اثر مصرف خوراکی واکسن پروبیوتیک لاکتوکوکوس لاکتیس حامل آنتی‌ژن BLS بروسلا آبورتوس بر تغییرات نسبت لکوسیت‌های خون و CRP به عنوان بیومارکر در بروسلوز

زهرا فاتحی [۱](Ph.D Student)، عباس دوستی [۲*](Ph.D)، محمدسعید جامی [۱و۳](Ph.D)

۱- گروه زیست‌شناسی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

۲- مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

۳- مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، پژوهشکده علوم پایه سلامت، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۳۳۸۳۸۸۳۰ abbasdoosti@yahoo.com
تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۳/۲۷ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۰/۲۳

چکیده

هدف: واکسن‌های خوراکی در بیماری‌های عفونی که عامل آن‌ها از راه مخاط وارد بدن می‌شود، باعث القای مسیر ایمنی ذاتی خواهد شد. نسبت نوتروفیل به لنفوسیت (NLR) و نسبت پلاکت به لنفوسیت (PLR) به عنوان بیومارکرهای التهاب سیستمیک بروسلا ثبت شده است. هدف از پژوهش حاضر بررسی اثر مصرف خوراکی واکسن پروبیوتیک لاکتوکوکوس لاکتیس حامل آنتی‌ژن BLS بروسلا آبورتوس بر روی نسبت لکوسیت‌های خون به عنوان بیومارکرهای زیستی در موش‌های مبتلا به بروسلوز در مقایسه با گروه کنترل است.

مواد و روش‌ها: ۶۰ موش مبتلا به بروسلوز (چالش) و ۶۰ موش سالم (غیرچالش) وارد مطالعه شدند. گروه چالش به ۶ زیر گروه تقسیم شد و ۶ نوع مداخله اعم از ۱) *L. lactis*/pNZ8148-Usp45-BLS ۲) *L. lactis*- pNZ8148 ۳) *L. lactis*، IRIBA Vac ۴) pNZ8148 و ۵) PBS را در همه گروه‌ها به‌جز IRIBA Vac به‌صورت گاواژ به معده دریافت کردند. از سرم به منظور بررسی پارامترهای هماتولوژیکی استفاده شد. سطح پروتئین واکنشی C (CRP) اندازه‌گیری شد. تعداد نوتروفیل و لنفوسیت با استفاده از شمارش کامل سلول‌های خونی تعیین شد. PLR و NLR محاسبه شد.

یافته‌ها: در این مطالعه سطح CRP در موش‌های گروه چالش به طور قابل توجهی نسبت به گروه غیر چالش افزایش یافته است ($P<۰/۰۰۰۱$). موش‌های دریافت‌کننده واکسن خوراکی *L. lactis*/pNZ8148-Usp45-BLS قادر به مهار عفونت و کاهش غلظت CRP در سطح پایه بودند. موش‌های مبتلا به بروسلوز سطح NLR و PLR کم‌تری نسبت به گروه کنترل دارند، که پس از دریافت واکسن نوترکیب افزایش نسبت لکوسیت‌ها مشاهده گردید ($P<۰/۰۰۰۱$).

نتیجه‌گیری: موش‌های گروه چالش و گروه غیر چالش از نظر میزان PLR و NLR و هم‌چنین CRP تفاوت آماری معنی‌داری نشان دادند. این پارامترها می‌توانند نشانگرهای مفیدی در ارزیابی التهاب سیستمیک بروسلوز باشند.

واژه‌های کلیدی: بروسلوز، لکوسیت، CRP، واکسن خوراکی، کلونینگ، لاکتوکوکوس لاکتیس، بروسلا آبورتوس

مقدمه

بروسلا یک نوع باکتری کوکوباسیل، گرم منفی، کوچک، باریک و کوتاه است که در انسان موجب بیماری بروسلوز می‌شود [۱]. این بیماری با تب متناوب، سقط جنین، تعریق، ضعف، کم‌خونی، سردرد، افسردگی و دردهای عضلانی همراه است. عامل این بیماری گاهی به شکل باسیل و گاهی به شکل کوکسی مشاهده می‌شود. این باکتری‌ها به عنوان انگل درون سلولی اختیاری در سلول‌های مونوسیت تکثیر می‌شوند [۲]. بروسلا با استفاده از راه‌بردهای مختلف برای جلوگیری از فعال شدن پاسخ ایمنی میزبان قادر به زنده ماندن و تکثیر در سلول‌های میزبان است. این امر منجر به پیشرفت بیماری از مرحله حاد به بروسلوز مزمن خواهد شد. از آن‌جایی که هیچ واکسن انسانی تایید شده‌ای علیه این بیماری وجود ندارد و درمان همواره با خطر عود همراه است، افزایش دانش در مورد پاتوژنز، تشخیص و درمان بروسلوز به منظور مدیریت و کنترل این عفونت به ویژه در مناطق آندمیک حائز اهمیت است [۳]. نوتروفیل‌ها اولین سلول‌های سیستم ایمنی بدن انسان در مواجهه با باکتری بروسلا هستند [۴]. نسبت نوتروفیل به

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]

