DOI: 10.22092/vj.2017.109869 شماره ۱۱۶ پاییز ۱۳۹۶

تحقیقات دامپزشکی و فرآورده های بیولوژیک

# مطالعه اثرات سرکوب‌گری باکتری *پاستورلا مولتی‌سیدا* B:۲ *(Pasteurella multocida)* بر روی لنفوسیت‌های گوساله

• **سعید عطائي کچوئي (نویسنده مسئول)**

استادیار بخش تحقیق و تشخیص بیماري هاي باکتریائي طیور، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازي رازي، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران.

• **محمدمهدي رنجبر**

استادیار بخش تحقیق و تشخیص بیماري هاي باکتریائي طیور، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازي رازي، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران.

• **صبا عطائي کچوئي**

دانشجوي سال آخر رشته سلولي مولکولي، دانشکده علوم زیستي، دانشگاه خوارزمي، کرج، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۲-۰۳-۱۳۹۵ تاریخ پذیرش: ۱۶-۰۶-۱۳۹۵

Email: s.ataei@rvsri.ac.ir

چکیده

**سپتی سمی هموراژیک، بیماری حاد گاو و گاومیش در کشورهای گرمسیری است که به وسیله کوکوباسیل گرم منفی به نام پاستورلا مولتی‌سیدا سروتایپ B:2 ایجاد می‌شود. شواهد آزمایش پیشین بر روی گاو، دال بر سرکوب پاسخ ایمنی پس از چالش بوده و در مطالعه حاضر جهت بررسی مقدماتی یافته مذکور، آزمایش‌های in-vitro با استفاده از عصاره پاستورلا و سلول‌ها ي تك هسته‌اي خون محیطی (PBMC) گاوی طراحی گردید تا آثار احتمالی سرکوب‌گری جزء یا اجزائی از باکتری بر لنفوسیت‌های گاوی بررسی شود. از آزمایش سنجش تحریک تکثیر لنفوسیتی به منظور ارزیابی آثار عصاره عاري از سلول (CFE) پاستورلا بر روی PBMC استفاده شد. سپس ماده ConA به کشت سلول‌های مورد نظر اضافه و پاسخ تکثیری آن‌ها با استفاده از روش شمارش آشکارسازی به‌وسیله ارزیابی فعالیت تایمیدین رادیواکتیو استفاده گردید. به علاوه جهت شناسایی اولیه عامل سرکوب‌گر موجود در عصاره از روش‌های حرارت دادن، دیالیز، و تهیه پروتئین غشای خارجی (OMP) استفاده گردید. نتایج نشان داد افزودن عصاره CFE با غلظت ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر باعث کاهش پنج برابری پاسخ تکثیری سلول‌های PBMC به ConA می شود. حرارت دادن عصاره CFE در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد به مدت پنج دقیقه فعالیت سرکوب‌گری آن را به طور کامل از بین برد. OMP فعالیت سرکوب‌گری مشابه با عصاره نشان داد. این مطالعه حاکی از وجود اثر سرکوب‌گری جزء یا اجزائی از باکتری *پاستورلا مولتی‌سیدا* بر پاسخ تکثیری PBMC به ConA بود. این جزء از باکتری دست کم در بخشی از ساختمان پروتئینی است و جزو پروتئین‌های غشای خارجی است.**

**کلمات کلیدی:** *پاستورلا مولتی‌سیدا*، سپتی سمی هموراژیک، سرکوب، PBMC، گاو

● Veterinary Researches & Biological Products No 116 pp: 53-62

The Study of Suppressive Effects of ***Pasteurella multocida*** B:2 on Calf Lymphocytes

*By: Ataei Kachoei, S., (Corresponding Author) Asisstant Prefossor, Department of Poultry Bacterial Diseases, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organisation (AREEO), Tehran, Iran; Ranjbar, M. M., Asisstant Prefossor, Department of Poultry Bacterial Diseases, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organisation (AREEO), Tehran Iran; Ataei Kachoei, S., Student BSc, Scientific Biology Faculty, Kharzmi University, Karaj, Iran.*

Received: 2016-06-01 Accepted: 2016-09-06

Emali: s.ataei@rvsri.ac.ir

Haemorrhagic Septicaemia (HS) is an acute disease of cattle and buffaloes in tropical countries, caused by *Pasteurella multocida (P. multocida)* serotype B:2 , a Gram-negative coccobacillus. Some evidences of immunosuppression have been observed after a challenge with a virulent strain on vaccinated calves. To further investigate the observed suppressive effect, the present study was set up using a cell-free extract and calf PBMCs, for in vitro experiments. A lymphocyte stimulation assay was used to assess the effects of a cell-free extract (CFE) of *P. multocida* on peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), isolated from calves. To assess the proliferative response of PBMCs obtained from calf, ConA was added to the PBMCs culture, and the proliferation was quantified by assessment of radioactivity of absorbed 3H-Thymidine. In order to characterize the agent(s), the CFE extract suppressive activity was assessed after heating and dialyzing and also by using an outer-membrane protein (OMP) preparation in experiments. Results indicated that addition of CFE at 50 µg/ml caused a five fold decrease in the proliferative response to ConA. Heating at 80˚C for five min completely destroyed the suppressive properties. An outer membrane protein (OMP) preparation of *P. multocida* B:2 markedly suppressed the proliferative response of PBMCs to ConA. The study was indicative of a suppressive component(s) of *P. multocida* B:2 on proliferative response of calf PBMCs to ConA. The active part of the suppressive agent(s) was likely to be at least in some part of protein, and is of OMPs.

