیاپی ۳۹) تابستان ۱۳۹۸
صفحات ۱۱۳-۱۰۱

Original Article

تأثیراجوانتی DNA باکتریایی هم تیپ و غیرهم تیپ در ایجاد پاسخ های ایمنی علیه *پاستورلا مالتوسیدا* در موش های نژاد BALB/c

یحیی تهمتن[۱]، مریم همایون[۲*]، محمد کارگر[۳]

[۱]دانشیار، بخش میکروب شناسی، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی شعبه شیراز، سازمان تحقیق، آموزش و ترویج کشاورزی، شیراز، ایران،[۲] دانش آموخته دکتری، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحدعلوم وتحقیقات،تهران، ایران، [۳]استاد، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، جهرم، ایران.

چکیده

سابقه و هدف: *پاستورلا مالتوسیدا* یک پاتوژن اصلی حیوانی عامل ایجاد کننده نمونیا و سپتی سمی هموراژیک در گاو، گوسفند و بز، وبای پرندگان در مرغ و رینیت آتروفیک در خوک و همچنین یک پاتوژن فرصت طلب انسانی است. در این پژوهش، پاسخ های ایمنی هومورال و سلولی و ایمنی محافظتی القا شده توسط واکسن غیرفعال شده با آهن همراه با دو نوع DNA باکتریایی مختلف به عنوان اجوانت مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: ابتدا *پاستورلا مالتوسیدا* بر روی محیط BHI broth کشت داده شد. سپس با استفاده از کلرید آهن غیرفعال گردید. از ژل هیدروکسید آلومینیوم و DNA باکتری های *پاستورلا مالتوسیدا* نوع A (DNA هم تیپ) و *پاستورلا مالتوسیدا* نوع B (DNA غیرهم تیپ) به عنوان اجوانت استفاده شد. موش های نژاد BALB/c با دو دوز از واکسن های غیرفعال شده به فاصله ۲ هفته ایمن و ٤ هفته پس از ایمن سازی دوم (دوز بوستر) چالش گردیدند. سپس عیار آنتی بادی سرم با روش الایزا به صورت هفتگی اندازه گیری شد. پاسخ ایمنی سلولی ۲۸ روز پس از ایمن سازی با استفاده از آزمون DTH و اندازه گیری اینترلوکین ٦ و ۱۲ بر روی نمونه های سرم حیوانات هدف ارزیابی گردید.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که عیار آنتی بادی در گروه های دریافت کننده اجوانت bDNA نسبت به گروه دریافت کننده اجوانت آلوم و گروه های کنترل بالاتر بود. بالاترین سطح آنتی بادی (۰/۳۷۲) از گروه IIA+AbDNA به دست آمد. میزان محافظت در گروه های ایمن شده با اجوانت هم تیپ AbDNA بهتر از سایر گروه ها بود و ۱۰۰ درصد موش های این گروه پس از چالش زنده ماندند. بالاترین عیار سرمی اینترلوکین های ٦ و ۱۲ مربوط به گروه IIA+AbDNA بود.

نتیجه گیری: نتایج نشان داد که bDNA یک اجوانت مؤثر است و به دلیل ویژگی تحریک کننده می تواند به عنوان القاکننده پاسخ های ایمنی هومورال و سلولی در تولید واکسن مورد استفاده قرار گیرد. همچنین یافته ها توانایی بهتر bDNA هم تیپ در ایجاد پاسخ های ایمنی را نشان داد.

واژگان کلیدی: *پاستورلا مالتوسیدا*، DNA باکتریایی، اجوانت، کلرید آهن، واکسن، DTH.

دریافت مقاله: اسفند ماه ۹۷ پذیرش برای چاپ: فروردین ماه ۹۸

*) آدرس برای مکاتبه: شیراز، موسسه آموزش عالی زند، گروه زیست شناسی
تلفن: ۰۹۱۷۱۲۷۱٦۵۰ پست الکترونیک: maryam.homayoon@yahoo.com

حقوق نویسندگان محفوظ است. این مقاله با دسترسی آزاد و تحت مجوز مالکیت خلاقانه (http://creativecommons.org/licenses/bync/4.0/) در فصلنامه دنیای میکروب‌ها منتشر شده است. هرگونه استفاده غیرتجاری فقط با استناد و ارجاع به اثر اصلی مجاز است.

مقدمه

جنس *پاستورلا* یک کوکوباسیل گرم منفی غیرمتحرک بتاهمولیتیک متعلق به خانواده *پاستورلاسه* است. در حیوانات و انسان ها، گونه های *پاستورلا*، به ویژه *پاستورلا مالتوسیدا* (*Pasteurella multocida*) اغلب با ایجاد عفونت های حاد و مزمن در ارتباط هستند (۳-۱). انتقال پاتوژن زئونوز به انسان معمولاً از طریق ذرات حیوانی یا تماس با ترشحات بینی اتفاق می افتد. این میکروارگانیسم در گوسفند اغلب بیماری های تنفسی و نمونیا ایجاد می کند و در پرندگان باعث ایجاد بیماری وبا، در گاو و بوفالو سپتی سمی هموراژیک، در خرگوش التهاب اپی تلیال بینی و در انسان به ندرت سبب نکروز پوستی می گردد (۲ و ۳).

عفونت های وابسته به *پاستورلا مالتوسیدا* یا پاستورلوز توسط سروتیپ های مختلف توکسین زا و غیرتوکسین زای باکتری ایجاد می شوند. در گوسفند و بز سروتیپ A ایجاد بیماری نمونیه می کند. به طور کلی عامل اکثر عفونت ها سروتیپ A می باشد. اما تیپ D نیز سروتیپ مهمی برای ایجاد بیماری های تنفسی به ویژه در خوک، خرگوش و گوسفند است. با توجه به توانایی سروتیپ های مختلف برای بیماری زایی، ایمنی زایی در برابر یک سروتیپ نمی تواند محافظت در برابر سروتیپ های غیر هم تیپ ایجاد نماید (٤).

آسیب زایی به واسطه واکنش پیچیده ای میان عوامل میزبان و عوامل بیماری زایی باکتری مانند لیپوپلی ساکارید، کپسول پلی ساکاریدی، پروتین های غشای خارجی و فیمبریه می باشد (۵). با توجه به بروز نسبتاً پایین عفونت های انسانی، بیشتر مطالعات ایمن سازی یا واکسیناسیون علیه عفونت های *پاستورلا* بر روی کنترل بیماری های حیوانی انجام می شود. واکسیناسیون یکی از مهم ترین راه کارها برای جلوگیری از بیماری های عفونی در دام است. با توجه به اهمیت واکسیناسیون و پیدایش بیماری های جدید، به وضوح تقاضا برای فن آوری های جدید واکسن در حال افزایش می باشد. عامل محدود کننده در کارایی واکسن، ضعیف بودن خاصیت ایمنی زایی آنتی ژن های خالص شده ای است که به تنهایی تزریق می گردند. در نتیجه، استفاده از ترکیباتی مانند اجوانت که باعث افزایش پاسخ ایمنی شوند ضروری می باشد. اجوانت ها در ترکیب با واکسن ها سبب تحریک سیستم ایمنی شده و نقش مهمی در ایجاد پاسخ های ایمنی مناسب در برابر واکسن های غیرفعال شده، آنتی ژن های پپتیدی ساختگی و واکسن های پروتئینی نوترکیب بازی می کنند. بنابراین، اجوانت های مختلفی برای افزایش ایمنی زایی واکسن ها برای کنترل بیماری های عفونی در انسان و حیوان استفاده شده است (٦).