لنفوسیت (NLR) و نسبت پلاکت به لنفوسیت (PLR) و CRP به عنوان نشانگرهای التهاب شناسایی شده‌اند. استفاده از این بیومارکرها در بالین جهت بررسی وضعیت التهاب و شرایط سیستم ایمنی معمول است. شواهد علمی نشان می‌دهد که واکسیناسیون عامل بروسلوز را از بین برده یا غیرفعال می‌کند [۵]. رویکردهای سنجش ایمنی‌زایی، BLS (بروسلا لومازین سنتاز) (BLS) را به عنوان یک کاندید مناسب برای پیشرفت واکسن مبتنی بر زیرواحد پیش‌بینی می‌کنند [۶]. *BLS* به دلیل بیان بالا، خالص‌سازی ساده، جرم مولکولی پایین، ویژگی ادجوانتی و ایمنی‌زایی بالا، آنتی‌ژن مناسبی برای طراحی واکسن علیه بروسلوز است [۷]. سطوح مخاطی، مسیر ورودی برای بسیاری از پاتوژن‌ها هستند؛ برخی از گونه‌های LAB مانند *لاکتوکوکوس لاکتیس* که به عنوان پروبیوتیک شناخته می‌شوند و با تحریک سیستم ایمنی همراه هستند، به طور کلی بی‌خطر تلقی می‌شوند که این امر استفاده از آن‌ها را به عنوان حامل زنده بیولوژیکی به منظور واکسیناسیون خوراکی تایید می‌کند [۸]. این مطالعه با هدف استفاده از *L. lactis* به عنوان میزبان مناسب جهت تولید پروتئین نوترکیب BLS انجام شده و تاثیر بیان rBLS بر بیومارکرهای CRP، NLR و PLR را که در تشخیص تب مالت اهمیت دارند مورد سنجش قرار داد.

مواد و روش‌ها

الف) تجزیه و تحلیل In-vitro

۱. سویه‌های باکتریایی و محیط‌های کشت

مطالعه حاضر از نوع تجربی می‌باشد و روش گردآوری اطلاعات از نوع مطالعات کتابخانه‌ای و تجربیات آزمایشگاهی است. لازم به ذکر است که تمام کارهای پژوهشی این مقاله با رعایت کامل اصول اخلاقی (کد اخلاق: IR.IAU.SHK.REC.1401.004) انجام گرفته است. باکتری اشریشیاکلی سویه‌ی Top10 و لاکتوکوکوس لاکتیس PTCC1336 از مرکز منابع زیستی ایران برای این تحقیق تهیه شد. باکتری لاکتوکوکوس لاکتیس در براث M17 (Quelab، کانادا) در دمای ۳۰°C کشت داده شد. با استفاده از انکوباتور شیکردار، اشریشیاکلی سویه‌ی Top10 در LB براث (Merck، آلمان) در دمای ۳۷°C (۲۰۰ دور در دقیقه) رشد کرد. محیط آگار میکروبیولوژیکی (Merck، آلمان) برای ایجاد محیط آگار جامد در پلیت‌ها به هر یک از محیط‌ها با نسبت ۱٪/۵ اضافه شد.

۲. ساخت L. lactis/pNZ8148-Usp45-BLS

از وب‌سایت Addgene برای جمع‌آوری جزئیات وکتور بیانی مبتنی بر نیسین pNZ8148 و از Gene Runner نسخه ۶/۵ برای انتخاب مکان‌های برش آنزیم‌های محدودکننده استفاده شد. یک مبدأ همانندسازی (ORI)، یک ژن برای مقاومت به کلرامفنیکل، دو ژن برای پروتئین‌های تکثیر repA و repC ، یک پروموتر القایی توسط نیسین (P nisA)، و یک پایان‌دهنده رونویسی همگی در وکتور بیانی pNZ8148 گنجانده شدند. این وکتور به گونه‌ای ساخته شده است که توالی‌های کلون شده را در باکتری‌های گرم مثبت، به ویژه در گونه‌هایی از باکتری‌های اسید لاکتیک بیان کند. اندازه این وکتور بیانی مجموعاً ۳۱۶۷ است. سازواره نهایی با استفاده از قطعه ژنی *BLS* به طول bp477 با کد دسترسی Q2YKV1.1 و یک توالی سیگنال پپتیدی ۲۷ آمینواسیدی به نام Usp45 با کد دسترسی ABY84357 ایجاد شد. در نهایت، ژن همراه با سیگنال پپتید (Usp45-BLS) به طور مصنوعی در ناقل مبتنی بر نیسین pNZ8148 بین سایت‌های برش *KpnI* و *XbaI* توسط شرکت (Generay، چین) کلون شد.

۳. تایید کلونینگ ژن BLS در وکتور pNZ8148

برای تایید صحت کلونینگ، از تکنیک‌های واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)، هضم آنزیمی و تعیین توالی استفاده شد. با استفاده از پرایمرهای طراحی شده، PCR ژن BLS انجام و محصول روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز شد. با کمک آنزیم‌های محدودکننده *KpnI* و *XbaI*، وکتور بیانی نوترکیب توسط شرکت GENEray هضم شد. تعیین توالی نوکلئوتیدی ناقل نوترکیب توسط GENEray انجام شد.

۴. ترانسفورماسیون

با استفاده از روش الکتروپوریشن، پلاسمید نوترکیب pNZ8148-Usp45-BLS با موفقیت به سویه *L. lactis* انتقال یافت. به طور خلاصه، با استفاده از یک الکتروپوریتور X) (cell BIO-RAD Gene Pulser؛ چهار مرتبه پالس بهینه با ظرفیت: ۲۵ میکروفاراد، مقاومت: ۲۰۰ اهم، ولتاژ: ۲۵۰۰ ولت، زمان: ۴–۵ میکروثانیه، کووت ۰/۴ به کووت حاوی باکتری لاکتوکوکوس لاکتیس و وکتور نوترکیب (۶ میکرولیتر با غلظت ۰/۲ میکروگرم بر میکرولیتر) و کووت حاوی باکتری و وکتور فاقد ژن هدف (۶ میکرولیتر با غلظت ۰/۲ میکروگرم بر میکرولیتر) داده شد. سوسپانسیون باکتری لاکتوکوکوس لاکتیس بر روی محیط کشت M17Agar حاوی آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل (۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) کشت داده شد. به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۰°C انکوبه شد. ژن مقاومت به کلرامفنیکل در pNZ8148 برای انتخاب *L. lactis*/pNZ8148-Usp45-BLS ترانسفورم شده با وکتور نوترکیب استفاده شد که سپس با استفاده از پرایمرهای زیر توسط Colony-PCR شناسایی شد.