Key words: *Pasteurella multocida*, Hemorrhagic septicaemia, Suppression, PBMC, Cattle

**مقدمه**

پاتوژن‌های باکتریایی واجد توانایی اکتسابی جهت غلبه بر مکانیسم‌های دفاعی میزبان خود می‌باشند (۱). پاتوژن‌های گوناگون باکتریایی استراتژی‌های متفاوتی جهت مداخله در مکانیسم‌های سیستم ایمنی ذاتی و اختصاصی به کار گرفته‌اند (۲). عناصر و محصولات مختلف باکتریایی نقش‌های متفاوتی را در تعدیل واکنش‌های ایمنی میزبان بازی می‌کنند که اکثر آن‌ها این عمل را از طریق اثرات تحریکی خود انجام داده و بخش کوچکی نیز به واسطه اثرات مهاری‌شان بدین هدف نائل می‌آیند(۳). از سوی دیگر، از گذشته بیان شده است اگر هر بخشی از باکتری در صورتی که به طور مناسب از نظر زمان، دوز مصرفی و انتخاب آنتی‌ژنی به کار گرفته شود، می‌تواند اثرات سرکوب‌گری بر روی سیستم ایمنی را اعمال کند (۴). باکتری‌های گرم منفی بیماري‌زا ( نظیر سالمونلا، شیگلا، *سودوموناس ائروژینوزا*) قادر به ایجاد سپتی سمی و اندوتوکسمی در میزبان خود هستند و به‌واسطه سرکوب فاگوسیتوز و ایمنی سلولی بر روی سیستم ایمنی اثرات سرکوبی دارند.

پاستورلا مولتی سیدا یک کوکوباسیل گرم منفی است که از مهم‌ترین باکتری‌های پاتوژن دامی به حساب می‌آید (۵). سروتایپ‌های مختلف *پاستورلا مولتی‌سیدا* سبب گستره‌ی وسیعی از بیماری‌های مختلف در دام‌های اهلی و طیور می‌شوند (۶). سپتی سمی هموراژیک یک بیماری حاد در گاو و گاومیش در کشورهای گرمسیری است که با توانايي ایجاد سپتی سمی پیشرفته *پاستورلا مولتی‌سیدا* تیپ B۲ شناخته می‌شود (۷).

اثرات تعدیل گری ایمنی *پاستورلا مولتی‌سیدا* B۲ تا به حال به طور مناسبی مورد مطالعه قرار نگرفته است (۸) و مشخص شده است که پروتئين‌هاي غشاي خارجي (OMP) پاستورلا مولتی سیدا B۲ داراي فعاليت ضد فاگوسيتی است، زيرا قادر به اختلال در فرآيند فاگوسيتوز *کانديديا آلبيکنس* اپسونيزه شده توسط سلول‌های صفاقي موشی در in vivo بوده است. گفته شده که مکانيسم‌های ضدفاگوسيتی وابسته به OMP باعث افزايش حدت اورگانيسم می‌شود (۹).

پس از انجام مطالعات ارزيابي ايمني زايي واکسن آزمايشي *پاستورلا مولتی‌سیدا* بر روي گوساله شواهدي دال بر سرکوب پاسخ ايمني پس از چالش مشاهده گرديد (۱۰). از اين رو در مطالعه حاضر جهت بررسي مقدماتي يافته مذکور، آزمايش‌هاي in vivo با استفاده از عصاره *پاستورلا*

*مولتی‌سیدا* و لنفوسیت‌هاي PBMC گاوي طراحي گرديد تا آثار احتمالي سركوبگري جزء يا اجزائي از باكتري بر لنفوسيت‌هاي گاوي بررسي شود.

مطالعات اوليه بر روي ارزيابي ايمني‌زايي يك واكسن زنده آزمايشي پاستورلا بر روي گوساله نشان داد كه ارگانيسم پاستورلا مولتي سيدا مقاومت كامل در برابر سيستم عامل كمپلمان گوساله و خوكچه هندي دارد، به طوري كه عوامل فعال سيستم كمپلمان موجود در سرم گوساله ايمن با وجود توانايي كشتن اشرشيا كلي قادر به كشتن و يا مهار رشد پاستورلا مولتي سيدا نبود. بر اين اساس احتمال توانايي پاستورلا مولتي سيدا در مهار پاسخ ايمني اختصاصي از طريق كاهش توان پاسخگويي لنفوسيت‌ها در نظر گرفته شد. به منظور ارزيابي اين اثر احتمالي *پاستورلا مولتی‌سیدا* آزمايش in vitro طراحي گرديد، تا به‌وسيله آن تاثير احتمالي پاستورلا بر روي توان پاسخگويي لنفوسيت‌هاي گوساله به محرك‌هاي شيميايي نظير كونكاناوالين A (Concanavalin A) مورد ارزيابي قرار گيرد.

