Journal of Microbial World
Volume 15, No. 3, December 2022

Original Article

Homologous Bacterial DNA as an Adjuvant for the development of humoral and cellular immune responses against *Pasteurella multocida* in sheep

Keivandokht Abbasi[1], Yahya Tahamtan[2], Elham Moazamian [3], Mohammad Hossein Hosseini[4]

[1]Ph.D student, Department of Microbiology, Shiraz Branch, Islamic Azad University, Shiraz, Iran. [2] Associate Professor, Microbiology Department, Razi Vaccine and Serum research Institute Shiraz Branch, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Shiraz, Iran. [3]AssistantProfessor, Department of Microbiology, Shiraz Branch, Islamic Azad University, Shiraz, Iran. [4]Assistant Professor, Immunology Department, Razi Vaccine and Serum research Institute Shiraz Branch, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Shiraz, Iran.

Abstract

Backgronnd & Objectives: *Pasteurella (P.) maltocida* is the cause of pasteurellosis. Animals and sometimes humans are involved with this bacterium. The aim of this study was to evaluate immune responses in sheep vaccinated with inactive antigen along with alum and AbDNA adjuvant by tracking IgG and cytokine levels on serum samples.

Material & Methods: Sheep were immunized with two doses of inactivated vaccine with formalin at an interval of 2 weeks. Alum and DNA of *P.maltocida* serotype A strain were used as an adjuvant. One milliliter of immunogen was inoculated subcutaneously to the animals. After ELISA design, immune response was evaluated by measuring specific IgG antibody titer and TNF -α measurement on serum samples and lymphocyte cell culture.

Results: The antibody titer in the group receiving DNA was higher than the group receiving Alum and the control groups. The highest antibody level (1.463) was related to the FIV-AbDNA group in the fourth week. In the FIV-Alum group, the highest titer was 1.054, which indicates a weaker immune response compared to the DNA group. AbDNA also increased the production of TNF-α. TNF-α in immunized animals increased significantly compared to the control groups. The highest titer of TNF-α (1.44) was related to the FIV-AbDNA group on the serum sample.

Conclusion: *P.maltocida* antigen together with bacterial DNA as an adjuvant is an alternative candidate for making new vaccines against *P.maltocida*. Considering the ability of AbDNA to create immune responses through the release of different cytokines, it is suggested to evaluate different types of cytokines.

Key words: *Pasteurella maltocida*, bacterial DNA, alum, adjuvant, vaccine, TNF-α.

Received: 18 June 2022 Revised: 1 August 2022 Accepted: 26 October 2022

Correspondence to: Yahya Tahamtan
Tel: +98 9177117940
E-mail: yahyatahamtan@yahoo.com

Journal of Microbial World 2022, 15(3): 192-206
DOI:10.30495/jmw.2022.1954395.2013

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.

مجله دنیای میکروب‌ها
سال پانزدهم شماره سوم (پیاپی ۵۲) پاییز ۱۴۰۱
صفحات ۲۰۶-۱۹۲

Original Article

نقش DNA باکتریایی هم‌تیپ به‌عنوان اجوانت در ایجاد پاسخ‌های ایمنی هومورال و سلولی علیه آلودگی با پاستورلا مالتوسیدا در گوسفندان

کیواندخت عباسی[۱]، یحیی تهمتن[۲*]، الهام معظمیان[۳]، محمد حسین حسینی[۴]

[۱]دانشجوی دکتری، گروه میکروبیولوژی، واحد شیراز، دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز، ایران. [۲]دانشیار، بخش میکروب شناسی، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی شعبه شیراز، سازمان تحقیق، آموزش و ترویج کشاورزی، شیراز، ایران. [۳]استادیار، گروه میکروبیولوژی، واحد شیراز، دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز، ایران. [۴]استادیار، بخش ایمنی شناسی، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی شعبه شیراز، سازمان تحقیق، آموزش و ترویج کشاورزی، شیراز، ایران.

چکیده

سابقه و هدف: پاستورلا مالتوسیدا عامل بیماری پاستورلوز می‌باشد. حیوانات و گاهی انسان با این باکتری درگیر می‌شوند. هدف این مطالعه ارزیابی پاسخ‌های ایمنی در گوسفندان واکسینه شده با آنتی‌ژن غیرفعال همراه با اجوانت آلوم و AbDNA از طریق ردیابی میزان IgG و سایتوکین در سرم بود.

مواد و روش‌ها: گوسفندان با دو دوز واکسن غیرفعال شده با فرمالین به فاصله ۲ هفته ایمن شدند.در این واکسن‌ها از آلوم و DNA پاستورلا مالتوسیدا سروتیپ A به‌عنوان اجوانت استفاده گردید. درهر مرحله، یک سی‌سی ایمونوژن به‌صورت زیرجلدی به حیوانات تلقیح شد. پس از طراحی الایزا، پاسخ ایمنی اکتسابی با اندازه‌گیری تیتر آنتی‌بادی اختصاصی IgG و اندازه‌گیری TNF-α بر روی نمونه‌های سرم و کشت سلول لنفوسیت بررسی شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد تیتر آنتی‌بادی در گروه دریافت کننده DNA نسبت به گروه دریافت کننده آلوم و گروه‌های کنترل بالاتر بود. بالاترین سطح آنتی‌بادی (۱/٤٦۳) مربوط به گروه FIV-AbDNA در هفته چهارم بود. در گروه FIV-Alum بالاترین تیتر ۱/۰٥٤ بود که نشان از پاسخ ایمنی ضعیف‌تر نسبت به گروه DNA می‌باشد. پس از ایمن‌سازی، AbDNA باعث افزایش تولید TNF-α نیز گردید. بطورکلی تیتر TNF-α در حیوانات ایمن شده نسبت به گروه‌های کنترل افزایش معناداری داشت. بالاترین تیتر TNF-α (۱/٤٤) مربوط به گروه FIV-AbDNA در نمونه سرم بود.

نتیجه‌گیری: آنتی‌ژن پاستورلا مالتوسیدا همراه با DNA باکتریایی به‌عنوان اجوانت، گزینه‌ای برای ساخت واکسن‌های جدید علیه پاستورلا مالتوسیدا می‌باشد. با توجه به توانایی AbDNA در ایجاد پاسخ‌های ایمنی به واسطه آزادسازی سایتوکاین‌های مختلف، ارزیابی انواع سایتوکاین‌ها پیشنهاد می‌گردد.

واژگان کلیدی: پاستورلا مالتوسیدا، DNA باکتریایی، آلوم، اجوانت، واکسن، TNF-α.

دریافت مقاله: ۱۴۰۱/۳/۲۸ ویرایش مقاله: ۱۴۰۱/۵/۱۰ پذیرش مقاله: ۱۴۰۱/۸/٤

مقدمه

جنس پاستورلا یکی از اعضای مهم خانواده پاستورلاسه می‌باشد که یک گروه بزرگ و متنوع از گاماپروتئوباکترهای گرم منفی است. گونه‌های جنس پاستورلا شامل *مالتوسیدا P. multocida*، سپتیکا *P.septica*، تایگریز *P. tigris* و همولیتیکا *P. haemolytica* می‌باشند. در این جنس، *پاستورلا مالتوسیدا* گونه مهمی است که از نظر ضررهای اقتصادی

*) آدرس برای مکاتبه: مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، شعبه شیراز، ایران.
تلفن: ۰۹۱۷۷۱۱۷۹٤۰ پست الکترونیک:yahyatahamtan@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.

اهمیت فراوانی دارد (۱و۲). باکتری *پاستورلا مالتوسیدا* در سال ۱۸۷۸ توسط پرنشیتو (Perroncito) کشف شد و در سال ۱۸۸۰ توسط لویی پاستور به عنوان یک باکتری گرم منفی، عامل ایجاد وبای مرغی نامگذاری گردید (۳و٤). این باکتری بر اساس ترکیب آنتی‌ژن کپسول پلی‌ساکاریدی سروتیپ بندی می‌شود و سویه‌ها در یکی از ۵ سرو-گروه کپسولی A(هیالورونیک اسید)، B (آرابینوز، مانوز و گالاکتوز)، D (هپارین)، E (نامشخص) و F (کندروئیتین) قرار می‌گیرند. همچنین آن‌ها بر اساس آنتی‌ژن سوماتیک لیپوپلی ساکاریدی به ۱٦ سروتیپ تقسیم‌بندی می‌شوند. معرفی جدایه‌ها معمولاً بر اساس سروگروه کپسولی است که توسط شماره سروتیپ سوماتیک کامل می‌شود مثلاً (A:1، A:2، B:2 و ...). بین این گروه‌های کپسولی و پاتوژنسیته باکتری ارتباط وجود دارد (۷-۵).