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]

Forward primer: 5′-ATGAATCAAAGCTGTCCAAATAAAAC-3′.
Reverse primer: 5′-TTAAACAAGAGCAGCAATACGTGAAC-3′.

PCR در شرایط بهینه انجام شد که شامل دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۴°C به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ مرحله دناتوراسیون در دمای ۹۴°C به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال پرایمر در دمای ۵۳°C به مدت ۱ دقیقه و طویل‌سازی در دمای ۷۲°C به مدت ۱ دقیقه بود. سپس طویل‌سازی نهایی در دمای ۷۲°C به مدت ۵ دقیقه انجام گرفت.

ب) تجزیه و تحلیل In-vivo

۱. آماده‌سازی لاکتوکوکوس لاکتیس برای ایمن‌سازی

در محیط M17 حاوی ۱٪ گلوکز و ۵ میکروگرم کلرامفنیکل (Sigma–دانمارک) در هر میلی‌لیتر در دمای ۳۰°C بدون شیکر، سویه‌های *L. lactis*/pNZ8148 (باکتری حاوی ناقل خالی) به عنوان شاهد و لاکتوکوکوس لاکتیس حاوی pNZ8148-Usp45-BLS رشد کردند. پس از بلوغ رشد به چگالی نوری ۰/۱ در ۶۰۰ نانومتر، سوسپانسیون باکتری دو بار در PBS استریل و سرد شست‌وشو داده شد و سانتریفیوژ (۴۰۰۰g در ۴°C) گردید. باکتری‌های جمع‌آوری شده در بافر واکسیناسیون (۰/۲ مولار بی‌کربنات سدیم، ۵٪ هیدرولیز کازئین، و ۰/۵٪ وزنی بر حجم گلوکز) در دوز 5×10^{10} CFU/mL به صورت معلق درآمدند [۹].

۲. حیوانات و روش تجویز

در این مطالعه از ۱۲۰ موش ماده BALB/c با وزن ۱۵ تا ۲۰ گرم و سن ۶ تا ۸ هفته استفاده شد. واکسیناسیون خوراکی با ۱۰۰ میکروگرم pDNA، pNZ8148-Usp45-BLS به حیوانات تجویز شد. ۱۰۰ موش به پنج گروه ۲۰ تایی تقسیم شدند و PBS به ۲۰ موش اضافی به عنوان کنترل منفی تجویز گردید. جدول ۱ تعداد موش‌های مورد استفاده در هر گروه را نشان می‌دهد. از نیسین برای تحریک بیان سویه‌های کنترل و نوترکیب *L. lactis* استفاده شد. به یک گروه ۲۰ موش، ۱۰۸ واحد تشکیل‌دهنده کلنی (CFU) از *L. lactis* pNZ8148-Usp45-BLS سه بار با پیپت خوراکی داده شد. ۳ دوره‌ی سه روزه تیمار پیاپی با فاصله ۱۵ روز (روزهای ۰–۲، ۱۴–۱۶، و ۲۸–۳۰) انجام شد.

۳. آزمون چالش

برای آزمایش چالش در مجموع ۱۰ موش از هر گروه دو هفته پس از مصرف دوز آخر واکسن (روز ۵۲) در معرض 10^4CFU از باکتری *B. abortus* سویه‌ی ۲۳۰۸ به صورت داخل صفاقی قرار گرفتند. موش‌های آلوده ۴ روز بعد (روز ۵۶) طبق توصیه‌های (PLoS Bio 8(6)، e1000412، 2010) کشته شدند و نمونه‌های خون در شرایط آسپتیک گرفته شد، سانتریفیوژ انجام و از سرم به منظور بررسی برخی فاکتورهای هماتولوژیکی و بیوشیمیایی استفاده شد.

جدول ۱. گروه‌بندی موش‌ها و زمان بندی مداخله

شماره گروه	ترکیب تجویزی	تعداد موش	میانگین وزن موش (گرم)	نوع مداخله	زمان مداخله	روز مداخله
۱	L. lactis /pNZ8148-Usp45-BLS	۲۰	۱۸,۷±۰,۲	خوراکی	هر ۸ ساعت به مدت ۳ روز	۰-۲، ۱۴-۱۶، ۲۸-۳۰
۲	L. lactis /pNZ8148	۲۰	۱۸,۵±۰,۶	خوراکی	هر ۸ ساعت به مدت ۳ روز	۰-۲، ۱۴-۱۶، ۲۸-۳۰
۳	L. lactis	۲۰	۱۸,۶±۰,۴	خوراکی	هر ۸ ساعت به مدت ۳ روز	۰-۲، ۱۴-۱۶، ۲۸-۳۰
۴	IRIBA Vac	۲۰	۱۸,۳±۰,۸	تزریق زیرجلدی	هر ۸ ساعت به مدت ۳ روز	۱، ۱۴، ۲۸
۵	pNZ8148	۲۰	۱۸,۶±۰,۷	خوراکی	هر ۸ ساعت به مدت ۳ روز	۰-۲، ۱۴-۱۶، ۲۸-۳۰
۶	PBS	۲۰	۱۸,۷±۰,۹	خوراکی	هر ۸ ساعت به مدت ۳ روز	۰-۲، ۱۴-۱۶، ۲۸-۳۰

۵. خون‌گیری و بررسی پارامترهای هماتولوژیکی و بیوشیمیایی

پس از بی‌هوش‌سازی با اتر، خون‌گیری مستقیم از قلب انجام گرفته و سرم نمونه‌ها پس از سانتریفیوژ با دور ۵۰۰۰g به مدت ۱۵ دقیقه تهیه و به منظور بررسی برخی پارامترهای بیولوژیکی و هماتولوژیکی مانند CRP، تعداد لنفوسیت‌ها، تعداد نوتروفیل‌ها و تعداد پلاکت‌ها در اختیار آزمایشگاه تشخیص طبی قرار گرفت. شمارش سلول‌های خونی