یکی از گسترده ترین واکسن های مورد استفاده علیه *پاستورلا مالتوسیدا* در آسیا، آنتی ژن کامل سلولی باکتری کشته شده با فرمالین همراه با ژل هیدروکسید آلومینیوم (Alum) می باشد. مشکل این واکسن عدم ایمنی زایی طولانی مدت و التهاب موضعی در ناحیه تزریق است (۱). از دیگر واکسن های مورد استفاده، باکترین های واجد اجوانت روغن هستند که این واکسن ها نسبت به واکسن های ژلی ایمنی طولانی تری می دهند، اما به دلیل ایجاد التهاب و واکنش های شدیدتر در ناحیه تزریق و همچنین ویسکوزیته و چسبندگی زیاد، تمایل چندانی به استفاده از واکسن های روغنی وجود ندارد (۷).

گروه دیگر از اجوانت ها، اجوانت های باکتریایی هستند. سلول های سیستم ایمنی مهره داران، وجود عفونت را به واسطه شناسایی الگوهای مولکولی مرتبط با پاتوژن (pathogen associated molecular patterns = PAMPs) تشخیص می دهند. این الگوها، مولکول های خاصی از پاتوژن ها می باشند که اجزای سیستم ایمنی توانایی شناسایی آن ها را دارند و پاتوژن از طریق مولکول های PAMP به گیرنده های سلول های بیگانه خوار متصل می شود. پپتیدوگلیکان، لیپو پلی ساکارید، لیپوپروتئین و DNA باکتریایی از جمله ترکیباتی هستند که به عنوان PAMP رفتار می کنند. ترکیبات باکتریایی به واسطه اتصال به گیرنده شبیه (Toll like receptor= TLR) Toll توانایی تحریک سیستم های ایمنی ذاتی و اکتسابی را دارند.

TLR را می توان در سطح سلول و بر روی غشاهای درون سلولی ماکروفاژها، سلول های دندریتیک، نوتروفیل ها و

سلول های اپی تلیال مخاطی مشاهده نمود (۸).

سیستم ایمنی پستانداران به وسیله ی DNA با ٦ جفت باز حاوی یک دی نوکلئوتید CpG غیرمتیله، تحریک می شود. این توالی را به طور معمول در ژنوم باکتری ها می توان مشاهده نمود. توالی CpG غیرمتیله موجود در DNA باکتریایی در اثر ارتباط با TLR می تواند پاسخ های سلولی موکوسی را القا نماید (۱۰-۸). DNA باکتریایی همچنین موجب تکثیر سلول های B و T، ماکروفاژها و تحریک ترشح ایمونوگلوبولین ها می شود (۸).

در رابطه با نقش اجوانتی DNA باکتریایی مطالعات محدودی صورت گرفته است. اما به نظر می رسد که این اجوانت، توانایی ایجاد پاسخ های ایمنی هومورال و سلولی قوی تری دارد. بودی (Bode) و همکاران در سال ۲۰۱۱ از الیگوداکسی نوکلئوتیدهای مصنوعی (ODNs) حاوی بنیان های CpG غیرمتیله به عنوان اجوانت برای تهیه واکسن استفاده نمودند(۱۱).

کومار (Kumar) و همکاران در سال ۲۰۰۵ در هند، *سالمونلا تیفی موریوم* را با کلرید آهن غیرفعال نمودند و همراه با DNA باکتریایی هم تیپ به عنوان واکسن استفاده کردند (۱۲). در اکثر موارد غیرفعال سازی باکتری با فرمالین صورت می گیرد، اما در این پژوهش غیرفعال سازی باکتری با افزایش میزان آهن در محیط انجام شد تا بتوان تأثیر نحوه غیرفعال سازی باکتری را نیز در افزایش ایمنی زایی بررسی نمود. از آنجایی که میزان تأثیر ماده ایمونوژن و دوام عیار آنتی بادی تولید شده در بدن حیوان اهمیت ویژه ای دارد، در این پژوهش حیوانات ایمن شده با حداقل دوز کشنده ی سویه حاد *پاستورلا مالتوسیدا* چالش شدند.

هدف از این پژوهش، بررسی تأثیر DNA باکتریایی هم تیپ و غیرهم تیپ به عنوان اجوانت در افزایش ایمنی زایی آنتی ژن *پاستورلا مالتوسیدا* در حیوان آزمایشگاهی بود.

مواد و روش ها

الف) حیوان آزمایشگاهی: این پژوهش به صورت تجربی (Experimental) انجام شد. جامعه آماری مورد پژوهش، موش های نژاد BALB/c ماده با وزن حدود ۱۸-۱٦ گرم بودند. این موش ها از بخش حیوانات آزمایشگاهی مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی شیراز تهیه شدند. تمامی مراحل آزمایش در این مؤسسه انجام گردید. همچنین در این پژوهش از باکتری *پاستورلا مالتوسیدا* تیپ A جدا شده از گوسفند به عنوان سویه اصلی به منظور تهیه ایمونوژن استفاده شد.

ب) غیرفعال سازی باکتری با استفاده از آهن: برای تهیه باکتری غیر فعال شده با آهن، یک کلنی از باکتری *پاستورلا مالتوسیدا* به ۵ میلی لیتر محیط Brain Heart Infusion (BHI) (شرکت مرک، آلمان) تلقیح و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه گذاری شد. پس از ٢٤ ساعت محیط BHI حاوی باکتری به ۱ لیتر محیط BHI تازه منتقل گردید تا باکتری در حجم وسیع تکثیر یابد. باکتری ها پس از ٤٥ دقیقه سانتریفیوژ با دورg ۱۳۰۰۰ در دمای ٤ درجه سلسیوس جداسازی و سوسپانسیون آن در نرمال سالین تهیه شد. برای غیر فعال سازی باکتری، محلول کلرید فریک (1M ($FeCl_3$) با غلظت نهایی ۱۰ mM به سوسپانسیون باکتری اضافه و به مدت ٢٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلیسیوس گرمخانه گذاری شد. سپس سوسپانسیون باکتری به مدت ۲۵ دقیقه در g ۳۵۰۰ سانتریفیوژ شد و برای حذف آهن اضافی، آنتی ژن غیرفعال شده، دو بار با نرمال سالین شستشو داده شد. در نهایت سوسپانسیونی از آنتی ژن غیرفعال شده باکتریایی در نرمال سالین تهیه گردید و برای استفاده به عنوان ایمونوژن در یخچال نگهداری شد (۱۳).

ج) تهیه DNA باکتریایی: استخراج DNA با روش فنل- کلروفرم مطابق پروتکل پیشنهادی چینگ (Cheng) و همکاران در سال ۲۰۰٦ انجام شد (١٤). در این روش، از افزودن ۱۰۰ میکرولیتر فنل به سوسپانسیون و ورتکس به مدت ٦۰ ثانیه برای متلاشی شدن باکتری ها استفاده گردید. همچنین، آنزیم RNase برای حذف RNA و کلروفرم برای خالص سازی بهتر DNA مورد استفاده قرار گرفتند. در نهایت، DNA خالص با استفاده از اتانول سرد رسوب داده شد. غلظت و خلوص DNA نیز با تعیین نسبت A_{260}/A_{280} مورد بررسی

قرار گرفت.