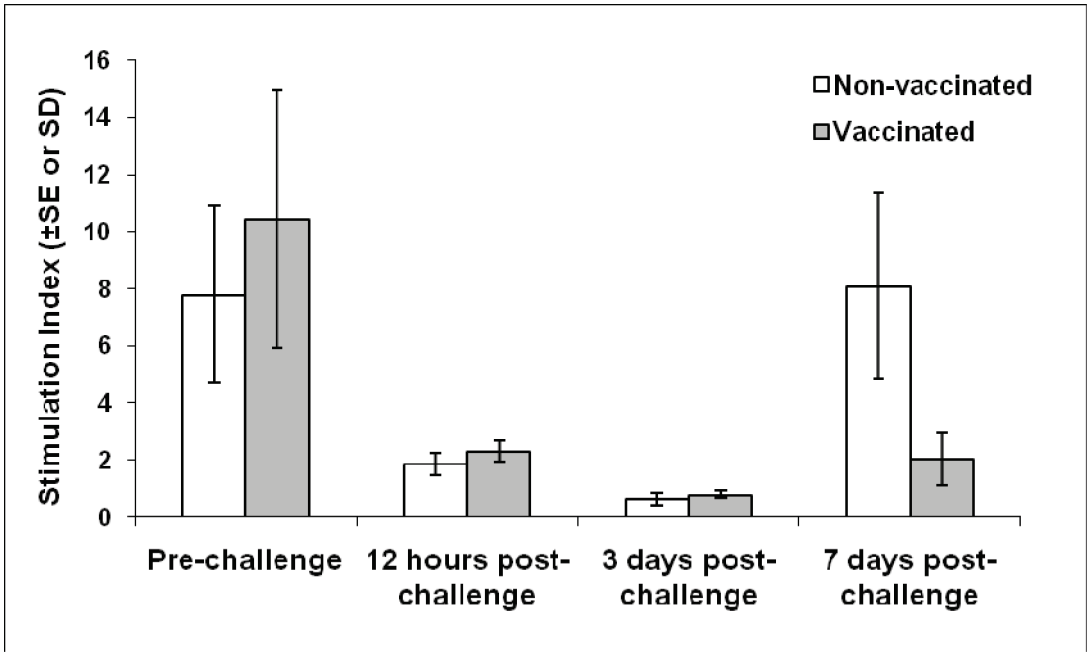
## مواد و روش‌ها

سويه‌های باکتری این مطالعه از مجموعه کشت‌های بخش عفونی و ایمنی دانشگاه گلاسکو انگلستان و انستیتو تحقیقات موردون تهیه گردید. سروتایپ B۲ *پاستورلا مولتی‌سیدا* یک جدایه مزرعه‌ای است. برای رشد *پاستورلا مولتی‌سیدا* از محیط عصاره قلب و مغز (BHI,Oxoid) استفاده شده و محیط کشت برای ۱۶ تا ۱۸ ساعت در ۳۷ سانتی‌گراد نگهداری گردید. CFE از*پاستورلا مولتی‌سیدا* با سونیکاسیون سوسپانسیون غلیظ باکتری در PBS (Phosphate Buffered Saline) به همراه سرد کردن متناوب بر روی یخ به دست آمد. لیزات حاصل در ۳۰۰۰ g برای ۳۰ دقیقه در ۴ درجه سانتی گراد سانتریفوژ شده و مایع رویی از طریق غشای منفذ دار ۰/۲ میکرومتر ( Sartorius Co ) پالایش گردید. غلظت پروتئین با استفاده از روش تغییریافته لوری (Modified Lowry procedure) تعیین گردید.

آماده‌سازی پروتئین غشایی OMP به‌وسیله روش استخراج سارکوزیل (Sarkosyl) براساس روش کار دیویس و همکاران انجام گردید (۱۱). سپس کپسول پلی‌ساکاریدی جدا گردیده و تغلیظ به واسطه روش کارتر (۱۲) انجام شد.

PBMCهاي جداشده به روش شیب جداسازي فایکول در فواصل منظم از گوساله‌های کنترل و واکسینه شده با سویه JMRT۱۲ پاستورلا مولتی سیدا در سن چهار هفتگی (۱۰۸ واحد کلنی‌ساز (CFU) که به صورت عضلانی تزریق شده بود) و بعد از چالش از هر دو گروه پنج راسي گوساله‌های ۲۸ روزه با سویه حاد (۱۰۹ واحد کلنی‌ساز که به صورت زیرپوستی تزریق شده بود) اخذ گردید.