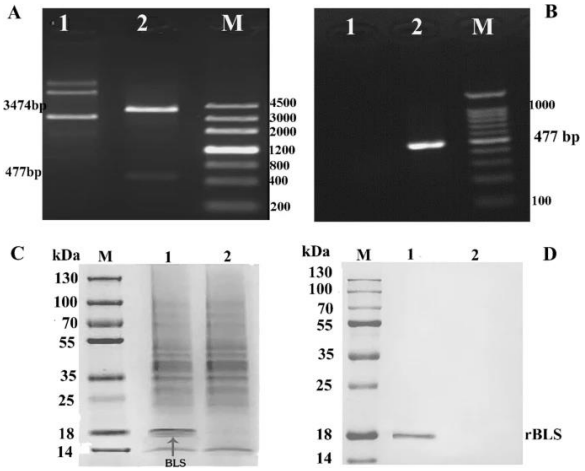
[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]

به‌وسیله‌ی دستگاه اتوماتیک H1 صورت گرفت. سپس نسبت پلاکت به لنفوسیت (PLR) و نسبت نوتروفیل به لنفوسیت (NLR) محاسبه شد.

نتایج

۱. تایید **pNZ8148-Usp45-BLS** ترانسفورم شده در ***L. lactis***

با استفاده از کلنی PCR و ارزیابی هضم آنزیمی دوگانه با دو آنزیم محدودکننده *KpnI* و *XbaI*، پلاسمید نوترکیب pNZ8148-Usp45-BLS تایید شد. پس از هضم آنزیمی دوگانه قطعه *BLS* به صورت یک باند ۴۷۷bp با استفاده از الکتروفورز جدا شد تا اطمینان حاصل شود که پلاسمید نوترکیب با موفقیت تولید شده است (شکل ۱).



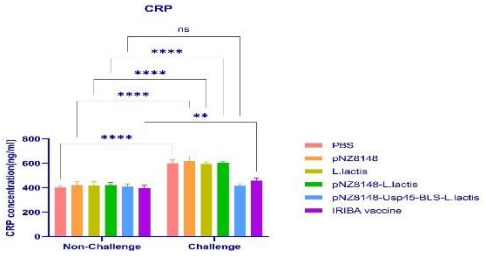
شکل ۱. A ۱: پلاسمید نوترکیب قبل از هضم آنزیمی، ۲: هضم آنزیمی دوگانه باند ۴۷۷bp ژن همراه با سیگنال پپتید، M: مارکر 1Kb (Geneaid Biotech Ltd، تایوان). B ۱: L. lactis ترانسفورم شده با ناقل فاقد ژن هدف، ۲: بیان ژن BLS در سطح mRNA و تشکیل باند ۴۷۷bp در L. lactis ترانسفورم شده با ناقل نوترکیب، M: مارکر۱۰۰bp (سیناکلون، ایران). C: الکتروفورز SDS-PAGE مخلوط پروتئین L. lactis به همراه پروتئین نوترکیب. ۱: باکتری L. lactis با استفاده از وکتور نوترکیب pNZ8148-Usp45- BLS ترانسفورم شده است، ۲: باکتری L. lactis توسط ناقل فاقد ژن هدف که پروتئین مورد نظر را بیان نمی‌کرد ترانسفورم شده است. M: مارکر پروتئینی ۱۴ تا ۱۳۰ کیلو دالتون (سیتومتین ژن، ایران). D: بررسی وجود پروتئین نوترکیب در باکتری L. lactis ترانسفورم شده با استفاده از وسترن بلات. ۱: باکتری L. lactis ترانسفورم شده با وکتور نوترکیب pNZ8148-Usp45-BLS، ۲: باکتری L. lactis ترانسفورم شده با ناقل فاقد ژن هدف، M: مارکر پروتئینی ۱۴ تا ۱۳۰ کیلو دالتون (سیتومتین ژن، ایران).

۲. بیان **pNZ8148-Usp45-BLS/ *L. lactis*** نوترکیب در سطح **mRNA** و پروتئین

RT-PCR برای اندازه‌گیری سطح نسبی الگوی بیان تحویل ژن BLS استفاده شد. باند bp477 روی ژل آگارز نشان می‌دهد که ژن هدف رونویسی شده است (شکل B1). آنالیزهای SDS-PAGE و وسترن‌بلات علاوه بر این نشان داد که پروتئین مد نظر تولید می‌شود. گروه هدف پروتئین *BLS* را با اندازه ۱۸ کیلو دالتون تولید کرد، همان‌طور که با بیان آنتی‌ژن در SDS-PAGE مشهود است، اما گروه کنترل این پروتئین را بیان نکرد (شکل C1). در شکل D1، نمونه‌هایی از *L. lactis* ترانسفورم شده با وکتور نوترکیب *L. lactis*/pNZ8148-Usp45-BLS و باکتری‌های ترانسفورم شده با وکتور فاقد ژن هدف (pNZ8148) نیز تحت بررسی وسترن‌بلات قرار گرفت.