د) سلامت و استریل بودن: برای بررسی استریل بودن ایمونوژن و اجوانت قبل از تزریق به حیوان، ۲۰ میکرولیتر از آنتی ژن غیرفعال شده با کلرید فریک و همچنین هر یک از DNAهای باکتریایی، بر روی محیط های Nutrient Agar، Blood Agar و BHI کشت داده شدند. محیط های کشت به مدت ۲٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلیسیوس گرمخانه گذاری شده و سپس وضعیت رشد یا عدم رشد باکتری در این محیط ها بررسی گردید (۱۳).

ه) ایمن سازی و آزمون های ایمونولوژی: برای ارزیابی ایمنی زایی آنتی ژن ها و اجوانت مورد پژوهش و مقایسه نتایج با آنتی ژن های استاندارد، مطالعه بر روی ۵ گروه (۳ گروه تست و ۲ گروه کنترل) انجام شد.

در گروه های تست، ماده ایمونوژن شامل آنتی ژن غیرفعال شده با کلرید فریک + ۰/۵٪ اجوانت ژل هیدروکسید آلومینیوم (IIA + Alum)، آنتی ژن غیرفعال شده با کلرید آهن + ۵ µg اجوانت DNA باکتری *پاستورلا مالتوسیدا* نوع A (IIA + AbDNA) و آنتی ژن غیرفعال شده با کلرید فریک + 5µg ۵ اجوانت DNA باکتری *پاستورلا مالتوسیدا* نوع B (IIA + BbDNA) به ۸ سر موش در هر گروه تزریق گردیدند. همچنین، DNA باکتری *پاستورلا مالتوسیدا* نوع A و نرمال سالین به عنوان کنترل در دو گروه جداگانه به ۸ سر موش تزریق گردیدند.

ایمن سازی اولیه موش ها در زمان صفر و ایمن سازی ثانویه (بوستر) پس از ۲ هفته با تزریق دوز یکسان از ایمونوژن انجام شد. در تمام موارد ماده ایمونوژن به میزان ۰/۲ میلی لیتر و به روش زیر جلدی به حیوان آزمایشگاهی تزریق گردید.

در فواصل زمانی مشخص قبل از تزریق و پس از تزریق به فاصله ۸ هفته (روزهای ۰، ۷، ۱٤، ۲۱، ۲۸، ۳۵، ٤۲ و ٤۹) از حیوان خون گیری شد و پس از جداسازی سرم، برای تعیین میزان عیار آنتی بادی اختصاصی علیه باکتری، آزمون الایزا انجام گرفت. سرم ها تا زمان انجام الایزا در دمای ۲۰- درجه سلیسیوس نگهداری شدند. آزمون الایزا بر روی سرم های جدا شده از تمامی گروه های کنترل و آزمون مطابق پروتکل پیشنهادی چایوت ویتایاکون (Chaiyotwittayakun) و همکاران در سال ۲۰۰٤ با اعمال تغییراتی صورت گرفت (۱۵).

و) آزمون DTH: بررسی واکنش های حساسیت پوستی (Delayed-type Hypersensitivity=DTH) با تزریق آنتی ژن و نرمال سالین کف پاهای موش و اندازه گیری و مقایسه قطر پای حیوان انجام شد. در این آزمون ۰/۱ میلی لیتر آنتی ژن باکتریایی کف پای چپ و ۰/۱ میلی لیتر نرمال سالین کف پای راست حیوان به صورت داخل جلدی تزریق گردید. سپس در فواصل ۲٤ و ٤۸ ساعت پس از تزریق، ضخامت کف دو پای موش ها به وسیله دستگاه ضخامت سنج (میکرومتر) اندازه گیری و ثبت شد (شکل ۱ و ۲). بدین ترتیب اختلاف ضخامت کف پای چپ از ضخامت کف پای راست موش های گروه های کنترل و تست به طور جداگانه در زمان های یاد شده محاسبه گردید.

ز) اندازه گیری سطح سرمی IL-6 و IL-12: برای ارزیابی

شکل ۱: اندازه گیری ضخامت کف پای موش.

شکل ۲: افزایش ضخامت کف پای دریافت کننده آنتی ژن.

فعالیت ایمنی سلولی، سایتوکاین های اینترلوکین های ٦ (IL-6) و ١٢ (IL-12) با استفاده از کیت تجاری بر روی نمونه های سرم اندازه گیری شدند. برای این منظور از کیت شرکت Eastbiopharm (کشور آمریکا) استفاده گردید. اساس این کیت به روش الایزای ساندویچی و با استفاده از آنتی بادی های منوکلونال بیوتین (Biotin double antibody sandwich technology) می باشد. در این مرحله الایزا با استفاده از دستگاه تمام اتوماتیک Elisys Uno (شرکت Human، آلمان) انجام شد.

ح) تعیین میزان اثرگذاری ایمونوژن: برای تعیین میزان اثرگذاری ماده ایمونوژن، گروه های کنترل و ایمن شده حیوانات با حداقل دوز کشنده سویه حاد *پاستورلا مالتوسیدا* 1.5×10^7 (CFU/mL) چالش شدند. چالش ٢٨ روز پس از ایمن سازی دوم انجام گرفت و حیوانات به مدت ١٤ روز پس از چالش، از نظر مرگ و میر بررسی شدند. پس از چالش، علایم غیرعادی احتمالی نیز در حیوان بررسی شد.

ط) روش‌ها و ابزار تجزیه و تحلیل داده‌ها: تجزیه و تحلیل آماری داده ها با استفاده از آزمون آنالیز واریانس (ANOVA) و نسخه پانزدهم نرم افزار *SPSS* انجام گرفت. بدین منظور از روش های آماری آنالیز واریانس با تکرار برای بررسی اثر زمان در ایجاد عیار آنتی بادی های باکتریسیدال و از روش One way ANOVA به منظور مقایسه میانگین متغیرهای مورد بررسی بین گروه های مختلف استفاده شد. نتایج هر سنجش با استفاده از آزمون *t* مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. درجه معنی داری با میزان خطای ٠/٠٥ در نظر گرفته شد.

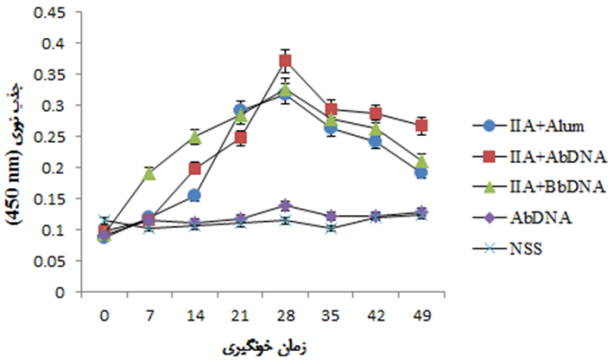
یافته‌ها

الف) غیرفعال سازی باکتری: سویه *پاستورلا مالتوسیدا* تیپ A کشت داده شده در محیط BHI با استفاده از غلظت ١٠ mM از آهن ($FeCl_3$1M) به مدت ٢٤ ساعت در دمای ٣٧ درجه سلیسیوس بطور کامل غیرفعال شد. آنتی ژن غیرفعال شده با آهن iron-inactivated antigen (IIA) تا زمان استفاده به عنوان ماده ایمونوژن، در یخچال نگهداری شد.