سلول‌ها با روش بوش (۱۳) با برخی تغییرات جداسازی شد و با




**شکل ۱- پاسخ تکثیری لنفوسیت ها به ConA پس از چالش با پاستورلا مولتی سیدا B:2.**
**نتایج نشان دهنده میانگین شاخص های تحریک (SI) گوساله ها در گروه‌های مختلف است. میله های خطا ( Error bar ) نشان دهنده میانگین خطای استاندارد (standard error of the mean یا SEM) یا میانگین خطای انحراف (standard deviation of the mean یا SDM) است.**

غلظت نهایی $۱ \times ۱۰^{۶}$ سلول در میلی‌لیتردر محیط مکمل RPMI با ۱۰ درصد سرم جنین گاوی با حرارت غیر فعال شده، و دو میلی مولار از ال-گلوتامین (Gibco Co.)، ۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر پنی سیلین، ۱۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر استرپتومایسین ، ۰/۵ درصد (w/v) نیستاتین، یک درصد (w/v) جنتامایسین و ۳۰ میلی‌مولار بافر هپس ( Sigma Co. ) وارد شد.

تست سنجش تحریک لنفوسیت بر اساس روش بهبودیافته بوش (۱۴) انجام شد. نمونه در سه تکرار حاوی $۲ \times ۱۰^{۵}$ سلول PBMCs در یک پلیت ۹۶ خانه‌ای ته صاف با ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر آنتی‌ژن یا پنج میکروگرم در میلي‌ليتر ConA (Sigma Co.) مخلوط شدند و یا به عنوان کشت‌های کنترل در حجم کلی ۲۰۰ میکرولیتر تهیه شدند. پلیت‌ها در ۳۷ درجه سانتی گراد در فضاي مرطوب انکوباتور $CO_2$ (v/v) پنج درصد و ۹۵ درصد هوا براي سه روز نگهداري گرديدند. در روز سوم نگهداری، با افزودن ۳۷ کیلو بکورل (Amersham Co-Methyl $^{3}H$ thymidine) به هر گوده در۲۰ میکرولیتر از محیط RPMI، و انکوباسیون برای ۱۸ ساعت قبل از برداشت جهت شمارش آشکارسازی (Scintillation counting) نگهداری شدند. شاخص تحریک (Stimulation index-SI) به صورت شمارش در هر دقیقه (cpm) سلول‌هاي تيمار شده تقسيم بر cpm سلول‌هاي تيمار نشده محاسبه گرديد. جهت بررسی اثرات مهاری پاستورلا مولتی سیدا B:۲ بر روی پاسخ تکثیری PBMC ها به ConA، غلظت مورد نیاز از عصاره CFE ابتدا به چاهک‌ها اضافه گردید و به دنبال آن، نگهداری PBMCها برای یك ساعت در انکوباتور $CO_2$ قبل از اضافه کردن ConA انجام شد. سپس بررسی پاسخ تکثیری PBMCها به روش ذکر شده در بالا انجام گرفت.

## نتایج

### تحريك لنفوسيت‌هاي جداسازي شده با CFE و ConA در گوساله‌هاي تحت چالش

عصاره CFE پاستورلا مولتوسیدا هیچ تاثیر تحریکي روي تکثیر PBMC های جداسازي از گوساله ها پس از مراحل مختلف واکسیناسیون نشان نداد. عصار CFE اثر تحريكي ناچيزي بر روي PBMC به دست آمده از گوساله‌ها پیش و پس از چالش نشان داد. PBMCهای به دست آمده از گروه‌هاي واكسينه و گروه شاهد پاسخ‌هاي مشابهي به عصار CFE نشان دادند (داده‌ها نشان داده نشده است). PBMCهاي جداشده از گوساله‌هاي واكسينه و گوساله‌هاي غير واكسينه (گروه شاهد) كه پيش از چالش نمونه‌برداري شدند، در پاسخ به ConA تكثير پيدا كردند. ميانگين شاخص تحريك (SI) در گروه شاهد ۳/۱ ± ۷/۸ و در گروه واكسينه ۴/۵۲ ± ۱۰/۴۵ محاسبه شد (شكل ۱). در هر دو گروه واكسينه و كنترل، شاخص تحريك در زمان ۱۲ ساعت پس از چالش به شدت كاهش يافت و در زمان سه روز پس از چالش، كاهش از اين نيز بيشتر شد. در حيوانات كنترل، هفت روز پس از چالش ميانگين شاخص تحريك به مقادير پيش از چالش افزايش يافته بود (ميانگين ۳/۵۲ ± ۸/۱ =SI )، اما در حيوانات واكسينه فقط به ميزان خيلي جزئي افزايش يافته بود (۰/۹۲ ± ۲/۰۵ =SI).

### سركوب آزمايشگاهي تكثير PBMCها

به منظور ارزيابي فعاليت مهاركنندگي عصاره CFE، سيستم آزمايشگاهي راه‌اندازي شد كه در آن، PBMC به‌دست آمده از گوساله‌هاي سالم پيش از تحريك با ConA ، توسط عصاره‌ي CFE تيمار مي‌شد. آزمايش‌هاي اوليه نشان داد كه غلظت مناسب عصاره در هر گوده ميزان ۱۰ ميكروگرم پروتئين است كه در آن PBMCها رشدي مشابه PBMCهاي تيمار نشده نشان دادند (شكلA ۲). غلظت‌هاي پايين‌تر عصاره، احتمالا به دليل مواد غذايي موجود در آن‌ها، ميزان تكثير را افزايش داد. از سوي ديگر، عصاره در غلظت‌هاي بسيار بالا اثرات نامطلوب بر روي رشد PBMCها گذاشت.