۳. آنالیز تیتر **CRP**

تیتر CRP در ۲ گروه قبل و بعد از چالش اندازه‌گیری شد. در تمام زیر گروه‌های غیر چالش پس از انواع مداخله‌ها طبق جدول ۱ غلظت CRP ثابت و در حد پایه ۴۰۰۰ng/ml ماند. هیچ گونه تغییر معنا داری در زیر گروه‌های غیر چالش مشاهده نشد. زیرگروه‌های چالش نسبت به غیر چالش تغییر معناداری را در غلظت CRP نشان دادند. در زیر گروه‌های PBS، pNZ8148، *L. lactis*، *L. lactis*-pNZ8148 گروه چالش تغییرات غلظت CRP بسیار بالا بود ($P<۰/۰۰۰۱$). غلظت CRP در زیرگروه *L. lactis*/pNZ8148-Usp45-BLS گروه چالش به سطح پایه خود، همتراز با گروه غیر چالش برگشت. این موضوع نشان‌دهنده این است که در بیماری بروسلوز سطح CRP افزایش پیدا می‌کند و از این فاکتور می‌توان به عنوان بیومارکر در تشخیص بیماری عفونی بروسلوز بهره برد. تجویز واکسن خوراکی *L. lactis*/pNZ8148-Usp45-BLS اثر بازدارندگی بر غلظت این بیومارکر داشت و باعث کاهش غلظت آن تا سطح پایه شد. کاهش غلظت CRP پس از تجویز IRIBA Vac در گروه چالش نسبت به زیر گروه‌های دیگر مشهود بود ($P<۰/۰۱$). اما اثرگذاری واکسن نوترکیب بسیار بیش‌تر است.

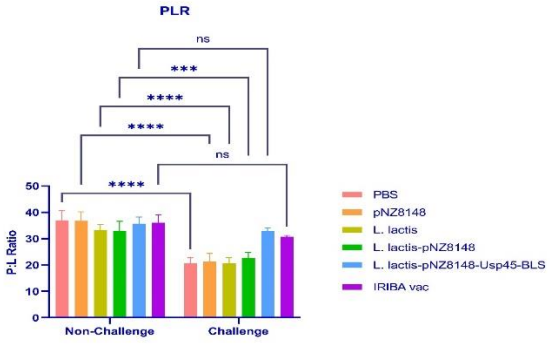


شکل ۲. غلظت پروتئین واکنشگر C در سرم زیر گروه‌های چالش و غیر چالش. PBS به عنوان شاهد استفاده شد. داده‌ها نشان دهنده میانگین± انحراف معیار است. *p<0.05، **p<0.01، ***p<0.001 و ****p<0.0001

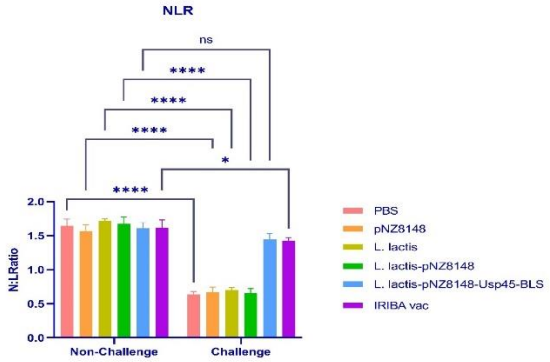
[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]

۴. آنالیز تیتر NLR و PLR

نسبت نوتروفیل به لنفوسیت و پلاکت به لنفوسیت در زیر گروه‌های ۲ گروه چالش و غیر چالش سنجیده شد. کاهش معنادار نسبت NLR و PLR در چهار زیر گروه چالش PBS، pNZ8148، *L. lactis* و *L.lactis*-pNZ8148 نسبت به میزان پایه در گروه غیر چالش مشاهده شد ($P<۰/۰۰۰۱$). زیر گروه دریافت‌کننده واکسن نوترکیب *L. lactis*/pNZ8148-Usp45-BLS از گروه چالش موفق به افزایش NLR و PLR تا حد پایه مشابه گروه غیر چالش گردید. گروه دریافت‌کننده واکسن IRIBA Vac نیز توانست PLR را به حد مطلوب پایه و NLR را تا نزدیک به حد پایه ($P<۰/۰۵$) افزایش دهد. این امر نشان‌دهنده این است که می‌توان از NLR و PLR به عنوان بیومارکر در تشخیص عفونت بروسلا استفاده کرد. از طرفی زیر گروه دریافت‌کننده واکسن خوراکی نوترکیب از گروه چالش با خاصیت ایمنی‌زایی مناسب خود موفق به افزایش نسبت NLR و PLR در مقایسه با سایر گروه‌ها شد.



شکل ۳. نسبت پلاکت به لنفوسیت (PLR) در سرم زیر گروه‌های چالش و غیر چالش. PBS به عنوان شاهد استفاده شد. داده‌ها نشان دهنده میانگین± انحراف معیار است. *p<0.05، **p<0.01، ***p<0.001 و ****p<0.0001



شکل ۴. نسبت نوتروفیل به لنفوسیت (NLR) در سرم زیر گروه‌های چالش و غیر چالش. PBS به عنوان شاهد استفاده شد. داده‌ها نشان دهنده میانگین± انحراف معیار است. *p<0.05، **p<0.01، ***p<0.001 و ****p<0.0001

بحث و نتیجه‌گیری

در پژوهش حاضر، ترانسفورم کردن باکتری *لاکتوکوکوس لاکتیس* با وکتور pNZ8148-Usp45-BLS به‌وسیله تکنیک الکتروپوریشن با موفقیت انجام شد. صحت بیان موفقیت‌آمیز ژن BLS در سطح RNA و پروتئین در باکتری پروبیوتیک *لاکتوکوکوس لاکتیس*، با کمک RT-PCR و SDS-PAGE تأیید شد. با توجه به مطالعات و پژوهش‌های انجام شده، از این وکتور ژنی می‌توان در انجام تحقیقات واکسن علیه تب مالت استفاده کرد. به منظور نظارت، تشخیص، کنترل و درمان بیماری، باید راه حل‌هایی ارائه شود که قابل اجرا در کشورهای فقیری که این بیماری در آن‌ها به یک مشکل جدی تبدیل شده است، باشند. رقم ۵۰۰۰۰۰ مورد ابتلا در هر سال به طور متوالی در بررسی‌ها و مقالات تحقیقاتی ذکر می‌شود، با این حال تخمین زده می‌شود که این رقم بسیار بیش‌تر است. [۱۰]. برنامه واکسیناسیون علیه تب مالت به واکسن‌های خوب نیاز دارد. دو واکسن زنده، *B. melitentis* Rev. 1 و *B. abortus* S19 در دهه‌های گذشته با موفقیت زیادی برای کنترل بروسلوز نشخوارکنندگان کوچک و گاو در سراسر جهان استفاده شده‌اند. *B. abortus* RB51 نیز به عنوان یک واکسن برای بروسلوز گاوی پیشنهاد شده است، اما هیچ یک از واکسن‌های موجود کامل نیستند. آن‌ها باعث سقط جنین در حیوانات هدف و غیرهدف می‌شوند، می‌توانند توسط حیوانات واکسینه شده دفع شوند و همه آن‌ها باعث تب مالت در انسان شوند. در نتیجه ما به واکسن‌های مؤثر جدیدی نیاز داریم که برای حیوانات و جامعه بشری بی‌خطر باشند [۱۱].