ب) استخراج DNA برای تهیه DNA باکتریایی با روش فنل- کلروفرم: برای تهیه DNA باکتریایی، DNA باکتری های *پاستورلا مالتوسیدا* تیپ A (AbDNA) و *پاستورلا مالتوسیدا* تیپ B (BbDNA) با روش فنل- کلروفرم استخراج گردید (٢٤). در هر دو مورد نسبت A_{260}/A_{280} حدود ١/٨ به دست آمد که نشان دهنده عدم آلودگی DNA استخراج شده با پروتئین و RNA بود. همچنین غلظت DNA جدا شده از سویه های *پاستورلا مالتوسیدا* تیپ A و *پاستورلا مالتوسیدا* تیپ B به ترتیب ٢٥٠ ng/µL و ٢١٠ ng/µL بود. در مرحله فرمولاسیون ایمونوژن، از هر کدام از این DNA ها به میزان ٥ میکروگرم به عنوان اجوانت استفاده شد.

ج) بررسی سلامت و فرمولاسیون ایمونوژن: پس از کشت و ٢٤ ساعت انکوباسیون آنتی ژن های غیرفعال شده و DNA باکتریایی بر روی محیط های BA، NA و BHI هیچ رشدی مشاهده نگردید که این نشان دهنده عاری بودن ترکیبات از میکروارگانیسم های پاتوژن بود. پس از اطمینان از سلامت ترکیبات، فرمولاسیون ایمونوژن انجام شد. در این پژوهش از آنتی ژن غیرفعال شده با آهن به عنوان محرک اصلی برای سیستم ایمنی حیوان و از ژل هیدروکسید آلومینیوم (Alum) و DNAباکتریایی (bDNA) به عنوان اجوانت استفاده گردید.

د) بررسی پاسخ های ایمنی هومورال علیه پاستورلا مالتوسیدا: آزمون الایزا برای تعیین میزان عیار آنتی بادی اختصاصی علیه باکتری بر روی سرم های جداسازی شده از حیوانات در



نمودار ١: عیار آنتی بادی در موش های دریافت کننده آنتی ژن غیرفعال شده با آهن همراه با اجوانت Alum و دو نوع DNA باکتری *پاستورلا مالتوسیدا* در مقایسه با گروه های کنترل (AbDNA و NSS).

زمان های مختلف انجام گرفت. عیار آنتی بادی اختصاصی علیه باکتری *پاستورلا مالتوسیدا* در موش های دریافت کننده ماده ایمونوژن گروه های تست و کنترل در نمودار ۱ نشان داده شده است. عیار آنتی بادی در گروه های تست پس از تزریق دوز بوستر در روزهای ۲۱ و ۲۸ افزایش قابل ملاحظه ای یافت. افزایش عیار آنتی بادی در موش های دریافت کننده آنتی ژن غیرفعال شده با آهن و DNA باکتری هم تیپ (IIA+AbDNA) در مقایسه با گروه های کنترل (AbDNA و NSS) از روز ۱٤ به بعد قابل توجه بود. بین تمام گروه های تست و کنترل، بالاترین عیار آنتی بادی (۰/۳۷۲) در روز ۲۸ یعنی دو هفته پس از تزریق دوز بوستر در گروه IIA+AbDNA مشاهده گردید که تفاوت معناداری نسبت به گروه های کنترل داشت (p = ۰/۰۰۲٤).

در گروه دریافت کننده اجوانت آلوم (IIA+Alum) روز ۲۱ یعنی اولین هفته پس از تزریق دوز بوستر افزایش قابل ملاحظه ای در عیار آنتی بادی مشاهده شد، اما پس از روز ۲۸ تیتر آنتی بادی در این گروه نسبت به سایر گروه های تست، افت سریع تری داشت.

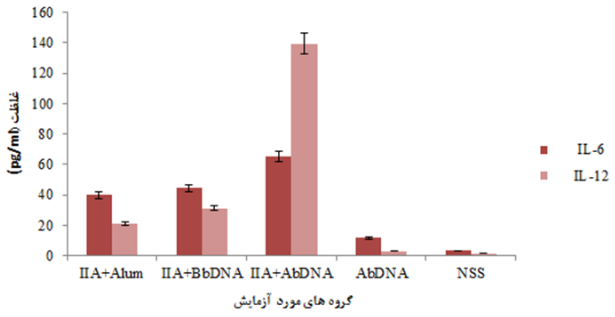
همچنین بیشترین عیار آنتی بادی در گروه دریافت کننده آنتی ژن غیرفعال شده با آهن و DNA باکتری *پاستورلا مالتوسیدا* تیپ B نیز ۰/۳۲۷ بود که ۲۸ روز پس از تزریق مشاهده شد. در گروه IIA+BbDNA عیار آنتی بادی نسبت به سایر گروه ها سریع تر افزایش یافت و در هفته اول پس از تزریق اختلاف معناداری نسبت به گروه کنترل مشاهده گردید (p = ۰/۰۰۵۳). در روز ۱٤ نیز بیشترین میزان آنتی بادی تولید شده مربوط به گروه IIA+BbDNA بود. اما دوام عیار آنتی بادی در گروه IIA+AbDNA بیشتر از گروه های (IIA+BbDNA و IIA+Alum) بود. به طور کلی عیار آنتی بادی در این گروه از روز ۳۵ تا روز ٤۹ تغییرات زیادی نداشت که این نشان از ماندگاری نسبی آنتی بادی در بدن حیوان بود.

جدول ۱: ضخامت کف پای موش در گروه های تست در مقایسه با گروه های کنترل پس از ۲٤ و ٤۸ ساعت.

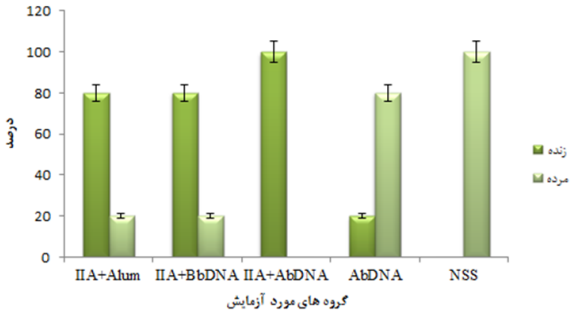
ردیف	گروه های آزمایه	ضخامت کف پای راست (میلی متر)		ضخامت کف پای چپ (میلی متر)	
		۲٤ ساعت	٤۸ ساعت	۲٤ ساعت	٤۸ ساعت
۱	IIA + Alum	۲/۷	۲/۷	۲/۹	۳/۲
۲	IIA + BbDNA	۳/۰	۳/۰	۳/٦	۳/۹
۳	IIA + AbDNA	۲/٤	۲/۳	۳/۳	۳/٦
٤	AbDNA	۲/۸	۲/۸	۲/۹	۳/۰
۵	NSS	۲/٦	۲/٦	۲/٦	۲/٦