بسیاری از گونه‌های پاستورلا به صورت پاتوژن فرصت طلب باعث ایجاد عفونت‌های حاد و مزمن در انسان و حیوانات می‌شوند. انتقال این نوع بیماری‌های زئونوز در انسان از طریق گاز گرفتن و آلودگی با ترشحات بینی حیوان صورت می‌گیرد و به ندرت سبب نکروز پوستی می‌گردند (۷ و ۸).

پاستورلا مالتوسیدا عامل سندرم‌های متعددی است که انواع مختلفی از میزبانان را تحت تأثیر قرار می‌دهد. سندروم مهم پاستورلوز در عفونت‌های اندمیک در جمعیت حیوانات اهلی و وحشی، در دستگاه تنفسی فوقانی به شکل رینیت (سوزش و التهاب مخاط بینی و ترشحات بینی) و بیماری دستگاه تنفسی تحتانی به شکل نمونیا می‌باشد (۹،۷و۱۰). این باکتری در گاو، گوسفند و بز عامل نمونیا و سپتی سمی هموراژیک در مرغ و ماکیان عامل وبای پرندگان و در خوک عامل رینیت آتروفیک است (۱۱و۱۲).

با وجودی که *پاستورلا مالتوسیدا* اغلب به عنوان یک عضو طبیعی میکروبیوتای دستگاه تنفسی فوقانی وجود دارد، اما عفونت با آن ممکن است به طور مستقیم یا غیر مستقیم به دلیل عوارض آلودگی و مرگ و میر حیوان خسارات اقتصادی فراوانی را به صنعت دام و دامداران تحمیل کند. پاستورلوز توسط تیپ‌های مختلف توکسین‌زا و غیر توکسین‌زای باکتری *پاستورلا مالتوسیدا* ایجاد می‌شود. اغلب سروتیپ A عامل ایجاد بیماری نمونیا در گوسفند و بز می‌باشد (٤، ۱۳و۱٤).

پیشگیری یک روش مناسب و مؤثر برای جلوگیری از عفونت‌های پاستورلوزی است و در دام‌هایی چون بز و گوسفند اهمیت بسیاری دارد و از خسارات اقتصادی به دامداری‌ها می‌کاهد. آنتی‌بیوتیک درمانی، یک روش مفید برای کنترل عفونت می‌باشد، ولی مقاومت‌های میکروبی باعث شده که استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها چندان موفقیت آمیز نباشد. طبق تحقیقات انجام شده *پاستورلا مالتوسیدا* حدود ۸۰٪ مقاومت آنتی‌بیوتیکی کسب نموده است. علاوه بر مقاومت دارویی، درمان آنتی‌بیوتیکی هزینه‌بر و طولانی مدت است (۱۳و۱۵).

راه کار مهم برای پیشگیری از بیماری‌های عفونی در دام، واکسیناسیون است. بیماری‌های نوظهور و مقاومت‌های دارویی، تقاضا برای روش‌ها و فن‌آوری‌های جدید را افزایش داده است. برای جبران ضعف ایمنی‌زایی آنتی‌ژن‌های خالص در واکسن‌ها، استفاده از اجوانت ضروری می‌باشد. اجوانت باعث تقویت ایمنی‌زایی آنتی‌ژن، و تحریک مناسب و کافی سیستم ایمنی در برابر عامل عفونت‌زا می‌گردد. بنابراین با استفاده از اجوانت‌های مناسب اثر بخشی قابل توجهی در واکسن‌های حاوی میکروب‌های غیر فعال، آنتی‌ژن‌های پپتیدی، سنتتیک و پروتینی نوترکیب و ترکیبات کپسولی دیده شده است (۱۸-۱٦).

ترکیبات آلوم (عمدتاً آلومینیوم فسفات یا هیدروکسید) به عنوان اجوانت‌های انسانی غالب محسوب می‌شوند. متأسفانه، نمک‌های آلومینیوم اجوانت‌های نسبتاً ضعیفی هستند و به ندرت باعث القای پاسخ‌های ایمنی سلولی می‌شوند. از دیگر محدودیت‌های اجوانت آلوم، افزایش تولید IgE و آلرژی‌زایی است (۱۹).

از اجوانت‌های جدیدتر می‌توان انواع اجوانت‌های باکتریایی را نام برد. اجوانت‌های بدست‌آمده از ترکیبات باکتریایی مانند لیپوپلی ساکارید و پروتین‌های غشای خارجی، اجوانت‌های مؤثری هستند اما اثرات نامطلوبی مانند خاصیت سمی بودن را از خود بروز می‌دهند. ژل هیدروکسید آلومینیوم از این نظر ایمن می‌باشد، اما توانایی ایجاد پاسخ ایمنی موکوسی مناسبی

ندارد. در ژنوم باکتری‌ها توالی مشاهده می‌شود به نام توالی CpG غیرمتیله که می‌تواند پاسخ‌های ایمنی را القا نماید و DNA باکتری‌ها، به واسطه ی وجود ساختار Dinucleotide CpG از DNA پستانداران متفاوت است. این توالی باعث تکثیر سلول‌های B و T، ماکروفاژها و تحریک ترشح ایمونوگلوبولین‌ها می‌گردد و از آن به‌عنوان یک اجوانت جدید و کاربردی در ساخت واکسن نام برده می‌شود (۲۰و۲۱). همچنین برای بررسی قدرت اجوانتی DNA باکتریایی در تحریک ایمنی سلولی، لازم است تکثیر سایتوکین‌ها مورد ارزیابی قرار گیرد. توالی CpG باعث القای سایتوکین‌های التهابی و ایمونوگلوبولین‌ها می‌شود. الیگونوکلئوتید CpG به TLR9 (Toll-Like Receptors) متصل شده و تولید انواع سایتوکین‌ها از جمله IL-1، IL-6، IL-12 و TNF-α را توسط سلول‌های دندریتی و ماکروفاژها و تولید IFN-γ، IL-6 و IL-12 را توسط سلول‌های کشنده طبیعی تحریک می‌نماید (۲۲). سایتوکاین‌های تخصصی از جمله تومور نکروز فاکتور آلفا (TNF-α) سایتوکین مهمی برای تحریک پاسخ‌های ایمنی پس از واکسیناسیون می‌باشد.

با توجه به این که کومار (Kumar) و همکاران در سال ۲۰۰۵ در هند (۲۳) و همایون و همکاران در سال ۲۰۱۸ در ایران (۲٤) تأثیر DNA باکتریایی را به عنوان اجوانت در تحریک سیستم ایمنی موش علیه باکتری پاستورلا مورد بررسی قرار داده و به نتایج مطلوبی دست یافته‌اند، بنابراین در پژوهش حاضر برای اولین بار تأثیر DNA باکتریایی به عنوان اجوانت در تحریک سیستم ایمنی گوسفندان نژاد کبوده شیراز علیه باکتری *پاستورلا مالتوسیدا* مورد بررسی قرار گرفت.

هدف از این تحقیق بررسی اثر DNA باکتریایی به‌عنوان اجوانت در تشدید ایمنی‌زایی آنتی‌ژن کامل باکتری *پاستورلا مالتوسیدا* در مقایسه با اجوانت آلوم در گوسفند بود. در این پژوهش ارزیابی سایتوکاین‌ها بر روی نمونه‌های سرم و محصولات بدست‌آمده از کشت سلول لنفوسیت پس از واکسیناسیون با *پاستورلا مالتوسیدا* نیز در گروه‌های مختلف انجام شد.

مواد و روش‌ها

الف) حیوانات هدف آزمون: این پژوهش بر روی ۲۰ گوسفند، در یک رده سنی از نژاد کبوده شیراز به روش تجربی (Experimental) انجام شد. حیوانات به دو گروه اصلی تست و کنترل تقسیم شدند که هر یک از گروه‌های تست و کنترل دارای دو زیر گروه مختلف بودند. در هر یک از این زیر گروه‌ها پنج حیوان قرار گرفت.