خاورمیانه شیوع بالایی از تب مالت دارد، و به دلیل هزینه‌های زیاد مرتبط با تجارت گاو، واکسیناسیون به شدت توصیه می‌شود تا از این بیماری اجتناب شود [۱۲]. رویکردهای جدید واکسیناسیون با اهدافی چون؛ به حداکثر رساندن ایمنی محافظتی، به حداقل رساندن عوارض جانبی، حمل و نقل ایمن، تجویز ساده، و هزینه‌های تولید و تحویل کم می‌تواند مسائل ایمنی و خطرات را کاهش دهد و بر معایب سویه‌های زنده ضعیف شده بروسلا که در حال حاضر برای محدود کردن بروسلوز استفاده می‌شود، غلبه کند. استراتژی‌های واکسیناسیون نسل جدید به مکان‌یابی و استفاده از پروتئین‌های ایمونوژنیک جدید بروسلا برای ایجاد واکسن‌های نوترکیب جدید بستگی دارد [۱۳].

در دوره اخیر شناخت وسیع در زمینه ژنتیک منجر به توسعه چندین سیستم بیان ژن بر پایه *لاکتوکوکوس لاکتیس* شده است. بسیاری از ابزارهای ژنتیکی گسترده شده و ژنوم کامل *لاکتوکوکوس لاکتیس* اخیراً تعیین توالی شده است؛

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]

بنابراین دست‌کاری ژنتیکی آن برای محققان آسان‌تر می‌شود. چندین پروتئین هترولوگ تولید شده توسط لاکتوکوکوس لاکتیس شامل مولکول‌های گزارشگر، آنتی‌ژن‌های ویروسی، یوکاریوتی و باکتریایی، اینترلوکین، آلرژن، فاکتورهای بیماری‌زایی، باکتریوسین‌ها و آنزیم‌ها هستند. تولید بالای پروتئین‌های هترولوگ در لاکتوکوکوس لاکتیس بسته به هدف مورد مطالعه با استفاده از پروموترهای القایی یا ساختمانی لاکتوکوکی حاصل شده است. پروموترهای القایی در زمینه‌های صنعتی کاربرد بیش‌تری دارند. در صورت وجود محرک در محیط این پروموترها بیان پروتئین را آغاز می‌کنند [۱۴].

اکثر میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا چرخه عفونی خود را از سطوح مخاطی شروع می‌کنند. بنابراین، اگر کلنی‌زایی و نفوذ ارگانیسم‌های عفونی در این نقطه متوقف شود، عفونت رخ نمی‌دهد. به همین دلیل، باید واکسنی برای ارتقای محافظت سلولی و مخاطی ایجاد شود. بر اساس تحقیقات کنونی، باکتری‌های اسید لاکتیک (LAB) یکی از موثرترین گزینه‌ها برای ایجاد واکسن‌های مخاطی هستند، زیرا می‌توانند هنگامی که به عنوان یک ناقل زنده برای آنتی‌ژن‌ها استفاده شوند، ایمنی مخاطی را فعال کنند. هدف کار حاضر معرفی *Lactococcus lactis* به عنوان یک ایمونوتراپی ذاتی مفید و غیر بیماری‌زا و تولید پروتئین محرک سیستم ایمنی ذاتی rBLS-Usp45 به عنوان جایگزینی برای سیستم تولید *E. coli* به دلیل مزایای آن است [۱۵].

Akbari و همکاران در سال ۲۰۱۹ بیان کردند که بروسلا لومازین سنتاز (BLS) یک پروتئین بسیار ایمنی‌زا با خواص کمکی است که به عنوان یک آنتی‌ژن موثر برای ساخت واکسن معرفی شده است. این پروتئین هم‌چنین نقش مهمی در القای سیستم ایمنی دارد. این مطالعه با هدف شبیه‌سازی، بیان و خالص‌سازی ژن BLS از *بروسلا ملیتنسیس* Rev1 انجام شد. ژن *BLS* در وکتور pTZ57R/T کلون شد. سپس به وکتور بیان pET32(a)+ منتقل شد. وکتور بیان نوترکیب حاوی توالی کدکننده BLS به میزبان *E. coli* BL21 (DE3) منتقل شد و بیان آن با ۰/۱ میلی‌مولار IPTG تحریک شد. نتایج توالی‌یابی نشان داد که هیچ جهشی در توالی کدکننده BLS وجود ندارد. نتایج بیان با تعیین توالی تنظیم شد و با استفاده از الکتروفورز ژل دودسیل سولفات–پلی آکریل آمید سدیم (SDS-PAGE) و وسترن‌بلات که نوار پروتئین ۱۸ کیلو دالتون را به طور مناسب نشان داد، تأیید شد. نتایج این مطالعه درستی روش کار مطالعه ما را تایید می‌کند [۱۶].