ه) ارزیابی ایمنی سلولی با آزمون پوستی DTH: پاسخ های ایمنی سلولی با استفاده از آزمون پوستی DTH در گروه های مختلف با اندازه گیری ضخامت کف پای راست موش پس از زمان های ۲٤ و ٤۸ ساعت هیچ گونه تفاوت معناداری بین گروه های تست و کنترل نشان نداد. در حالی که در گروه های دریافت کننده ایمونوژن با اندازه گیری ضخامت کف پاهای راست و چپ موش پس از ۲٤ ساعت افزایش معناداری در مقایسه با گروه کنترل نشان داد (p = ۰/۰۲۷۹). در بین گروه های تست، افزایش ضخامت پای چپ پس از گذشت ٤۸ ساعت در هر سه گروه یکسان بود (جدول ۱). در مجموع بیشترین واکنش در گروه دریافت کننده IIA+AbDNA مشاهده گردید که از نظر ضخامت تفاوت معناداری بین دو پای راست و چپ موش دیده شد (p = ۰/۰۲) (شکل ۲).

و) اندازه گیری IL-6 و IL-12 بر روی نمونه های سرم: آزمون الایزا برای تعیین عیار IL-6 و IL-12 بر روی سرم های جداسازی شده از حیوانات انجام گردید. نتایج نشان دهنده این بود که عیار IL-6 در ۳ گروه تست نسبت به گروه های کنترل افزایش معناداری داشت (p = ۰/۰۰٦۷) و بالاترین عیار مربوط به گروه دریافت کننده DNA باکتری *پاستورلا مالتوسیدا* نوع A به عنوان اجوانت بود (نمودار ۲).



نمودار ۲: عیار IL-6 و IL-12 در گروه های مختلف تست و کنترل بر روی نمونه های سرم.



نمودار ۳: میزان محافظت موش های ایمن شده در برابر چالش با حداقل دوز کشنده (LD_{50}) سویه حاد *پاستورلا مالتوسیدا*.

همچنین میزان IL-12 در گروه IIA+AbDNA اختلاف بسیار معناداری نسبت به سایر گروه های ایمن شده داشت (p = ۰/۰۰۰۱). بر اساس نتایج بالاترین غلظت IL-6 و IL-12 به ترتیب ۶۵/۳ pg/ml و ۱۳۹/۳ pg/ml بود که هر دو مربوط به گروه دریافت کننده DNA هم تیپ بود.

ز) چالش و تعیین میزان اثرگذاری ایمونوژن: پس از چالش اختلاف قابل توجهی در میزان مرگ و میر بین حیوانات گروه های کنترل و تست مشاهده گردید (p = ۰/۰۰۰۲). به طوری که ۸۰ و ۱۰۰ درصد از موش های گروه های کنترل ۲۴ ساعت پس از چالش مردند. همچنین نتایج نشان داد که موش های ایمن شده با IIA+AbDNA به طور کامل (۱۰۰٪) در برابر چالش با سویه حاد *پاستورلا مالتوسیدا* محافظت شدند (نمودار ۳). محافظت در موش های ایمن شده با IIA+BbDNA اختلاف معناداری را نسبت به موش های ایمن شده با IIA+AbDNA نشان نداد (p >۰/۰۵).

بحث

پاستورلوز، یک بیماری سخت و مسری در حیوانات اهلی است زیرا روش های کنترل آن دشوار و درمانش هزینه بر و طولانی مدت می باشد. استفاده از آنتی بیوتیک ها به عنوان یک روش مفید برای کنترل عفونت درنظر گرفته می شود، اما مقاومت های میکروبی توان آنتی بیوتیک ها را محدود نموده است (۱۶). بنابراین پیشگیری به عنوان یک روش مفید و مؤثر برای جلوگیری از عفونت های پاستورلوز محسوب می شود و می تواند در دام هایی چون بز و گوسفند مهم باشد و از ضررهای اقتصادی ناشی از این باکتری به دامداری ها بکاهد.

در این مطالعه توانایی واکسن غیرفعال شده با آهن همراه با ژل آلوم و DNA باکتریایی به عنوان اجوانت، با روش تزریق زیرجلدی مورد ارزیابی قرار گرفت تا بتوان القای پاسخ های ایمنی هومورال و سلولی و همچنین توانایی ایمونوژن در محافظت موش پس از چالش با سویه حاد *پاستورلا مالتوسیدا* را بررسی نمود.

باکتری *پاستورلا* برای رشد و افزایش بیان ژن های بیماری زا، به میزان کمی آهن در محیط احتیاج دارد اما افزایش میزان آهن در محیط باعث از بین رفتن باکتری می شود. فلزات نقش مهمی را در فعالیت های متابولیکی میکروارگانیسم ها بازی می کنند و برخی از فلزات سنگین به عنوان میکرونوترینت توسط ارگانیسم ها استفاده می شوند. اما، در غلظت های بالا، یون های فلزی سنگین واکنش داده و به فرم ترکیبات سمی در سلول های باکتریایی درمی آیند (۱۷).

هراث (Herath) و همکاران نیز در سال ۲۰۱۰ در هند، از غلظت پایین آهن (100 µM) برای غنی نمودن محیط کشت باکتری و از غلظت بالای آهن (100 mM) برای غیرفعال سازی باکتری *پاستورلا مالتوسیدا* استفاده نمودند (۱۸).

در پژوهش قبل تأثیر غلظت های مختلف کلرید فریک ($FeCl_3$) بر روی *پاستورلا مالتوسیدا* بررسی شد. پس از بررسی نتایج غلظت های مختلف آهن، غلظت 10 mM به عنوان مناسب ترین غلظت انتخاب شد و مشخص گردید با استفاده از غلظت ۱۰ میلی مولار باکتری *پاستورلا مالتوسیدا* پس از گذشت ۲۴ ساعت به طور کامل غیرفعال می شود (۱۹). در نتیجه در این پژوهش برای تهیه ایمونوژن از غلظت ۱۰ میلی مولار برای غیرفعال سازی باکتری *پاستورلا مالتوسیدا* استفاده گردید.

در رابطه با توسعه واکسن *پاستورلا مالتوسیدا* مشکلاتی وجود دارد که ممکن است به دلیل هتروژن بودن باکتری باشد. بنابراین مهم است که یک واکسن کارآمد برای حفاظت در برابر اکثر گونه های باکتری ایجاد شود (۱). در همین راستا، انتخاب آگاهانه اجوانت می تواند جنبه های ظاهری پاسخ آنتی بادی مانند اختصاصیت، کلاس، ایزوتیپ، و ویژگی اپی توپ را تحت تأثیر قرار دهد. از این رو بسیار مهم است که

اجوانت های جدید ایمونولوژیک با کارایی بالا، منابع فراوان و سمیت کم در دسترس باشند (۲۰).

اگر چه آلوم به طور گسترده ای به عنوان اجوانت برای واکسن مورد استفاده قرار می گیرد، نقش آن در نفروتوکسیسیتی، واکنش موضعی زیر جلدی، عدم توانایی در القای لنفوسیت T1 (Th1) و پاسخ های ایمنی سلولی جستجو برای یافتن اجوانت های جدید مؤثر را ضروری نموده است (۲۱). استفاده از الیگونوکلئوتید CpG به عنوان اجوانت "طبیعی" برای واکسیناسیون انسان و حیوان در برابر ارگانیسم های عفونی توسط چندین گروه مطالعاتی پیشنهاد شده است (۲۲).