ب) کشت باکتری و تهیه سوسپانسیون سلولی: از باکتری *پاستورلا مالتوسیدا* تایپ A جدا شده از گوسفند به عنوان سویه اصلی استفاده شد که در موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی (RVSRI)، شیراز، ایران از گوسفند جداسازی و تعیین تایپ شده بود. این سویه *P. multocida* PMSHI-9 (Genbank accession number: JF694004.1) به شکل آمپول‌های لیوفیلیزه تهیه شد. با کشت در محیط بلاد آگار (Merck) فعال شد و به مدت ۲٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری شد. چند کلنی تک از محیط بلاد آگار به محیط Brain Heart Infusion (BHI) (شرکت Merck) انتقال داده شد و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس در انکوباتور شیکر دار گرمخانه‌گذاری گردید. پس از ۲٤ ساعت باکتری‌ها به ارلن‌های حاوی ۵۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت BHI تلقیح گردیدند و به مدت ۲٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس در انکوباتور شیکر دار گرمخانه‌گذاری شدند تا باکتری در حجم وسیع تکثیر یابد. محتویات ارلن‌ها در لوله‌های مخروطی تقسیم، و در سانتریفوژ یخچال‌دار به مدت ٤۵ دقیقه در دور 13000 rpm سانتریفوژ شدند. مایع رویی دور ریخته شد و سلول‌ها سه مرتبه با افزودن PBS و به کمک سانتریفوژ یخچال دار (۱۰ دقیقه در دور 3500 rpm) شستشو داده شد. در نهایت رسوب سلولی شسته شده جمع‌آوری و برای غیر فعال‌سازی با فرمالین استفاده گردید (۱۵و۲٤).

ج) استفاده از فرمالین برای غیر فعال‌سازی باکتری: برای غیر فعال‌سازی باکتری، فرمالین با غلظت ۰/۵ درصد به سوسپانسیون باکتری فوق اضافه و به مدت ٤۸ ساعت در انکوباتور شیکردار و دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری

گردید. سپس سوسپانسیون باکتری به مدت ۲۵ دقیقه در 3500 rpm سانتریفیوژ شد و برای حذف فرمالین اضافی، آنتی‌ژن غیرفعال شده، دو بار با نرمال سالین شستشو داده شد. در نهایت سوسپانسیونی از آنتی‌ژن غیرفعال شده با فرمالین formalin-inactivated antigen (FIA) در نرمال سالین تهیه و برای استفاده به عنوان ایمونوژن در یخچال نگهداری شد.

د) بررسی سترونی و سلامت ایمونوژن‌های غیر فعال‌شده با فرمالین: فرایند تولید ایمونوژن فرایندی بسیار حساس است و در صورت بروز کوچکترین آلودگی، تمامی مراحل بایستی تکرار گردد. برای بررسی استریل بودن ایمونوژن و اجوانت قبل از تزریق به حیوان، به میزان ۲۰ میکرولیتر از نمونه ایمونوژن غیر فعال‌شده با فرمالین روی محیط‌های Nutrient Agar، Blood Agar و BHI کشت داده شد و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری گردید. رشد یا عدم رشد باکتری در محیط‌های کشت پس از ٤٨ ساعت گرماگذاری مورد بررسی قرار گرفت (۲۳).

ه) تست ایمنی/بی خطری: ایمنی واکسن‌ها با مشاهده رفتار عمومی حیوانات پس از واکسیناسیون ارزیابی شد. گوسفندان برای هر گونه نشانه‌ای از جمله کسلی، افسردگی، بی‌اشتهایی، اختلالات روانی، تأثیر بر شرایط پوستی، وزن بدن و درجه حرارت در تمام مدت آزمایش مشاهده شدند.

و) آماده‌سازی اجوانت‌ها: ۱- تهیه اجوانت آلوم: غلظت ۵ درصد ژل هیدروکسید آلومینیوم در آب مقطر تهیه و به میزان ۰/۵ درصد به باکتری غیر فعال‌شده اضافه گردید. سوسپانسیون حاوی باکتری کشته شده و اجوانت برای تلقیح آماده شد.

۲- تهیه اجوانت DNA باکتریایی: برای تهیه DNA باکتریایی، استخراج DNA با روش فنل-کلروفرم مطابق پروتکل پیشنهادی (چینگ) Cheng و همکاران در سال ۲۰۰٦ انجام شد (۲۵). در این روش، برای متلاشی شدن باکتری‌ها ۱۰۰ میکرولیتر فنل به سوسپانسیون اضافه گردید و به مدت ٦۰ ثانیه ورتکس شد. همچنین، برای حذف RNA به سوسپانسیون فوق 5 µl آنزیم (RNase) افزوده شد و کلروفرم برای خالص سازی بهتر DNA مورد استفاده قرار گرفت. در نهایت، برای رسوب دادن DNA خالص از اتانول سرد استفاده شد. غلظت و خلوص DNA با تعیین نسبت طول موج ۲٦۰ به ۲۸۰ نانومتر مورد بررسی قرار گرفت. از این DNA به عنوان اجوانت به میزان ۵ میکروگرم بر سی‌سی به باکتری غیر فعال شده اضافه گردید.

ز) تزریق آنتی‌ژن‌ها به حیوان و خونگیری: برای ارزیابی ایمنی‌زایی آنتی‌ژن و اجوانت‌های مورد پژوهش، مطالعه بر روی ٤ گروه (۲ گروه تست و ۲ گروه کنترل) انجام شد. گوسفندان مورد آزمایش در گروه‌های پنج‌تایی انتخاب شد. گروه تست به دو زیر گروه مختلف آنتی‌ژن غیرفعال‌شده با فرمالین (Formalin inactivated vaccine) همراه با اجوانت DNA باکتریایی تایپ A (FIV-AbDNA)، و گروه آنتی‌ژن غیرفعال‌شده با فرمالین همراه با اجوانت ژل هیدروکسید آلومینیوم (آلوم) (FIV-Alum) تقسیم شد. گروه‌های کنترل نیز شامل دو گروه اجوانت DNA باکتریایی (bADNA) و اجوانت ژل آلوم (Alum) بود. مشخصات گروه‌های مورد آزمون در جدول ۱ نشان داده شده است:

جدول ۱: دسته‌بندی حیوانات تست/کنترل و نوع آنتی‌ژن، نوع اجوانت تزریقی و تعداد حیوانات مورد تزریق.

ردیف	گروه تست/ کنترل	نوع آنتی‌ژن	نوع اجوانت	ماده مورد تزریق	تعدادحیوانات مورد تزریق
1	Test	FIV	AbDNA	FIV-AbDNA	5
2	Test	FIV	Alum	FIV-Alum	5
3	Control	-----	AbDNA	----------	5
4	Control	-----	Alum	----------	5

FIV: Formalin Inactivated Vaccine, AbDNA: Bacterial DNA type A,
FIV-AbDNA: FIV+ bDNA type A,
FIV-Alum: FIV+ Alum.

تزریق ایمونوژن‌ها در دو نوبت (دوز اول و دوز بوستر) با فواصل دو هفته‌ای و بصورت زیر جلدی، انجام شد. در هر دو مرحله تلقیح ایمونوژن‌ها و کنترل‌ها به میزان یک سی‌سی صورت گرفت.

خونگیری از حیوانات در فواصل زمانی مشخص قبل از تزریق و به فاصله ۱۰ هفته (روزهای ۰، ۷، ۱٤، ۲۱، ۲۸، ۳۵، ٤۲، ٤۹، ۵٦ و ٦۳) پس از تزریق انجام و سرم‌ها جداسازی شدند. از سرم‌های حاصل برای اندازه‌گیری میزان تیتر آنتی‌بادی

اختصاصی IgG علیه ایمونوژن‌ها استفاده گردید. سرم‌ها تا زمان انجام الایزا در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند.