در مطالعه Tirbakhsh و همکاران در سال ۲۰۲۳ وکتور نوترکیب pNZ8148 به همراه ژن و سیگنال پپتید (pNZ8148-Usp45-*omp25*) طراحی و سنتز گردید. باکتری *E. coli* سویه TOP10 با وکتور بیانی pNZ8148-Usp45-*omp25* مبتنی بر القا توسط نیسین ترانسفورم شد. با استفاده از کیت استخراج پلاسمید، از باکتری‌های ترانسفورم شده پلاسمید نوترکیب استخراج گردید. ترانسفورماسیون باکتری پروبیوتیک لاکتوکوکوس لاکتیس با وکتور pNZ8148-Usp45-*omp25*، توسط روش الکتروپوریشن انجام گرفت. بررسی بیان ژن *omp25* در سطح RNA، به روش رونوشت برداری معکوس و تایید حضور پروتئین نوترکیب *omp25* در باکتری مهندسی شده با روش SDS-PAGE، ارزیابی شد [۱۷].

PMNها اجزای ضروری سیستم ایمنی ذاتی هستند که به کنترل عفونت‌های میکروبی اختصاص داده شده‌اند و اولین لکوسیت‌هایی هستند که در مکان‌های اولیه تهاجم میکروارگانیسم آزاد می‌شوند. PMNها هم‌چنین عوامل اولیه سلولی در پاسخ ایمنی ذاتی هستند و در تنظیم ایمنی اکتسابی نیز نقش دارند. PMNهای بالغ از مغز استخوان به خون محیطی و سیستم فاگوسیتی تک هسته‌ای و زیر غشاهای مخاطی مهاجرت می‌کنند. نیمه عمر PMNها متغیر است و از نزدیک به ۶ ساعت تا ۶ روز است و به شرایط مختلف بستگی دارد. شرایطی مانند مکان آن‌ها در بافت، که شامل مغز استخوان، سیستم رتیکولواندوتلیال، اندام‌های لنفاوی، و خون ممکن است طول عمر PMNها را طولانی یا کوتاه کند [۱۸].

با بررسی یافته‌های پژوهشگران دیگر (موارد اشاره شده در بالا) به خوبی نشان داده می‌شود که مثال‌های متعددی از این دست در مورد نتایج مثبت واکسن‌های خوراکی وجود دارد. در مطالعه ما، وکتور pNZ8148-Usp45-BLS سنتز و تایید نهایی شده است و از این وکتور می‌توان در انجام تحقیقات واکسن علیه تب مالت استفاده کرد. با توجه به سنتز وکتور pNZ8148-Usp45-BLS و ترانسفورم کردن موفقیت‌آمیز باکتری *لاکتوکوکوس لاکتیس* به‌وسیله الکتروپوریشن و بیان BLS در این باکتری پروبیوتیک، با تکیه بر خاصیت آنتی‌ژنیسیته بالای محصول این ژن، به نظر می‌رسد می‌توان از BLS در مطالعات واکسن‌های زیرواحدی ژنتیکی علیه تب مالت استفاده کرد. هم‌چنین به‌دلیل استفاده از سیستم زنده بیولوژیکی یعنی باکتری پروبیوتیک *لاکتوکوکوس لاکتیس* برای انتقال آنتی‌ژن مورد نظر به عنوان واکسن به موجود زنده، بسیاری از مشکلات واکسن‌های سنتی و قدیمی حل شده و

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]

چشم‌انداز روشنی از واکسن‌های نوترکیب خوراکی را خواهیم داشت.

تشکر و قدردانی

این مقاله دست‌آورد پایان‌نامه دکتری است. پژوهشگران و نویسندگان این مقاله بر خود لازم می‌دانند مراتب تقدیر و تشکر خود را از همکاران مرکز بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، که ما را در به ثمر رساندن این تحقیق یاری کردند، به آگاهی برسانند. هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان بیان نشده است.

منابع

[1] Sing A, editor. Zoonoses-Infections affecting humans and animals: Focus on public health aspects. Springer; 2014 Dec 8.
https://doi.org/10.1007/978-94-017-9457-2

[2] Amjadi O, Rafiei A, Mardani M, Zafari P, Zarifian A. A review of the immunopathogenesis of Brucellosis. Infect Dis 2019; 51: 321-333.
https://doi.org/10.1080/23744235.2019.1568545
PMid:30773082

[3] Kurmanov B, Zincke D, Su W, Hadfield TL, Aikimbayev A, Karibayev T, et al. Assays for identification and differentiation of Brucella species: A review. Microorganisms 2022; 10: 1584.
https://doi.org/10.3390/microorganisms10081584
PMid:36014002 PMCid:PMC9416531

[4] Burn GL, Foti A, Marsman G, Patel DF, Zychlinsky A. The neutrophil. Immunity 2021; 54: 1377-1391.
https://doi.org/10.1016/j.immuni.2021.06.006
PMid:34260886

[5] Rezaei M, Rabbani-Khorasgani M, Zarkesh-Esfahani SH, Emamzadeh R, Abtahi H. Prediction of the Omp16 Epitopes for the development of an Epitope-based vaccine against Brucellosis. Infect Disord Drug Targets 2019; 19: 36-45.
https://doi.org/10.2174/1871526518666180709121653
PMid:29984663

[6] Ribeiro LA, Azevedo V, Le Loir Y, Oliveira SC, Dieye Y, Piard JC, Gruss A, Langella P. Production and targeting of the Brucella abortus antigen L7/L12 in Lactococcus lactis: a first step towards food-grade live vaccines against brucellosis. Appl Environ Microbiol 2002; 68: 910-916.
https://doi.org/10.1128/AEM.68.2.910-916.2002
PMid:11823235 PMCid:PMC126665

[7] Badmasti F, Habibi M, Firoozeh F, Fereshteh S, Bolourchi N, Goodarzi NN. The combination of CipA and PBP-7/8 proteins contribute to the survival of C57BL/6 mice from sepsis of Acinetobacter baumannii. Microb Pathog 2021; 158: 105063.
https://doi.org/10.1016/j.micpath.2021.105063
PMid:34166729