جاروینین (Jarvinen) و همکاران در سال ۱۹۹۸ در هند، از توکسین وبا و ژل هیدروکسید آلومینیوم به عنوان اجوانت برای ایمن سازی خرگوش در برابر عفونت *پاستورلا مالتوسیدا* استفاده نمودند. عدم ایجاد ایمنی سلولی مؤثر یک عامل اصلی محدود کننده در استفاده از ایمونوژن پیشنهادی آن ها بوده است (٤). هراث (Herath) و همکاران در سال ۲۰۱۰ در هند، *پاستورلا مالتوسیدا* A:1 را با غلظت بالای $FeCl_3$ غیرفعال نموده و از DNA باکتریایی *پاستورلا مالتوسیدا* B:2 به عنوان اجوانت استفاده کردند. نتایج پژوهش آن ها نشان دهنده افزایش عیار آنتی بادی IgY در حیوانات ایمن شده با واکسن حاوی اجوانت bDNA و محافظت ۱۰۰ درصدی در برابر چالش با *پاستورلا مالتوسیدا* A:1 بود (۱۸).

بودی (Bode) و همکاران در سال ۲۰۱۱ از الیگوداکسی نوکلئوتیدهای مصنوعی (ODNs) حاوی بنیان های CpG غیرمتیله به عنوان اجوانت برای تهیه واکسن استفاده نمودند. CpG ODN فعالیت سلول های عرضه کننده آنتی ژن را بهبود می بخشد و پاسخ های ایمنی هومورال و سلولی علیه آنتی ژن اختصاصی واکسن را افزایش می دهد (۱۱).

در این پژوهش برای تعیین این که آیا bDNA برای ایجاد ایمنی بهتر از آلوم است، برای اولین بار در ایران آنتی ژن *پاستورلا مالتوسیدا* همراه با DNA باکتریایی به عنوان ادجوانت به حیوان آزمایشگاهی تزریق گردید. البته در مطالعه حاضر به جای الیگونوکلئوتید CpG از bDNA استفاده شد تا هزینه تولید واکسن پایین نگه داشته شود زیرا در کشورهای در حال توسعه هزینه، عامل اصلی برای مقرون به صرفه بودن واکسن است.

برخلاف هراث (Herath) و همکاران که از یک نوع bDNA اما در دو غلظت متفاوت 5µg و 10µg استفاده کرده بودند، در پژوهش حاضر غلظت ثابت نگه داشته شد، اما از چندین نوع bDNA (هم تیپ و غیر هم تیپ) استفاده شد تا بتوان تشخیص داد که آیا انواع مختلف bDNA علیه یک باکتری اثرات مشابهی دارند یا خیر؟

با توجه به نتایج هراث (Herath) و همکاران، انتظار می رفت که استفاده از DNA باکتریایی غیر هم تیپ *پاستورلا مالتوسیدا* (BbDNA) باعث القای پاسخ های مناسب تری علیه *پاستورلا مالتوسیدا* تیپ A شود، اما استفاده از BbDNA به عنوان اجوانت علیه سروتیپ A چندان جالب توجه نبود. با وجودی که سریع ترین پاسخ ها در گروه دریافت کننده IIA+ BbDNA مشاهده گردید، اما این ایمونوژن از نظر دوام ترکیب مناسبی نبود. نتایج این پژوهش نشان داد که واکسن IIA+ AbDNA محرک بسیار خوبی برای سیستم ایمنی موش می باشد و علاوه بر ایجاد آنتی بادی در سطوح بالا، از نظر ماندگاری در بدن نیز این فرمولاسیون نسبت به بقیه ترکیبات دوام بیشتری در بدن دارد و تا مدت ها در بدن باقی می ماند.

همچنین، در پژوهش حاضر مشخص شد که واکسن تزریق شده با اجوانت bDNA هم تیپ، محافظت بهتری را نسبت به واکسن واجد اجوانت آلوم و bDNA غیرهم تیپ ایجاد می کند. هرچند که در زمان چالش، عیار آنتی بادی در تمام موش های واکسینه شده تقریباً مشابه بود، اما تنها ایمونوژن IIA+AbDNA توانست به طور کامل (۱۰۰٪) موش ها را در برابر چالش با سویه حاد *پاستورلا مالتوسیدا* محافظت نماید. این نتایج توانایی ایجاد پاسخ ایمنی بهتر توسط bDNA هم تیپ را تأیید کرد. نتایج مطالعات قبل هم اثبات کرده که ترکیب IIV+bDNA موجب افزایش پاسخ های ایمنی در موش (۱۲) و مرغ (۱۸) می شود.

فعال سازی سلول فاگوسیت کننده و التهاب ناشی از ایمنی سلولی، باعث ایجاد نوعی آسیب بافتی می شود که معمولاً به

عنوان واکنش حساسیت تأخیری (DTH) شناخته می شود. آزمون DTH به عنوان یک روش تشخیصی در واکنش های ایمنی سلولی به کار می رود و بطور معمول جزیی از واکنش های سلولی در ایمنی علیه میکروب ها محسوب می شود. آنتی ژن به صورت درون پوستی تزریق می شود، و التهاب پوست، قرمزی و سفت شدن در مدت ۷۲-۴۸ ساعت پس از تزریق نشان دهنده واکنش مثبت است (۲۳).

الثمریه (Al-Samarrae) و الشوی (Al-Shweey) در عراق در سال ۲۰۱۲، پاسخ ایمنی سلولی را با استفاده از آزمون DTH در روز ۲۸ و سه ماه پس از ایمن سازی خرگوش با واکسن های مختلف *پاستورلا مالتوسیدا* بررسی کردند. آن ها ایمن سازی حیوانات را در زمان صفر (دوز اول) و ۱٤ روز پس از تزریق اول (دوز بوستر) انجام دادند. روز ۲۸ پس از شروع ایمن سازی، آزمون پوستی DTH انجام شد و نتیجه آن با اریتم و ضخامت (سفتی) پوست مشخص گردید (۲٤).

در پژوهش حاضر، آزمون DTH با تزریق زیر جلدی ۰/۱ میلی لیتر آنتی ژن باکتریایی کف پای چپ و ۰/۱ میلی لیتر نرمال سالین کف پای راست هر موش انجام گردید. ضخامت کف دو پای موش در فواصل ۲٤ و ٤۸ ساعت پس از تزریق، اندازه گیری شد. بیشترین واکنش در گروه ایمن شده با واکسن غیرفعال شده با آهن به همراه اجوانت bDNA هم تیپ بود. با توجه به این که آزمون DTH نشان دهنده فعالیت ایمنی سلولی است، نتایج این پژوهش بیانگر این نکته می باشد که استفاده از ژنوم هومولوگ (AbDNA) تحریک ایمنی سلولی را به خوبی انجام می دهد.