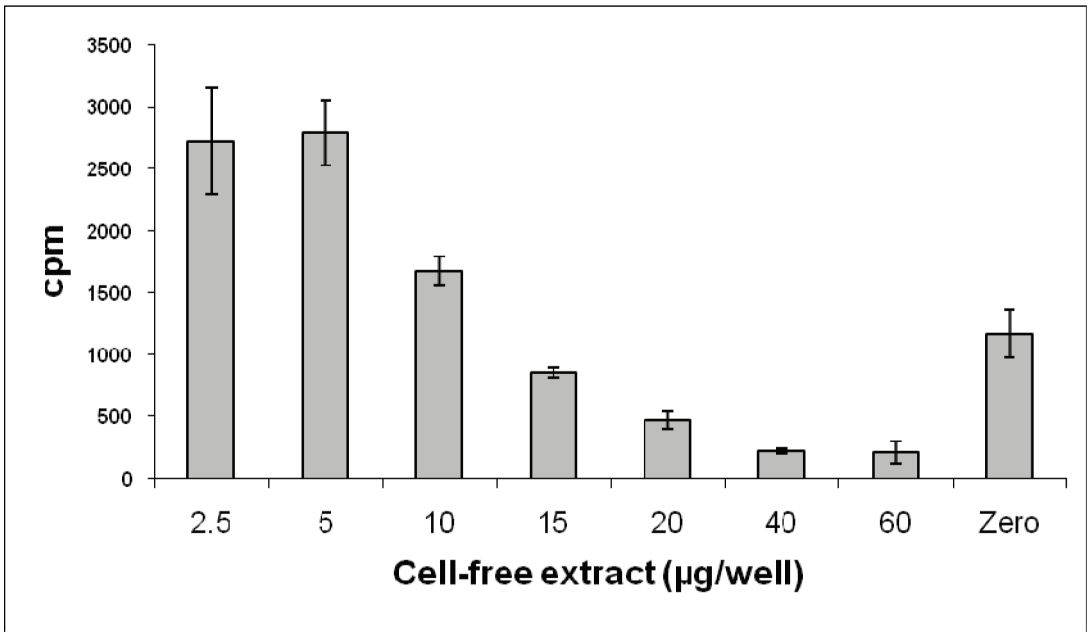
استفاده از غلظت‌هاي مختلف ConA نشان داد كه غلظت‌هاي بين ۰/۵ تا دو ميكروگرم در هر گوده براي تحريك قوي PBMC مناسب بود (شكلB ۲). شكل ۲ همچنين نشان مي‌دهد كه افزودن عصاره در تمامي غلظت‌ها (پنج، ۱۰ و ۲۰ ميكروگرم در گوده) يك ساعت پيش از افزودن ConA، اثر تحريكي ConA را در غلظت يک ميكروگرم در گوده سركوب كرد. همچنين آزمايشات بعدي نشان داد كه عصاره CFE پاسخ تكثيري PBMC به ConA (۳/۶ ± ۱۰۱/۹ =SI) را به شدت سركوب كرد (۳/۱ ± ۲۹/۳ =SI) (شكل ۳). اين فعاليت سركوب‌گري در شرايط آزمايشگاهي به اين شرح رخ داد كه سلول‌ها يك ساعت پيش از افزودن ConA، به مدت يك ساعت با غلظت ۱۰ ميكروگرم در گوده عصاره CFE نگهداري شدند (كاهش سه تا پنج برابر). مجاورت PBMCها با عصاره CFE (۱۰ ميكروگرم براي هر گوده) باعث ايجاد ۱/۵ SI= گرديد كه اين امر نشان‌گر عاري‌بودن عصاره‌ي تهيه شده از هر نوع آثار سركوبي بر روي رشد PBMC است. براي انجام تمامي آزمايش‌هاي بعدي، شرايط بررسي شده‌ي آزمايش به صورت غلظت ۱۰ ميكروگرم در گوده عصاره CFE، يک ميكروگرم در گوده غلظت ConA و انكوباسيون يك ساعته سلول‌ها در مجاورت عصاره پيش از افزودن ConA در نظر گرفته شد.