[8] Liu X, Qi L, Lv J, Zhang Z, Zhou P, Ma Z, et al. The immune response to a recombinant Lactococcus lactis oral vaccine against foot-and-mouth disease virus in mice. Biotechnol Lett 2020; 42: 1907-1917.
https://doi.org/10.1007/s10529-020-02900-6
PMid:32385744 PMCid:PMC7210100

[9] Bermúdez-Humarán LG, Langella P, Cortes-Perez NG, Gruss A, Tamez-Guerra RS, Oliveira SC, et al. Intranasal immunization with recombinant Lactococcus lactis secreting murine interleukin-12 enhances antigen-specific Th1 cytokine production. Infect Immun 2003; 71: 1887-1896.
https://doi.org/10.1128/IAI.71.4.1887-1896.2003
PMid:12654805 PMCid:PMC152106

[10] O'callaghan D. Human brucellosis: recent advances and future challenges. Infect Dis Poverty 2020; 9: 1-2.
https://doi.org/10.1186/s40249-020-00715-1
PMid:32703319 PMCid:PMC7376320

[11] Blasco JM. Control and eradication strategies for Brucella melitensis infection in sheep and goats. Prilozi 2010; 31: 145-165.

[12] Dorneles E, Sriranganathan N, Lage AP. Recent advances in Brucella abortus vaccines. Vet Res 2015; 46: 76.
https://doi.org/10.1186/s13567-015-0199-7
PMid:26155935 PMCid:PMC4495609

[13] Vishnu US, Sankarasubramanian J, Gunasekaran P, Rajendhran J. Novel vaccine candidates against Brucella melitensis identified through reverse vaccinology approach. Omics 2015; 19: 722-729.
https://doi.org/10.1089/omi.2015.0105
PMid:26479901

[14] D'Souza R, Pandeya DR, Hong ST. Lactococcus lactis: an efficient Gram positive cell factory for the production and secretion of recombinant protein. Biomed Res 2012; 23: 1-7.

[15] Rezaei M, Rabbani-Khorasgani M, Zarkesh-Esfahani SH, Emamzadeh R, Abtahi H. Lactococcus-based vaccine against brucellosis: IgG immune response in mice with rOmp16-IL2 fusion protein. Arch Microbiol 2021; 203: 2591-2596.
https://doi.org/10.1007/s00203-021-02241-6
PMid:33689001

[16] Akbari R, Sekhavati MH, Bahrami A, Majidzadeh Heravi R, Yousefi S. Production of brucella lumazine synthase recombinant protein to design a subunit vaccine against undulant fever. Arch Razi Inst 2019; 74: 1-6.

[17] Tirbakhsh Gouran S, Doosti A, Jami MS. Expression of brucella abortus Omp25 protein in lactococcus lactis probiotic bacteria. J Mazandaran Univ Med Sci 2023; 32: 16-31.

[18] Moreno E, Barquero-Calvo E. The role of neutrophils in brucellosis. Microbiol Mol Biol Rev 2020; 84: e00048-20.
https://doi.org/10.1128/MMBR.00048-20
PMid:33055283 PMCid:PMC7567297

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]

Koomesh -Volume 25, Issue 6 November and December 2023, 640-646

The effect of oral administration *Lactococcus lactis* probiotic vaccine carrying *Brucella abortus BLS* antigen on changes in blood leukocyte ratio and CRP as biomarkers in brucellosis

Zahra Fatehi (Ph.D Student)[1], Abbas Doosti (Ph.D)[*2], Mohammad-Saeid Jami (Ph.D)[3,1]
1- Dept. of Biology, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran
2 - Biotechnology Research Center, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran
3- Cellular and Molecular Research Center, Basic Health Sciences Research Institute, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran

* Corresponding author. +098 9133838830 abbasdoosti@yahoo.com
Received:17 Jun 2023; Accepted: 13 Jan 2024

Introduction*:* Oral vaccines in infectious diseases, whose agents enter the body through the mucous membrane, will induce the innate immune pathway. The neutrophil-to-lymphocyte ratio (NLR) and platelet-to-lymphocyte ratio (PLR) have been documented as biomarkers of Brucella systemic inflammation. The purpose of this study is to investigate the effect of oral administration of the Lactococcus lactis probiotic vaccine carrying Brucella abortus BLS antigen on the ratio of blood leukocytes as biological biomarkers in mice with brucellosis compared to the control group.

Materials and Methods*:* 60 mice with brucellosis (challenged) and 60 healthy mice (non-challenged) were included in the study. The challenge group was divided into 6 subgroups and 6 types of intervention including 1) L. lactis/pNZ8148-Usp45-BLS, 2) L. lactis-pNZ8148, 3) L. lactis, 4) IRIBA Vac, 5) pNZ8148 and 6) PBS received by gastric gavage in all groups except IRIBA Vac. Serum was used to check hematological parameters. C-reactive protein (CRP) level was measured. The number of neutrophils and lymphocytes was determined using a complete blood cell count. PLR and NLR were calculated.

Results: In this study, the level of CRP in the mice of the challenge group increased significantly compared to the non-challenge group. (P<0.0001) The mice receiving oral vaccine *L. lactis*/pNZ8148-Usp45-BLS were able to inhibit the infection and reduce the concentration of CRP in They were basic level. Mice with brucellosis have lower levels of NLR and PLR than the control group, and after receiving the recombinant vaccine, an increase in leukocytes was observed (P<0.0001).

Conclusion: The mice of the challenge group and the non-challenge group showed a statistically significant difference in terms of PLR and NLR as well as CRP. These parameters can be useful markers in evaluating the systemic inflammation of brucellosis.

Keywords*:* Brucellosis, Leukocytes, CRP, Oral Vaccine, Cloning, *Lactococcus lactis, Brucella abortus*

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]