توالی CpG باعث القای سایتوکین های التهابی و ایمونوگلوبولین ها می شود. IL-6 و IL-12 سایتوکین های مهمی برای تحریک پاسخ های ایمنی پس از واکسیناسیون هستند. به ویژه IL-12 که از سایتوکین های کلیدی مرتبط با پاسخ های DTH، است. IL-12 به طور عمده توسط سلول های عرضه کننده آنتی ژن و Th1 تولید می شود. IL-12 تولید IFN-γ را تقویت می کند و باعث تمایز سلول های Th1 می شود (۲۵).

پاسخ های DTH نسبت به برخی از ارگانیسم ها عمدتاً توسط سلول های T سیتوتوکسیک $CD8^+$ ایجاد می شود. سلول های $CD8^+$ T ماکروفاژها را فعال نموده و باعث تولید سایتوکین های Th1 به ویژه IFN-γ می شوند. TNF-α نیز یکی از سایتوکین های ضروری برای پاسخ های DTH است (۲٦).

با توجه به نقش کلیدی سایتوکین های IFN-γ و TNF-α در پاسخ های DTH، پیشنهاد می شود در مطالعات بعدی علاوه بر IL-12 این سایتوکاین ها نیز اندازه گیری شوند سایتوکاین ها نیز اندازه گیری شوند. بررسی این سایتوکاین ها همراه با آزمون DTH می تواند نشان دهنده فعالیت ایمنی وابسته به سلول باشد و نقش ایمونوژن تزریقی در تحریک و القای پاسخ های ایمنی سلولی به صورت تخصصی تر مورد ارزیابی قرار گیرد.

به دلیل گستردگی شیوع *پاستورلا* در طیف گسترده ای از حیوانات پاتوژن، یافتن اجوانت های ایمن و مؤثر برای افزایش ایمنی زایی در حیوانات علیه بیماری های پاستورلوز ضروری است. انتخاب اجوانت مناسب که ایمنی زایی آنتی ژن را افزایش دهد، یکی از مراحل مهم در توسعه واکسن است (۲۷). نتایج این پژوهش نشان دهنده اهمیت نقش اجوانتی bDNA در فرمولاسیون واکسن می باشد. همچنین جایگزین نمودن فرمالین با ترکیباتی مانند آهن برای غیرفعال سازی باکتری اهمیت دارد. زیرا فرمالین، به ویژه در حیواناتی که مصرف خوراکی دارند تأثیر سوء می گذارد. همچنین فرمالین می تواند وارد بدن حیوانات شده و ایجاد ضایعات بافتی کند.

علاوه بر این، اکثر واکسن های باکتریایی مورد استفاده علیه *پاستورلا مالتوسیدا* ایمنی و محافظت کامل در برابر آلودگی با باکتری را ایجاد نمی کنند، در نتیجه تلاش های بیشتری برای گسترش و پیدایش واکسن های مناسب لازم است. با توجه به تنوع سروتیپی *پاستورلا مالتوسیدا*، اگر هدف از واکسیناسیون ایجاد ایمنی متقابل محافظتی (cross-protective) باشد، باید مطالعه بر روی ایمونوژن هایی متمرکز شود که ایمنی متقابل محافظتی علیه چند سروتیپ ایجاد کنند و بتوانند در واکسن های پاستورلوز مورد استفاده قرار گیرند. واکسن های ایده ال باید ارزان، قابل تجزیه در محیط و فاقد خواص بیولوژیک بوده و علاوه بر تحریک پاسخ های ایمنی هومورال و

سلولی، در بدن حیوان دوام طولانی مدت داشته باشند. در مطالعات آینده، ضرورت ارزیابی قدرت ایمنی زایی و توانایی ژنوم باکتری های مختلف به عنوان اجوانت وجود دارد.

نتیجه گیری

بر اساس نتایج این مطالعه، DNA به عنوان یک اجوانت مناسب برای افزایش پاسخ های ایمنی علیه واکسن های غیر فعال شده *پاستورلا مالتوسیدا* عمل می کند. در نتیجه استفاده از واکسن های غیرفعال شده با آهن همراه با ادجوانت DNA باکتریایی به عنوان یک جایگزین مناسب برای واکسن های زنده پیشنهاد می گردد، زیرا می تواند تحریک مناسب ایمنی هومورال و سلولی را به دنبال داشته باشد.

ملاحظات اخلاقی

نویسندگان تمامی نکات اخلاقی شامل: عدم سرقت ادبی، انتشار دوگانه، تحریف داده ها و داده سازی را در این مقاله رعایت کرده اند.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از جناب آقای دکتر سید محمد حسین حسینی، بخش ایمنی شناسی و مهندس صفر صادق زاده، بخش حیوانات آزمایشگاهی مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی شیراز نهایت امتنان را دارند.

تعارض در منافع

وجود ندارد.

References

1. Ahmad AM. Efforts towards the development of recombinant vaccines against *Pasteurella multocida*. Sci World J. 2014; 9(2): 1-7.
2. Shivachandra SB, Kumar A, Yogisharadhya R, Viswas KN. Immunogenicity of highly conserved recombinant VacJ outer membrane lipoprotein of *Pasteurella multocida*. Vaccine. 2014; 32(2): 290-296.
3. Wilson BA, Ho M. *Pasteurella multocida*: from zoonosis to cellular microbiology. Clin Microbiol Rev. 2013; 26(3): 631-55.
4. Jarvinen LZ, Hogenesch H, Suckow MA, Bowersock TL. Induction of protective immunity in rabbits by coadministration of inactivated *Pasteurella multocida* toxin and potassium thiocyanate extract. Infect Immun. 1998; 66(8): 3788-3795.
5. Lee KE, Jeoung HY, Lee JY, Lee MH, Choi HW, Chang KS. Phenotypic characterization and random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis of *Pasteurella multocida* isolated from Korean pigs. J Vet Med Sci. 2012; 74(5): 567-573.
6. Xie Z, Li H, Chen J, Zhang H-b, Wang Y-Y, Chen Q, Zhao ZZ, Cheng C, Zhang H, Yang Y, Wang HN, Gao R. Shuffling of pig interleukin-2 gene and its enhancing of immunity in mice to *Pasteurella multocida* vaccine. Vaccine. 2007; 25(48): 8163-8171.
7. Dagleish MP, Christopher Hodgson J, Ataei S, Finucane A, Finlayson J, Sales J. Safety and protective efficacy of intramuscular vaccination with a live aroA derivative of *Pasteurella multocida* B:2 against experimental hemorrhagic septicemia in calves. Infect Immu. 2007; 75 (12): 5837-5844.

8. Trevani AS, Chorny A, Salamone G, Vermeulen M, Gamberale R, Schettini J, Raiden S, Geffner J. Bacterial DNA activates human neutrophils by a CpG-independent pathway. Eur J Immunol. 2003; 33(11): 3164-3174.

9. Mapletoft JW, Oumouna M, Kovacs-Nolan J, Latimer L, Mutwiri G, Babiuk LA, van Drunen Littel-van den Hurk S. Intranasal immunization of mice with a formalin-inactivated bovine respiratory syncytial virus vaccine co-formulated with CpG oligodeoxynucleotides and polyphosphazenes results in enhanced protection. J Gen Virol. 2008; 89 (Pt 1): 250-260.

10. Tang ML, Lahtinen SJ, Boyle RJ. Probiotics and prebiotics: clinical effects in allergic disease. Curr Opinion Pediatr. 2010; 22(5): 626-634.