ح) تعیین تیتر آنتی‌بادی اختصاصی IgG با کمک الایزا: میزان تیتر آنتی‌بادی IgGعلیه باکتری پاستورلا مالتوسیدا با بررسی سرم‌های جداسازی شده حیوانات به کمک الایزای غیر مستقیم تعیین گردید. پوشش‌دهی آنتی‌ژن در چاهک های پلیت الایزا انجام شد. برای پوشش‌دهی آنتی‌ژن‌ها از میکروپلیت‌های ۹۶ خانه از جنس پلی‌استیرن (شرکت SPL، کره) استفاده شد. تمام چاهک‌ها با ۱۰۰میکرو لیتر از غلظت 40×10^6 ml / باکتری غیرفعال شده (آنتی‌ژن) پوشش داده شدند. پلیت‌ها به مدت ۲٤ ساعت در دمای ٤°C گرمخانه‌گذاری و سپس از یخچال خارج گردید، محلول‌های رویی دور ریخته شد و باقیمانده با بافر (PBS-T (Tween % 20)) شستشو داده شد. به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر از محلول ۰/۱٪ سرم آلبومین گاوی به منظور بلاکینگ اضافه شد. پس از گذشت زمان گرمخانه‌گذاری (یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس) محتویات پلیت خالی و چاهک‌ها سه مرتبه با بافر (PBS-T) شستشو گردید. میزان ۱۰۰ میکرولیتر از سرم رقیق شده (۵۰ : ۱) درون هر چاهک ریخته و به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ °C گرمخانه‌گذاری شد. پس از طی دوره گرماگذاری پلیت‌ها ۵ بار با PBS-T شستشو شدند. به هر چاهک میزان ۱۰۰ میکرولیتر آنتی‌بادی کونژوگه ضد گوسفندی اضافه و به مدت یک ساعت در انکوباتور ۳۷ °C قرار گرفت. پس از طی دوره گرماگذاری پلیت‌ها ٤ بار با PBS-T شستشو داده شدند. به هر چاهک میزان ۱۰۰ میکرولیتر از مخلوط ماده رنگ زا و پرکسید هیدروژن اضافه شد و پلیت به مدت ۱۰ دقیقه در محل تاریک فاقد نور قرار گرفت تا تغییر رنگ ایجاد شود. به منظور توقف واکنش به تمام چاهک‌ها میزان ۱۰۰ میکرولیتر اسیدسولفوریک ۱۲/۵ ٪ اضافه گردید. با تنظیم طول موج مناسب در دستگاه خوانش‌گر الایزا (ELISA reader) دانسیته نوری به‌دست‌آمده خوانده شد (۲٤و۲٦).

ط) کشت سلولی و تست تکثیر لنفوسیتی (LTT): در اثر تماس یک آنتی‌ژن با سیستم ایمنی اختصاصی ممکن است به دنبال حساسیت شدید تاخیری تولید لنفوسیت‌ها تحریک گردد. برای تخمین میزان تکثیر سلول‌های ایمنی اختصاصی (لنفوسیت‌ها)، از تست LTT= Lymphocyte transformation test استفاده گردید. برای تحریک تکثیر لنفوسیت‌ها از آنتی‌ژن مورد نظر در محیط کشت استفاده شد. به منظور انجام این تست در فواصل زمانی مشخص پس از تزریق دوم ایمونوژن‌ها، از حیوان خون هپارینه گرفته شد. لنفوست‌ها شمارش شده و در پلیت‌های ۲٤ خانه و در محیط کشت Dulbecco's Modified Eagle Medium =DMEM شرکت مرک، تحت شرایط استریل کشت داده شدند. به محیط DMEM آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین و استرپتومایسین با غلظت نهایی 100 u/ml و سرم جنین گاوی (Gibco) (FBS= Fetal Bovine Serum) به میزان ۱۰٪ اضافه شد و محیط کشت کامل ایجاد و در هر چاهک تست، ۱۰۰ میکرولیتر آنتی‌ژن *پاستورلا مالتوسیدا* به عنوان محرک آنتی‌ژنی و عاملی برای القای تکثیر سلولی اضافه گردید. در کنار هر جفت چاهک تست یک چاهک کنترل در نظر گرفته شد که فاقد آنتی‌ژن بود. در مرحله بعد پلیت ها به مدت ۷۲ ساعت در انکوباتور ۳۷°C حاوی ۵ درصد CO2 و رطوبت ۹۰٪ قرار گرفت. سپس مایع روماند نمونه‌ها جمع‌آوری و به عنوان آنتی‌ژن کشت سلولی در تست الایزا برای اندازه‌گیری TNF-α مورد استفاده قرار گرفت (۲٤و۲٦).

ظ) اندازه‌گیری سطح TNF-α به‌منظور بررسی تغییرات ایمنی سلولی: ارزیابی سایتوکاین‌ها از جمله روش‌های اصلی برای بررسی فعالیت ایمنی اکتسابی می‌باشد. در این پژوهش، میزان سایتوکاین تخصصی TNF-α با استفاده از کیت تجاری بر روی نمونه‌های سرم و سوسپانسیون به‌دست‌آمده از کشت سلول لنفوسیت اندازه‌گیری شد. اندازه‌گیری TNF-α با کیت (شرکت Bioassay، چین) انجام شد. اساس این کیت با استفاده از تکنولوژی دبل بیوتین آنتی‌بادی و به روش الایزای ساندویچی (Double biotin antibody sandwich technology) می‌باشد. در این مرحله الایزا با استفاده از دستگاه تمام اتوماتیک Elisys Uno (شرکت Human، آلمان) انجام شد.

ی) تجزیه و تحلیل آماری: تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با

استفاده از نسخه پانزدهم نرم افزار SPSS و آزمون آنالیز واریانس ANOVA انجام شد. بدین منظور برای ارزیابی تأثیر زمان در تیتر آنتی‌بادی از روش آماری آنالیز واریانس با تکرار (Repeated ANOVA) و برای مقایسه میانگین متغیرها بین گروه‌های مختلف از روش One way ANOVA استفاده گردید. نتایج سنجش‌ها با آزمون t مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت که نتایج با درصد خطای ۰/۰۵ معنادار بود.

یافته‌ها

الف) خالص‌سازی DNA باکتریایی: برای تهیه اجوانت، DNA باکتری *پاستورلا مالتوسیدا* تیپ A (AbDNA) با روش فنل- کلروفرم استخراج گردید. غلظت DNA جدا شده از سویه *پاستورلا مالتوسیدا* تایپ A 230 ng/µL بود. در مرحله فرمولاسیون ایمونوژن، از این DNA به میزان ۵µg بر سی‌سی به باکتری غیرفعال شده به عنوان اجوانت اضافه گردید. DNAهای باکتری استخراج‌شده با نسبت A_{260}/A_{280} حدود ۱/۸ خالص و عاری از پروتین و RNA بودند.

ب) غیرفعال‌سازی باکتری با فرمالین: سویه *پاستورلا مالتوسیدا* تایپ A کشت داده شده در محیط BHI با استفاده از غلظت ۰/۵ درصد از فرمالین به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور شیکردار و دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری و بطور کامل غیرفعال شد. آنتی‌ژن غیرفعال شده با فرمالین (formalin-inactivated antigen (FIA)) تا زمان استفاده به عنوان ماده ایمونوژن، در یخچال نگهداری شد.

ج) بررسی سترونی ایمونوژن: وضعیت رشد یا عدم رشد باکتری به مدت ۲۴ ساعت، ۴۸ ساعت، و ۷ روز در دمای ۳۷ °C بررسی شد. با توجه به عدم رشد روی محیط‌های کشت، ترکیبات ایمن درنظر گرفته شده و فرمولاسیون واکسن انجام گردید.

د) ارزیابی ایمنی واکسن‌ها: محل‌های تزریق پس از واکسیناسیون در طول کارآزمایی بررسی شدند. هیچ تغییری در رفتار حیوان و یا واکنش موضعی و عمومی در هیچ گروه از گوسفندان دیده نشد. وضعیت کلی حیوانات ثابت بود و افزایش غیرطبیعی دمای بدن نیز در گروه‌های مورد آزمایش مشاهده نگردید.

ه) ارزیابی ایمنی هومورال با آزمون ELISA: آزمون الایزا برای تعیین میزان تیتر آنتی‌بادی اختصاصی علیه باکتری بر روی سرم‌های جداسازی شده از حیوانات در زمان‌های مختلف انجام گرفت. بررسی میزان IgG ایجاد شده در سرم گوسفند به کمک روش الایزا نشان داد که اجوانت DNA در کنار باکتری کامل غیر فعال شده با فرمالین (FIV-AbDNA) نسبت به اجوانت آلوم در کنار ایمونوژن (FIV-Alum) تاثیر ایمنی‌زایی قابل توجه‌تری دارد.

تیتر آنتی‌بادی اختصاصی علیه باکتری *پاستورلا مالتوسیدا* در حیوانات دریافت کننده ماده ایمونوژن گروه‌های تست و کنترل در نمودار ۱ نشان داده شده است. تیتر آنتی‌بادی در گوسفندان دریافت کننده آنتی‌ژن غیرفعال شده با فرمالین و DNA باکتری هم‌تیپ (FIV-AbDNA) پس از تزریق دوز بوستر در روزهای ۲۸ (۱/۴۶۳) و ۳۵ (۱/۳۴۸) افزایش قابل ملاحظه‌ای یافت.