### ويژگي آثار سركوب‌گري عصاره CFE پاستورلا مولتي سيدا بر قدرت تكثير PBMC

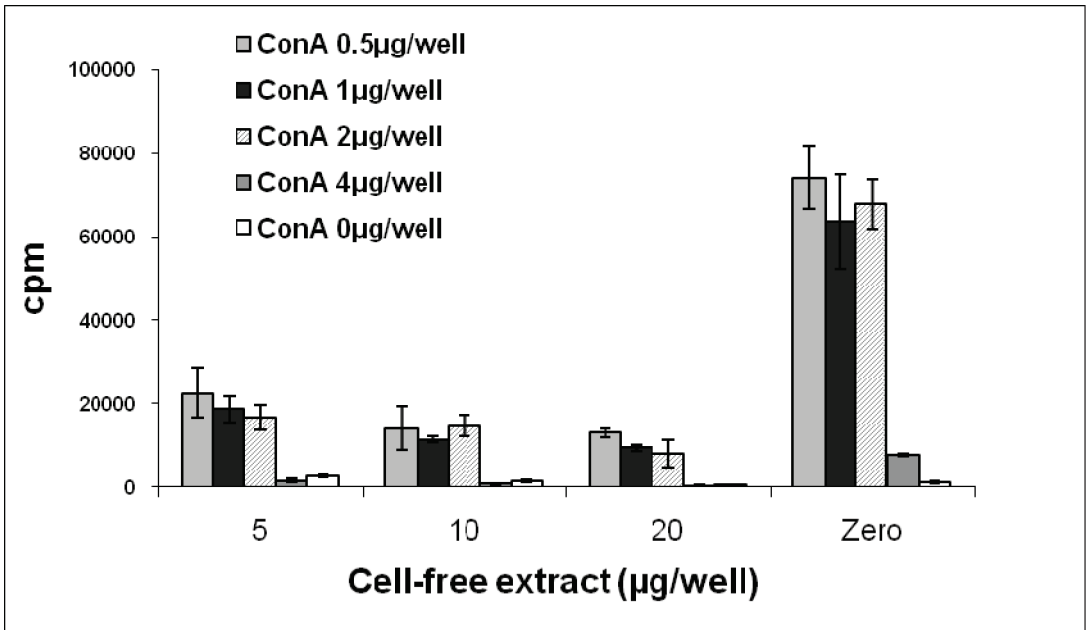
به منظور نشان دادن اختصاصي بودن اثر سركوب‌گري پاستورلا مولتي سيدا، از تعدادی از گونه‌هاي ديگر باكتري ها نيز عصاره تهيه و در آزمايش‌هاي مشابه استفاده گرديد (شكل ۴). همه عصاره به صورت مشابهي تهيه و غلظت پروتئين آن‌ها به ميزان ۱۰ ميكروگرم در گوده تنظيم شد. عصاره تهيه شده از استافيلوكوكوس ارئوس (شكلA ۴) و سروتيپ‌هاي A۱ و A۲ *منهميا هموليتيكا* (*Mannheimia haemolytica*) (شكلB ۴) تاثيري بر روي پاسخ تكثيري PBMC به ConA نداشت. عصاره تهيه شده از اشرشيا كلي (شكل A ۴) به ميزان ناچيزي پاسخ تكثيري به ConA را افزايش داد.

عصاره تهيه شده از *پاستورلا مولتي‌سيدا* سروتيپ D (جدايه خوكي) (شكلA ۴) پاسخ تكثيري PBMC گوساله‌ها به ConA را به شدت سركوب كرد. عصاره *پاستورلا مولتي‌سيدا* سروتيپ A۳ (جدايه ريوي گاو) (شكل A ۴) و *پاستورلا مولتي‌سيدا* A (جدايه ريوي گوسفند) (شكلB ۴) اثر سركوب‌گري به نسبت ناچيزتري در مقايسه با *پاستورلا مولتي‌سيدا* B۲ نشان داد. *پاستورلا مولتي‌سيدا* سروتايپ A (جدايه مرغي) (شكلB ۴) هيچ‌گونه اثر سركوب‌گري نشان نداد.

روي هم رفته، از بين گونه‌هاي مختلف تحت آزمايش فقط در برخي از جدايه‌هاي پاستورلايي قدري اثر سركوب‌گري مشاهده گرديد و در ساير




شکل (A)۲- اثر غلظت های مختلف عصاره CFE *پاستورلا مولتی‌سیدا* بر روی PBMCهای گوساله . میله‌ها نشان دهنده میانگین مقادیر (Mean values) گوده های سه تایی و میله های خطا نشان دهنده انحراف استاندارد (SD یا Standard deviation) می باشند.




شکل (B) ۲- اثر سرکوب‌گر غلظت های مختلف عصاره CFE پاستورلا مولتی سیدا بر قدرت تکثیری غلظت های مختلف ConA بر PBMC های گوساله

گونه‌ها این پدیده مشاهده نشد. تنها سویه‌اي که داراي اثر سرکوب‌گري مشابهي بر روي PBMC بود، *پاستورلا مولتي‌سيدا* سروتايپ D بود.

### مشخصات اجزای سرکوب‌گر پاستورلا مولتي سيدا

به منظور شناسايي بيشتر عوامل سرکوب‌گر موجود در عصاره CFE، تيمارهاي متفاوتي بر روي عصاره انجام شد و آثار سرکوب‌گري مطالعه گرديد (شكل ۵). دماي ۸۰ درجه سانتی‌گراد به مدت پنج دقيقه آثار سرکوب‌گري عصاره را به طور كامل از بين برد. پروتئين‌هاي غشاي خارجي (OMP) تهيه شده از پاستورلا مولتي سيدا B۲ به شدت پاسخ تكثيري PBMC به ConA را سركوب كرد (شكل A۵). بخش قابل توجهي از اثر سرکوب‌گري OMP تهيه شده از پاستورلا نيز توسط حرارت از بين رفت (شكل A۵). ديالیز عصاره با آستانه۱۰ كيلودالتون تاثيري بر اثر سرکوب‌گري آن نداشت (شكل A۵). كپسول پلي- ساكاريدي تهيه شده از پاستورلا هيچ‌گونه اثر سرکوب‌گري بر روي پاسخ تكثير PBMC بهConA نشان نداد. مايع رويي كشت ۱۸ ساعته پاستورلا در محيط مايع باعث افزايش پاسخ تكثيري PBMC بهConA گرديد (شكل A۵).