11. Bode C, Zhao G, Steinhagen F, Kinjo T, Klinman DM. CpG DNA as a vaccine adjuvant. Expert Rev Vaccines. 2011; 10(4): 499-511.

12. Kumar D, Singh A. *Salmonella typhimurium* grown in iron-rich media, inactivated with ferric chloride and adjuvanted with homologous bacterial DNA is potent and efficacious vaccine in mice. Vaccine. 2005; 23(48-49): 5590-5598.

13. Homayoon M, Tahamtan Y, Kargar M, Hosseini SMH, Akhavan SA. Adjuvant activity of *Pasteurella maltocida* A strain, *Pasteurella maltocida* B strain and *salmonella typhimurium* bacterial and on cellular responses against *Pasteurella maltocida* specific strain infectionsin Balb/C mice. Trop Med Asian Pac J. 2018; 11(5): 336-341.

14. Cheng HR, Jiang N. Extremely rapid extraction of DNA from bacteria and yeasts. Biotechnol Lett. 2006; 28(1): 55-59.

15. Chaiyotwittayakun A, Burton L, Weber PSD, Kizilkaya K, Cardoso FF, Erskine RJ. Hyperimmunization of steers with J5 *Escherichia coli* bacterin: effects on isotype-specific serum antibody responses and cross reactivity with heterogeneous Gram-negative bacteria. J Dairy Sci. 2004; 87(10): 3375-3385.

16. Ahmad TA, Rammah SS, Sheweita SA, Haroun M, El-Sayed LH. Development of immunization trials against *Pasteurella multocida*. Vaccine. 2014; 32(8): 909-917.

17. Radhi SN. Optimization of heavy metals chlorides resistance by *Staphylococcus aureus* and its ability to remove them. Iraqi J Sci. 2012; 53(4): 778-785.

18. Herath C, Kumar P, Singh M, Kumar D, Ramakrishnan S, Goswami TK, Singh A, Ram GC. Experimental iron-inactivated *Pasteurella multocida* A: 1 vaccine adjuvanted with bacterial DNA is safe and protects chickens from fowl cholera. Vaccine. 2010; 28(11): 2284-2289.

19. Homayoon M, Tahamtan Y, Kargar M, Hosseini SMH, Akhavan S.A. *Pasteurella multocida* inactivated with ferric chloride and adjuvanted with bacterial DNA is a potent and efficacious vaccine in Balb/c mice. J Med Microbiol. 2018; 67(9): 1383-1390.

20. Freitas E, Marinho AC, Albuquerque D, Teles L, Sindeaux M, Salles MT, Sousa DC, Lima MM, Silva MG, Fernandes D. Adjuvant activity of peanut, cottonseed and rice oils on cellular and humoral response. Vacci Monitor. 2013; 22(1): 4-9.

21. Sayed HE, Ashry E, Ahmad TA. The use of propolis as vaccine's adjuvant. Vaccine. 2012; 31 (1): 31-39.

22. Wu C, Qin X, Li P, Pan T, Ren W, Li N, Peng Y. Transcriptomic analysis on responses of murine lungs to *Pasteurella multocida* infection. Front Cell Infect Microbiol. 2017; 7: 251.

23. Nakae S, Komiyama Y, Nambu A, Sudo K, Iwase M, Homma I, Sekikawa K, Asano M, Iwakura Y. Antigen-specific T cell sensitization is impaired in IL-17-deficient mice, causing suppression of allergic cellular and humoral responses. Immunity. 2002; 17(3): 375-387.

24. Al-Samarrae EAA, Al-Shweey SHA. The synergistic effect of BCG and *Pasteurella multocida* vaccines in local rabbits. Al-Anbar J Vet Sci. 2012; 5(1): 1-6.

25. Hanagata N. CpG oligodeoxynucleotide nanomedicines for the prophylaxis or treatment of cancers, infectious diseases, and allergies. Int J Nanomedicine. 2017; 12: 515-531.

26. Hirahara K, Poholek A, Vahedi G, Laurence A, Kanno Y, Milner JD, O'Shea JJ. Mechanisms underlying helper T-cell plasticity: implications for immune-mediated disease. J Allergy Clin Immunol. 2013; 131(5): 1276-1287.

27. Okay S, Özcengiz E, Gürsel I, Özcengiz G. Immunogenicity and protective efficacy of the recombinant *Pasteurella* lipoprotein E and outer membrane protein H from *Pasteurella multocida* A:3 in mice. Res Vet Sci. 2012; 93(3): 1261-1265.

Journal of Microbial World
Volume 12, No. 2, July 2019

Original Article

The effect of homologous and heterologous Bacterial DNA on the development of immune responses against *Pasteurella multocida* in BALB / c mice

Yahya Tahamtan[1], Maryam Homayoon[2], Mohammad Kargar[3]

[1]Associate Professor, Department of Microbiology, Shiraz Branch, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agriculture Research, Education and Extension Organization (AREEO), Shiraz, Iran.
[2] Ph.D., Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
[3] Professor, Department of Microbiology, Jahrom Branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran.

Abstract

Background & Objectives: *Pasteurella multocida* is a principal pathogen of domestic animals causing agents of pneumonia and hemorrhagic septicemia in cattle, sheep, and goats, fowl cholera in chickens, and progressive atrophic rhinitis in swine and as well as an opportunistic pathogen of humans. In this study, we investigated the humoral and cellular immune responses and protective immunity conferred by an iron-inactivated vaccine with two different bacterial DNA as an adjuvant.

Materials & Methods: *P. multocida* was grown in BHI broth, inactivated with FeCl3, adjuvanted with alum and *P. multocida* A (homologous DNA) and *P. multocida* B (heterologous DNA) bacterial DNAs. BALB/c mice were immunized with two whole-cell inactivated vaccine doses at 2 weeks apart. The animals were challenged 4 weeks after booster immunization. The serum antibodies titer was tested by ELISA. At 28 days post-immunization, cell mediates immunity responses were measured by assay of DTH and IL-6 and IL-12 in the serum samples.

Results: Our results showed the levels of antibodies in bDNA adjuvant groups were higher than the alum adjuvant vaccine group. Peak antibody titers of 0.372 were obtained in the IIA+AbDNA group. The protection rate of the AbDNA adjuvant vaccine was better than of other adjuvant vaccines and they protected 100% of mice challenge groups. Peak serum IL-6 and IL-12 titers were achieved in the IIA+AbDNA groups.

Conclusion: These studies indicate that bDNA is effective as immune adjuvants and because of its stimulating properties it can be used as an inducer of humoral and cellular immune responses for vaccination applications. The findings also showed a better ability of homologous bDNA to induce immune responses.

Keywords: *Pasteurella multocida,* Bacterial DNA, Adjuvant, Ferric chloride, Vaccine, DTH.

Correspondence to: Maryam Hoamayoon

Tel: +98 9171271650

E-mail: Maryam.homayoon@yahoo.com

Journal of Microbial World 2019, 12(2): 101-113.

Copyright © 2019, This article is published in Journal of Microbial World as an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License. Non-commercial, unrestricted use, distribution, and reproduction of this article is permitted in any medium, provided the original work is properly cited.