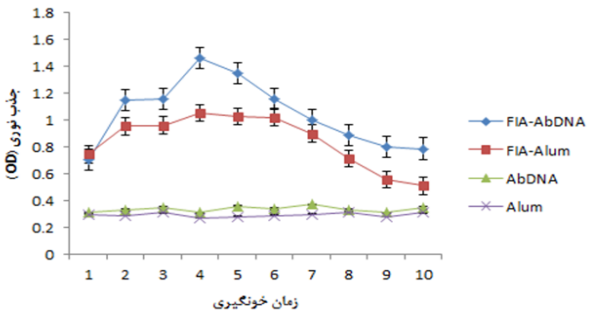
بطور کلی افزایش تیتر آنتی‌بادی در گروه‌های تست در مقایسه با گروه‌های کنترل (AbDNA و Alum) از روز ۱۴ به بعد قابل توجه بود. بین تمام گروه‌های تست و کنترل، بالاترین تیتر آنتی‌بادی (۱/۴۶۳) در روز ۲۸ یعنی دو هفته پس از تزریق دوز بوستر در گروه FIV-AbDNA مشاهده گردید که تفاوت معناداری نسبت به گروه‌های کنترل داشت ($p<0.05$).

در گروه دریافت کننده اجوانت آلوم (FIA-Alum) روز ۲۸ یعنی دومین هفته پس از تزریق دوز بوستر افزایش (۱/۰۵۴) قابل ملاحظه‌ای در تیتر آنتی‌بادی مشاهده شد، اما پس از آن تیتر آنتی‌بادی در این گروه بصورت نزولی افت داشت.

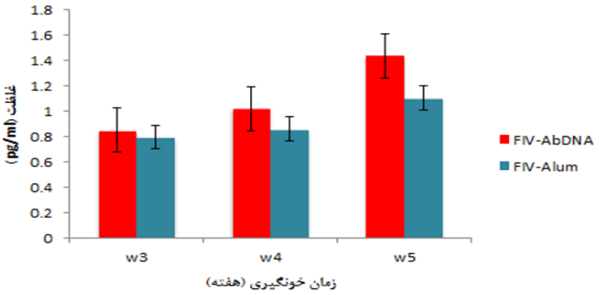
بر اساس نتایج به‌دست‌آمده دوام تیتر آنتی‌بادی تا هفته دهم در گروه FIA-AbDNA بیشتر از گروه FIA-Alum بود که این نشان از ماندگاری نسبی آنتی‌بادی در بدن حیوان بود.

و) اندازه‌گیری تیتر TNF-α بر روی نمونه‌های سرم گوسفند: آزمون الایزا برای تعیین تیتر TNF-α بر روی نمونه‌های سرم جداسازی شده از حیوانات انجام گرفت. نتایج نمودار ۲ نشان دهنده این می‌باشد که بالاترین تیتر TNF-α مربوط به گروه

دریافت کننده آنتی‌ژن غیرفعال شده با فرمالین و DNA (FIV-AbDNA) در هفته پنجم پس از تزریق بود. بر اساس نتایج بالاترین غلظت TNF-α در گروه‌های تست pg/ml ۱/٤٤ و ۱/۱۰۷pg/ml بود که هر دو مربوط به همین زمان به ترتیب در گروه‌های FIV-AbDNA و FIV-Alum بود. بطور کلی در هر سه زمان اندازه‌گیری میزان تیتر TNF-α، در گروه تست دریافت کننده اجوانت DNA هم‌تیپ نسبت به اجوانت آلوم بالاتر بود.



نمودار ۱: تیتر آنتی‌بادی در گروه‌های دریافت‌کننده آنتی‌ژن غیرفعال شده با فرمالین همراه با اجوانت Alum (FIV-Alum) و DNA باکتری *پاستورلا مالتوسیدا* (FIV-AbDNA) در مقایسه با گروه‌های کنترل شامل اجوانت DNA (AbDNA) و اجوانت ژل آلوم (Alum).



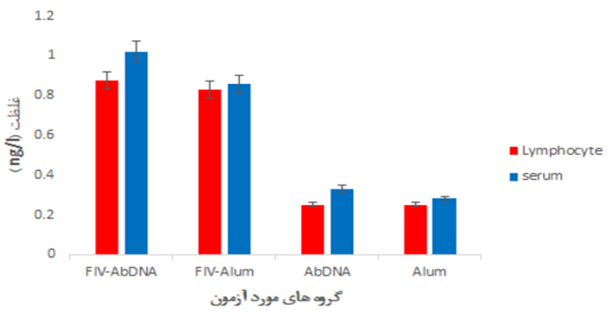
نمودار ۲: تیتر TNF-α در گروه‌های تست FIV- AbDNA و FIV-Alum در زمان‌های مختلف (هفته سوم، چهارم و پنجم) پس از تزریق ایمونوژن بر روی نمونه‌های سر با ($p<o.o5$) معنادار بود.

ی) اندازه‌گیری تیتر TNF-α بر روی نمونه‌های کشت سلول لنفوسیت گوسفند: تست الایزا برای تعیین میزان تیتر TNF-α بر روی محصولات به‌دست‌آمده از کشت سلولی انجام گردید. بر اساس نتایج جدول ۲ بالاترین غلظت TNF-α در هفته پنجم از گروه FIV- AbDNA (۰/۹٦٥ pg/ml) به‌دست آمد. در این گروه تیتر سایتوکین از هفته سوم تا پنجم به صورت صعودی افزایش داشته است. نکته قابل توجه در مورد نتایج ارزیابی این سایتوکین، اختلاف ناچیز غلظت TNF-α در زمان‌های مورد بررسی در گروه دریافت کننده آنتی‌ژن غیرفعال شده با فرمالین همراه با اجوانت ژل هیدروکسید آلومینیوم می‌باشد.

با مقایسه نتایج تست الایزا و تیترهای به‌دست آمده از کشت سلول لنفوسیت و سرم حیوانات در گروه‌های مختلف مشاهده گردید که غلظت TNF-α حاصل از نمونه‌های سرم در زمان‌های مختلف پس از تزریق در اکثر گروه‌های تست و کنترل نسبت به نمونه‌های کشت سلولی بیشتر بود (جدول۲ و نمودار۳). نتایج نشان می‌دهد با وجودی که به طور کلی غلظت سایتوکین‌های سرمی نسبت به کشت سلولی بیشتر بود اما روند تغییرات تیتر در گروه‌های مختلف تست و کنترل مشابه بوده است.

جدول ۲: تیتر TNF-α در گروه‌های تست و کنترل پس از تزریق ایمونوژن.

ردیف	گروه	هفته سوم		هفته چهارم		هفته پنجم	
		سرم	کشت لنفوسیت	سرم	کشت لنفوسیت	سرم	کشت لنفوسیت
۱	FIV-AbDNA	۰/۸۵	۰/۷۵۱	۱/۰۲۲	۰/۸۷۸	۱/۴۴	۰/۹۶۵
۲	FIV-Alum	۰/۷۹۶	۰/۸۰۶	۰/۸۵۹	۰/۸۲۹	۱/۱۰۷	۰/۸۵۶
۳	AbDNA	۰/۲۴۱	۰/۲۵۱	۰/۳۳۲	۰/۲۵۱	۰/۲۲۳	۰/۲۶۱
۴	Alum	۰/۲۲۹	۰/۲۴۶	۰/۲۸۱	۰/۲۵۲	۰/۲۴۳	۰/۲۳۷



نمودار ۳: مقایسه میزان TNF-α در هفته چهارم پس از تزریق بر روی نمونه‌های سرم و کشت سلول لنفوسیت در گروه‌های تست و کنترل با ($p<o.o5$) معنادار بود.

بحث

در حال حاضر ما در دوره‌ای زندگی می کنیم که بیماری‌های عفونی از اهمیت گسترده‌ای برخوردارند. بسیاری از عوامل بیماری‌زای عفونی مرتبط با حیوانات هستند و می‌توانند

بیماری‌های مشترک بین انسان و دام را به وجود آورند. از بین صدها سویه باکتری که به طور معمول در دهان، بینی و نواحی تنفسی حیوانات شناخته شده اند، سویه‌های *پاستورلا* از جمله شایع‌ترین سویه‌های کامنسال و پاتوژن‌های فرصت‌طلب می‌باشند. *پاستورلا مولتوسیدا* به عنوان یک پاتوژن باکتریایی اولیه یا ثانویه مرتبط با عفونت‌های شدید تنفسی شناخته شده است (۶و۱۲).