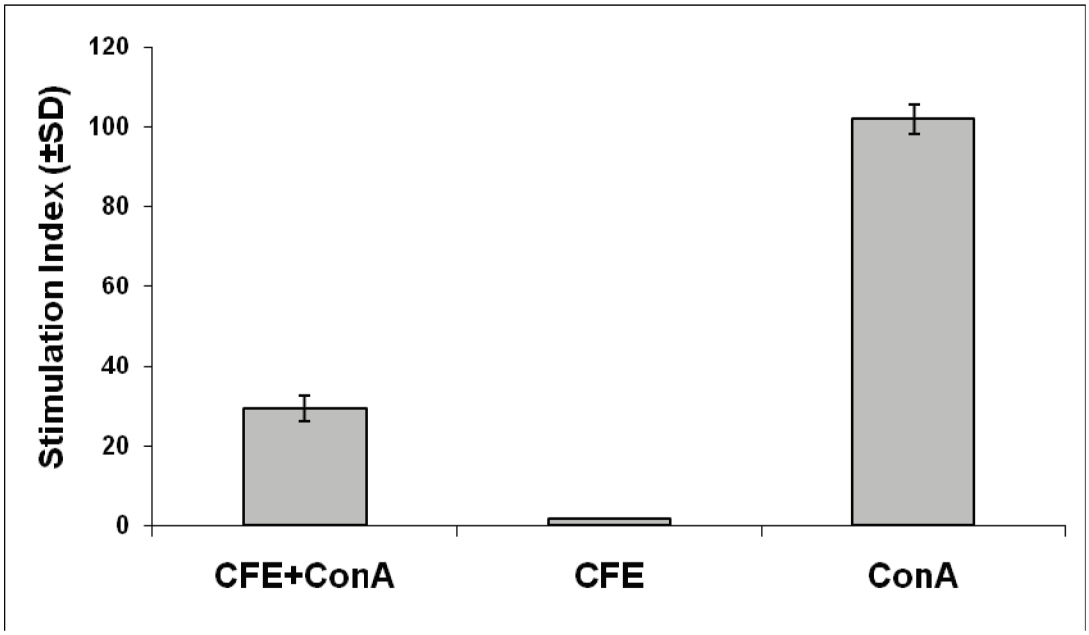
### اثر LPS بر روي پاسخ تكثيري PMBC به ConA

به منظور بررسي اثر LPS، PBMCهاي تهيه شده در آزمايش با LPS خالص شده‌اي از اشرشيا كلي نيز تيمار شد. LPS آثار هم‌افزايي در تحريك تكثير PBMC هنگام استفاده‌ي همزمان با ConA از خود نشان داد (شكل A۵). LPS در غلظت ۲۰۰ واحد در گوده هيچ‌گونه تاثيري بر پاسخ تكثيري PBMC به ConA نشان نداد (شكل B۵). در مقادير بالاتر، LPS باعث افزايش پاسخ تكثيري PBMC به ConA گرديد كه اين اثر تحريكي در غلظت ۲۰۰ هزار واحد در گوده به بالاترين ميزان ۱۵/۳۹ ± ۲۶۷/۰۷ (افزايش ۲/۸ برابري) رسيد.

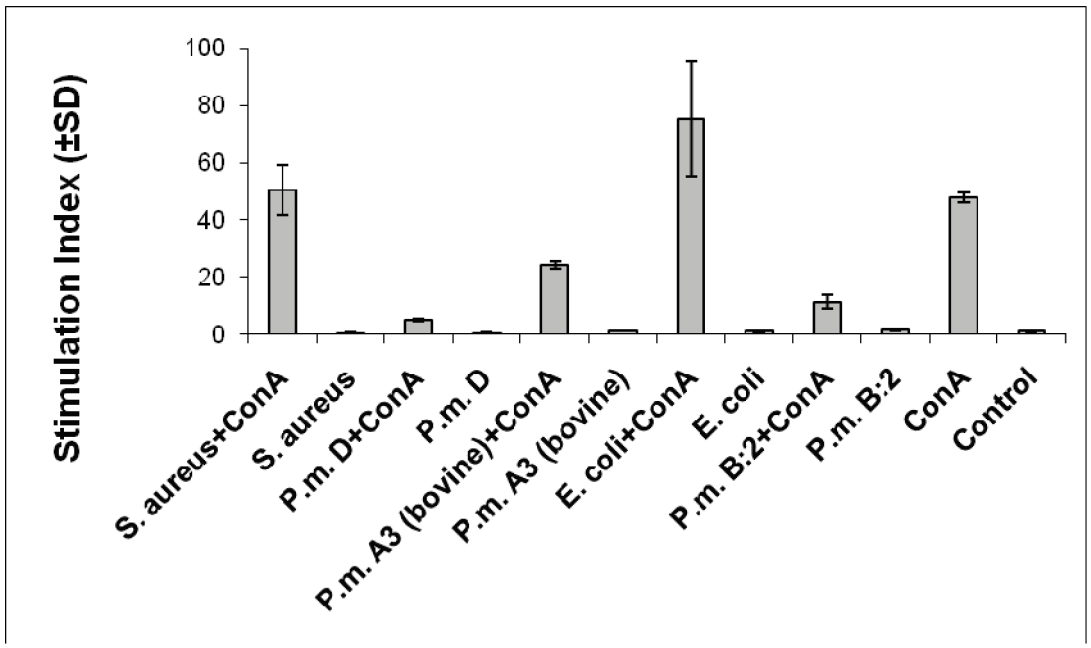
در اين غلظت LPS به تنهايي نيز افزايش ۲/۸ برابري را ايجاد كرد، ولي در غلظت‌هاي پايين‌تر، اثر قابل توجهي بر روي PBMC از خود نشان نداد. اين نتايج نشان داد كه LPS، حداقل نوع استخراج شده از اشرشيا كلي، هيچ نوع اثر تخريبي بر روي پاسخ تكثيري PBMC به ConA ندارد.