با توجه به بروز نسبتاً پایین عفونت‌های انسانی، بیشتر مطالعات ایمن‌سازی یا واکسیناسیون علیه عفونت‌های پاستورلا بر روی کنترل بیماری‌های حیوانی انجام می‌شوند. سروتیپ‌های A و D از *پاستورلا مالتوسیدا* به عنوان عوامل ایجاد کننده نمونیای پاستورلوزی در گوسفند و بز شناخته شده‌اند. نکته قابل تأمل این است که اکثر جدایه‌های انسانی هم متعلق به این دو سروتیپ کپسولی بوده‌اند (۲۷). به دلیل نقش این دو سروتیپ از *پاستورلا مالتوسیدا* در ایجاد بیماری‌های تنفسی در گوسفندان و احتمال آسیب رساندن به دامپروری، ارزیابی ایمنی‌زایی آنتی‌ژن باکتری قدم مؤثری در بکارگیری روش‌های مناسب پیشگیری از بیماری خواهد بود. هدف واکسیناسیون، تولید واکنش قوی ایمنی نسبت به آنتی‌ژن تزریق شده است که قادر به حفاظت طولانی مدت در برابر عفونت باشد. برای رسیدن به این هدف با واکسن‌های کشته شده، اغلب نیاز به افزودن یک اجوانت است. در واقع با وجود پیشرفت‌های اخیر در فن‌آوری تولید واکسن، موفقیت اکثر واکسن‌ها به ارتباط با اجوانت بستگی دارد. عامل محدود کننده در کارایی واکسن، ضعیف بودن خاصیت ایمنی‌زایی آنتی‌ژن‌های خالص شده‌ای است که به تنهایی تزریق می‌گردند (۲۸).

اجوانت‌ها، ترکیباتی هستند که پاسخ ایمنی اختصاصی را در برابر آنتی‌ژن‌ها افزایش داده و از طریق افزایش ایمنی‌زایی، نقش مهمی را در فرمولاسیون واکسن بازی می‌کنند. همچنین برای کاهش دوز واکسن تزریقی و تعداد دفعات ایمن‌سازی، می‌توان اجوانت اضافه نمود (۲۹). استراتژی‌های مختلفی که در طراحی واکسن‌ها به کار می‌روند باعث افزایش نقش حفاظتی این واکسن‌ها می‌گردد. مقدار آنتی‌ژن بر ایمنی‌زایی تأثیرگذار است به طوری‌که در مقادیر بسیار کم یا بسیار زیاد، سیستم ایمنی قادر به ایجاد پاسخ ایمنی مناسب علیه آنتی‌ژن نیست و حتی ممکن است سبب مهار پاسخ ایمنی شود. نحوه تجویز آنتی‌ژن هم بر کیفیت پاسخ ایمنی اثر دارد. تزریق درون رگی، مصرف خوراکی آنتی‌ژن و تزریق زیرپوستی پاسخ‌های متفاوتی را به دنبال دارد (۳۰).

در این مطالعه توانایی واکسن غیرفعال شده با فرمالین همراه با ژل آلوم (FIV-Alum) و DNA باکتریایی به عنوان اجوانت (FIV-AbDNA)، با روش تزریق زیرجلدی مورد ارزیابی قرار گرفت تا بتوان القای پاسخ‌های ایمنی در گوسفند را بررسی نمود. نتایج این پژوهش نشان داد که ایمونوژن‌های هر دو گروه تست از طریق مسیر زیر جلدی به راحتی تزریق می‌شوند.

یکی از روش‌های تهیه واکسن غیر فعال استفاده از فرمالین برای غیرفعالسازی باکتری هاست. عمده واکسن‌ها دارای فرمالین هستند که یک محلول آبی و محصولی از متابولیسم تک کربنی است و به عنوان ضدعفونی کننده موثر باعث از بین رفتن بیشتر باکتری‌ها و قارچ‌ها می‌شود. این ترکیب یک ماده جهش‌زا نیز هست که می‌تواند برای انسان و سایر جانوران سرطان‌زا باشد. اگر از فرمالین در غلظت‌های بالا استفاده شود ممکن است در آزمایشگاه باعث تغییرات ژنتیکی و جهش شود، به همین خاطر زمان استفاده از آن باید نکات ایمنی رعایت گردد (۳۱و۳۲).

تحقیق حاضر برای اولین بار روی گوسفند صورت گرفت و برای غیرفعال‌سازی باکتری از فرمالین استفاده گردید. چون DNA باکتریایی دارای اثر تحریک کننده بر روی سلول‌های ایمنی انسان و پستانداران در هر دو شرایط آزمایشگاهی (in vitro) و در محیط بیولوژیک (in vivo) است، DNA باکتریایی به عنوان اجوانت در این پژوهش مورد استفاده قرار گرفت. بسیاری از اجوانت‌های قوی مانند فروند و لیپوپلی ساکارید بواسطه واکنش‌های سیستمیک و موضعی برای مصارف گسترده مناسب نیستند. از این رو، از سال ۱۹۲۶ از اجوانت آلوم (هیدروکسید آلومینیوم یا فسفات آلومینیوم) استفاده گردیده است. با این حال، سمیت آلومینیوم بر روی

عصب همراه با عوارض جانبی موضعی، سؤالاتی را در رابطه با استفاده از آن مطرح نمود. محققان تأیید کرده اند که اجوانت‌های قوی با مسمومیت بالاتر همراه هستند، بنابراین به حداقل رساندن مسمومیت، هدف اصلی در پیدا کردن و ارزیابی اجوانت‌های جدید است (۳۳).

Qureshi و همکاران در سال ۲۰۱۷، *پاستورلا مالتوسیدا* B:2 را با استفاده از باکتریوفاژ *پاستورلا*، لایز و از آلوم به عنوان اجوانت برای بررسی کارآیی واکسن آزمایشی خود در موش و خرگوش استفاده نمودند. به طور کلی، نتایج حاکی از آن است که حیوانات واکسینه شده با واکسن تجاری حاوی رسوب آلوم، نمی‌توانند سطوح کافی از آنتی‌بادی اختصاصی را برای مدت طولانی حفظ کنند (۳٤).

اجوانت مناسب منجر به افزایش فعالیت سیستم ایمنی می‌شود و تأثیر مثبت بر میزان IgG و دیگر ایمونوگلوبولین‌ها دارد. DNA باکتری قادر به تحریک سلول‌های B و سلول‌های NK (Natural killer) است و همچنین می‌تواند مونوسیت‌ها، ماکروفاژها و سلول‌های دندریتیک را تحریک کند که سپس چندین سایتوکین از جمله سایتوکین‌های مرتبط با Th1 مانند IFN-γ، IL-6، IL-12 و TNF-α را تولید می‌کنند (۱۷، ۳۵و۳٦). به طور کلی اجوانتی که بتواند Th1 را القا نماید، یک مورد مناسب برای ساخت واکسن است. سلول‌های Th1 باعث افزایش فعالیت سیتوتوکسیک‌ها و ترشح سایتوکین‌های مختلف می‌شوند. برای درک پاسخ‌های ایمنی اکتسابی ایجاد شده توسط اجوانت bDNA، تعیین تکثیر سایتوکین ضروری است. مطالعه حاضر به منظور بررسی سایتوکین‌های سرم پس از واکسیناسیون با *پاستورلا مالتوسیدا* سروتیپ A در گروه‌های مختلف گوسفند انجام شد (۹و۳٦).

مطالعات محدودی روی نقش اجوانتی DNA باکتریایی *پاستورلا* صورت گرفته است اما با توجه به این که این اجوانت، توانایی ایجاد پاسخ‌های ایمنی هومورال و سلولی قوی‌تری دارد، بسیار مورد توجه است (۲٤و۳٦). کومار و همکاران با ارزیابی توانایی و کارایی واکسن *سالمونلا تیفی موریوم* نشان دادند که استفاده از DNA باکتریایی همولوگی که بتواند پتانسیل ایمنی‌زایی را در واکسن غیرفعال شده بالا ببرد، می‌تواند باعث بهبود کارایی واکسن گردد (۲۳). بودی و همکاران در سال ۲۰۱۱ از الیگوداکسی نوکلئوتیدهای مصنوعی (ODNs) حاوی بنیان‌های CpG غیرمتیله به عنوان اجوانت برای تهیه واکسن استفاده نمودند. CpG ODN فعالیت سلول‌های عرضه کننده آنتی‌ژن را بهبود می‌بخشد و پاسخ‌های ایمنی هومورال و سلولی علیه آنتی‌ژن اختصاصی واکسن را افزایش می‌دهد (۳۷). ژانگ و همکاران اثر الیگودئوکسی نوکلئوتیدهای CpG غیر متیله (CpG ODN) و پاسخ‌های ایمنی خوکچه‌های حاوی CpG ODN و واکسن زنده *پاستورلا مالتوسیدا* در خوک را مطالعه کردند و به این نتیجه رسیدند که استفاده‌های درمانی پیش‌بینی‌شده برای این ODNها (به عنوان اجوانت و مکمل‌های کمکی واکسن) ممکن است به دلیل توانایی آن‌ها در تعدیل پاسخ ایمنی به سمت پاسخ شبه Th1 باشد (۹).

در این مطالعه، ما نشان دادیم که افزودن bDNA به واکسن FIV منجر به افزایش قابل توجهی در تولید TNF-α شد. اگرچه مکانیسم دقیق اثر ناشناخته باقی مانده است، اما ممکن است bDNA تولید سایتوکین‌ها را تحریک کند. با نتایج به دست آمده توسط همایون و همکاران مشخص شد که اجوانت باکتریایی در مقایسه با آلوم تأثیر بیشتری را در تحریک سیستم ایمنی موش دارد. آن‌ها نشان دادند که اجوانت DNA باکتریایی نه تنها اثر ایمنی‌زایی در بدن موش دارد بلکه در برابر عفونت محافظت طولانی‌تری ایجاد می‌نماید. همایون و همکاران جهت بررسی در موش از چندین نوع bDNA متفاوت (هم‌تیپ و غیر هم‌تیپ) استفاده کرده بودند و نتایج نشان داده بود که استفاده از DNA باکتری *پاستورلا مالتوسیدا* سروتایپ B (BbDNA) به عنوان اجوانت علیه سروتیپ A چندان جالب توجه نبود (۸و۱۵). در پژوهش حاضر فقط از bDNA هم‌تیپ استفاده شد، تا بتوان تشخیص داد که آیا نتایج بدست آمده در حیوان آزمایشگاهی در حیوان هدف هم صدق می‌کند یا خیر؟

برخلاف هراث و همکاران که از یک نوع bDNA اما در دو غلظت متفاوت ۵ µg و ۱۰ µg استفاده کرده بودند، در پژوهش حاضر غلظت ثابت نگه داشته شد و مشابه مطالعه همایون و

همکاران، در مرحله فرمولاسیون ایمونوژن، از DNA به میزان ۵ µg بر میلی‌لیتر به باکتری غیرفعال شده به عنوان اجوانت اضافه گردید.

به طور کلی اکثر واکسن‌های باکتریایی مورد استفاده علیه *پاستورلا مالتوسیدا* ایمنی و محافظت کامل در برابر آلودگی با باکتری را ایجاد نمی‌کنند، در نتیجه تلاش‌های بیشتری برای گسترش و پیدایش واکسن‌های مناسب لازم است. هدف از این تحقیق تمرکز بر تولید واکسنی است که بتواند چشم انداز نوینی را برای مقابله و مبارزه با بیماری‌های تنفسی در گوسفند ایجاد کند. نتایج این پژوهش نشان داد که واکسن FIA-AbDNA محرک بسیار خوبی برای سیستم ایمنی گوسفند می‌باشد و آنتی‌بادی در سطوح بالا تولید می‌نماید.

به نظر می‌رسد، از جمله عواملی که باعث ایجاد مشکل در تولید واکسن علیه *پاستورلا مالتوسیدا* می‌شود، تنوع آنتی‌ژنی و مطالعات محدود در رابطه با توالی ژنومی این باکتری باشد. موفقیت برای توسعه واکسن به طور عمده بستگی به دسترسی به چندین توالی ژنوم از گونه‌های مختلف باکتری دارد (۱۳).

بررسی‌های انجام شده در جمعیت نشخوارکنندگان مبتلا به ذات الریه در مراکش، غلبه *پاستورلا مالتوسیدا* نوع A را نشان داد. به نظر می‌رسد نشخوارکنندگان کوچک بیشتر از گاو تحت تأثیر قرار می‌گیرند. از آن جایی که سویه‌های جدا شده از گوسفند برای موش‌ها و خوکچه هندی بسیار بیماری‌زا هستند و حتی می‌توانند در عرض چند ساعت باعث مرگ و میر حیوان شوند، موش می‌تواند یک مدل جایگزین برای انجام آزمایش‌های گسترده و بررسی کارایی واکسن‌های آزمایشی باشد.

جداسازی *پاستورلا مالتوسیدا* S14 باعث ایجاد علائم و ضایعات مشخصی در گوسفند گردید. این سویه نیز می‌تواند به عنوان کاندید واکسن برای محافظت از جمعیت نشخوارکنندگان کوچک در برابر عفونت ناشی از *P. multocida* استفاده شود (۱۴). با توجه به گستردگی شیوع *پاستورلا* در طیف وسیعی از حیوانات مستعد، یافتن اجوانت‌های ایمن و مؤثر برای افزایش ایمنی‌زایی در حیوانات علیه بیماری‌های پاستورلوز ضروری است.

ارزیابی سایتوکاین‌ها از جمله روش‌های اصلی برای بررسی فعالیت ایمنی سلولی می‌باشد. همچنین برای بررسی قدرت اجوانت DNA باکتریایی در تحریک ایمنی سلولی، لازم است تکثیر سایتوکین‌ها مورد ارزیابی قرار گیرد. توالی CpG باعث القای سایتوکین‌های التهابی و ایمونوگلوبولین‌ها می‌شود. سایتوکاین‌های تخصصی مانند اینترفرون گاما (IFN-γ) و تومور نکروز فاکتور آلفا (TNF-α) سایتوکین‌های مهمی برای تحریک پاسخ‌های ایمنی پس از واکسیناسیون هستند. در این پژوهش ارزیابی سایتوکاین TNF-α بر روی نمونه‌های سرم و کشت سلول لنفوسیت پس از واکسیناسیون با *پاستورلا مالتوسیدا* در گروه‌های مختلف انجام شد و نتایج پژوهش حاضر نشان داد که غلظت سایتوکین‌های سرمی نسبت به کشت سلولی در اکثر گروه‌ها بیشتر بود. با مقایسه تیتر سایتوکاین‌های کشت سلولی و سرم و تشابه بسیار زیاد در نتایج به‌دست‌آمده در گوسفند و موش (۲۶)، نتیجه‌گیری کلی این است که با توجه به سهولت دسترسی به سرم حیوانات می‌توان میزان سایتوکاین‌ها را از روی نمونه سرم اندازه‌گیری نمود. به دلیل هزینه پایین‌تر و دسترسی راحت‌تر جایگزین کردن اندازه‌گیری سطح سرمی سایتوکین‌ها به جای کشت سلولی در پژوهش‌های آینده نیز پیشنهاد می‌گردد.

IFN-γ از سایتوکین‌های کلیدی مرتبط با پاسخ‌های ایمنی است. سلول‌های T CD8+ ماکروفاژها را فعال نموده و باعث تولید سایتوکین‌های Th1 به ویژه IFN-γ می‌شوند. IL-12 به طور عمده توسط سلول‌های عرضه کننده آنتی‌ژن و Th1 تولید می‌شود. IL-12 تولید IFN-γ را تقویت می‌کند و باعث تمایز سلول‌های Th1 می‌شود (۳۸). لذا در مطالعات پیش رو اندازه‌گیری میزان IFN-γ و IL-12 نیز پیشنهاد می‌گردد.

در اثر فعال شدن ایمنی سلولی و نقش سلول فاگوسیت کننده، واکنش حساسیت تأخیری (DTH) ایجاد می‌شود که نوعی آسیب بافتی است. استفاده از آزمون DTH به عنوان یک روش مناسب در تشخیص واکنش‌های ایمنی سلولی کاربرد دارد و بطور معمول به‌عنوان بخشی از واکنش‌های سلولی در ایمنی علیه باکتری‌ها محسوب می‌شود. پاسخ‌های DTH نسبت به

برخی از میکروب‌ها اغلب توسط سلول‌های T سیتوتوکسیک ایجاد می‌شود. سلول‌های سیتوتوکسیک T ماکروفاژها را فعال نموده و باعث تولید سایتوکین‌های Th1 به‌ویژه IFN-γ می‌شوند. TNF-α نیز یکی از سایتوکین‌های ضروری برای پاسخ‌های DTH است. با توجه به نقش کلیدی سایتوکین‌های IFN-γ و TNF-α در پاسخ‌های DTH، پیشنهاد می‌شود در مطالعات بعدی علاوه بر اندازه گیری سایتوکاین های IFN-γ و TNF-α، آزمون DTH نیز بررسی گردد. بررسی این سایتوکاین‌ها همراه با آزمون DTH می‌تواند نشان دهنده فعالیت ایمنی سلولی باشد و نقش ایمونوژن در تحریک و القای پاسخ‌های ایمنی سلولی به صورت تخصصی مورد ارزیابی قرار گیرد.

نتیجه‌گیری

در نهایت، یافته‌های ما نشان داد که اجوانت bDNA بر اساس موتیف‌های CpG جدید و کارآمد است و پاسخ ایمنی اختصاصی را در گوسفند تحریک می‌کند. واکسن غیرفعال شده *پاستورلا مالتوسیدا* همراه با اجوانت AbDNA قادر به آزادسازی TNF-α نیز می باشد. استفاده از DNA باکتریایی می‌تواند به کارایی واکسن‌های غیرفعال کمک کند و به عنوان یک محرک ایمنی عمل نماید. انتخاب اجوانت مناسب که ایمنی‌زایی آنتی‌ژن را افزایش دهد، یکی از مراحل مهم در توسعه واکسن است و طراحی واکسن‌های قوی باعث ایجاد یک پاسخ ایمنی شدید، طولانی مدت و بسیار اختصاصی در برابر پاتوژن مورد نظر می‌گردد. درنتیجه استفاده از واکسن‌های غیرفعال شده همراه با اجوانت DNA باکتریایی به‌عنوان یک جایگزین مناسب برای واکسن‌های زنده پیشنهاد می‌گردد، زیرا می‌تواند به همان هدف که تحریک ایمنی هومورال و سلولی است، دست یابد.

ملاحظات اخلاقی

نویسندگان تمام نکات اخلاقی شامل: عدم سرقت ادبی، عدم تحریف داده‌ها، داده‌سازی و عدم انتشار دوگانه را در این مقاله رعایت کرده‌اند.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از زحمات سرکار خانم دکتر معصومه حیاتی در بخش بیولوژی مولکولی و جناب آقای مهندس صفر صادق‌زاده در بخش حیوانات موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی شیراز سپاسگزاری می‌گردد.

تعارض در منافع

وجود ندارد.

References

1. Kallili I, Ghadimipour R, Ghaderi R, Shokri GH, Jabbari AR, Razmaraii N, Ebrahimi M. Isolation, identification, and monitoring of antibiotic resistance in *Pasteurella multocida* and *Mannheimia haemolytica* isolated from sheep in East. Razi Vaccine and Serum Research Institute. 2016; 71(3): 153-160.
2. Kubutzky KF. *Pasteurella multocida* and immune cells. Microbiology and Immunology. 2012; 361: 53-72.
3. Orth JH, Aktories K. Molecular biology of *Pasteurella multocida* toxin. Curr Top Microbiol Immunol. 2012; 361: 73-92.
4. Guan L, Zhang L, Xue Y, Yang J, Zhao Z. Molecular pathogenesis of the hyaluronic acid capsule of *Pasteurella multocida*. Microb Pathog. 2020; 149: 104380.

5. Banu A, Lax AJ, Grigoriadis AE. In Vivo Targets of *Pasteurella Multocida* Toxin. Int J Mol Sci. 2020; 21(8): 2739.

6. Wilson BA, Ho M. *Pasteurella multocida*: from Zoonosis to Cellular Microbiology. Clinical Microbiology Reviews. 2013; 26(3): 631-55.

7. Zhu W, Fan Z, Qiu R, Chen L, Wei H, Hu B, Chen M, Wang F. Characterization of *Pasteurella multocida* isolates from rabbits in China. Vet Microbiol. 2020; 244: 108649.

8. Tahamtan Y, Homayoon M, Kargar M. The effect of homologous and heterologous Bacterial DNA on the development of immune responses against *Pasteurella multocida* in BALB / c mice. Journal of Microbial World. 2019; 12(2): 101-113 [In persian].

9. Mostaan S, Ghasemzadeh A, Sardari S, Shokrgozar MA, Nikbakht Brujeni G, Abolhassani M, Ehsani P, Asadi Karam MR. *Pasteurella multocida* Vaccine Candidates: A Systematic Review. Avicenna J Med Biotechnol. 2020; 12(3): 140-147.

10. Pak S, Valencia D, Decker J, Valencia V, Askaroglu Y. *Pasteurella multocida* pneumonia in an immunocompetent patient: Case report and systematic review of literature. Lung India. 2018; 35(3): 237-240.

11. Guo W, Lu , Liu L, Gong Z, liu l, weiNa G. Isolation, identification and virulence genes detection of *Pasteurella multocida* from chicken. Chines Veterinary Silence. 2017; 47(7): 890-896.

12. Su A, Tong J, Fu Y, Müller S, Weldearegay YB, Becher P, Valentin-Weigand P, Meens J, Herrler G. Infection of bovine well-differentiated airway epithelial cells by *Pasteurella multocida*: actions and counteractions in the bacteria-host interactions. Vet Res. 2020; 51(1): 140.

13. Ahmad AM. Efforts Towards the Development of Recombinant Vaccines Against *Pasteurella multocida*. Science World Journal. 2014; 9(2): 1-7.

14. Boumart Z, Bamouh Z, Semmate N, Tadlaoui KO, Harrak M. Biological Characterisation and Pathogenicity of a *Pasteurella multocida* Isolate from Sheep in Morocco. Journal of Agricultural Science and Technology. 2021; 11: 53-64.

15. 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.

16. Dagleish MP, Christopher Hodgson J, Ataei S, Finucane A, Finlayson J, Sales J, et al. Safety and Protective Efficacy of Intramuscular Vaccination with a Live aroA Derivative of *Pasteurella multocida* B:2 against Experimental Hemorrhagic Septicemia in Calves. Infection and Immunity. 2007; 75(12): 5837-44.

17. Gupta A, Chaphalkar SR. Vaccine Adjuvants: The Current Necessity of Life. Shiraz E-Med J. 2015; 16(7): e28061.

18. 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): 8163-71.

19. Petrovsky N, Aguilar JC. Vaccine adjuvants: current state and future trends. Immunol Cell Biol. 2004; 82(5): 488-96.

20. Kukkonen K, Kuitunen M, Haahtela T, Korpela R, Poussa T, Savilahti E. High intestinal IgA associates with reduced risk of IgE-associated allergic diseases. Pediatric allergy and immunology: official publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology. 2010; 21(1): 67-73.

21. Tang ML, Lahtinen SJ, Boyle RJ. Probiotics and prebiotics: clinical effects in allergic disease. Current opinion in pediatrics. 2010; 22(5): 626-34.

22. 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.

23. 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.

24. 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. Journal of Medical Microbiology. 2018; 67(9): 1383-1390.

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

26. Homayoon M, Tahamtan Y, Kargar M. The Comparison Detection of Cytokines (IL-6 and IL-12) from Spleen Cells and Serums in Balb/c Mice after Immunization with Killed *P. multocida* Vaccines Co-formulated with Bacterial DNAs as Adjuvant. Arch Clin Microbiol. 2020; 11(1): 103.

27. Borowski SM, Silva SC, Schrank I, Cardoso M. Toxin detection in *Pasteurella multocida* strains isolated from swine lungs in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. Arq Fac Vet. 2001; 29(2): 79-85.

28. Fischer G, Cleff MB, Dummer LA, Paulino N, Paulino AS, Vilela CO, Campos FS, Storch T, Vargas GD, Hu¨bner SO, Vidor T. Adjuvant effect of green propolis on humoral immune response of bovines immunized with bovine herpesvirus type 5. Vet Immunol Immunopathol. 2007; 116(1-2): 79-84.

29. Arous JB, Deville S, Pal JK, Baksi S, Bertrand F, Dupuis L. Reduction of Newcastle disease vaccine dose using a novel adjuvant for cellular immune response in poultry. Procedia in Vaccinology. 2013; 7: 28 -33.

30. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Cellular and molecular immunology, eighth edition. Elsevier Saunders. 2015; 51-265.

31. Silveira M, Vargas S, Mendonça M, Cunha CE, Hartwig D, Seixas A, et al. Xanthan gum enhances humoral immune response elicited by a DNA vaccine against leptospirosis in mice. BMC Proceedings. 2014; 8: 153.

32. 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.

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

34. Qureshi S, Saxena HM. Estimation of titers of antibody against *Pasteurella multocida* in cattle vaccinated with haemorrhagic septicemia alum precipitated vaccine. Veterinary World. 2014; 7(4): 224-8.

35. 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.

36. 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.

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

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