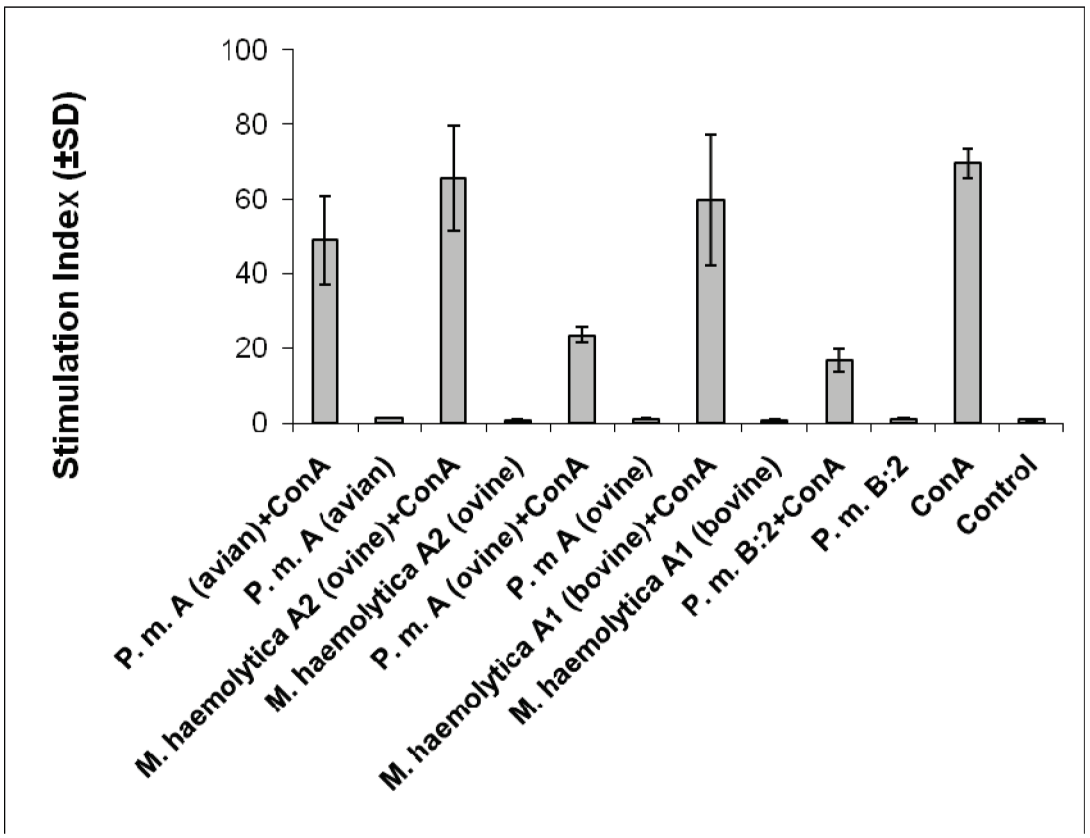
## بحث

نقش و نسبت مشاركت ايمني سلولي و هومورال در حفاظت طولاني مدت عليه سپتي سمي هموراژيك گاو و گاوميش تا به حال روشن نشده است. عموما اعتقاد بر اين است كه پاسخ‌هاي هومورال، عنصر اصلي در ايجاد محافظت ايمني است و نقش ايمني با واسطه سلولي نيز از طريق كنترل ايمني هومورال بخشي مهم از اين محافظت به حساب مي‌آيد (۱۵). در مطالعه حاضر، پاسخ‌هاي سلولي گروه‌هاي واكسينه و شاهد گوساله‌ها بعد از چالش مورد ارزيابي قرار گرفت. از روش سنجش تحريك لنفوسيتي جهت تخمين تاثير عصاره CFE به دست آمده از پاستورلا مولتي سيدا

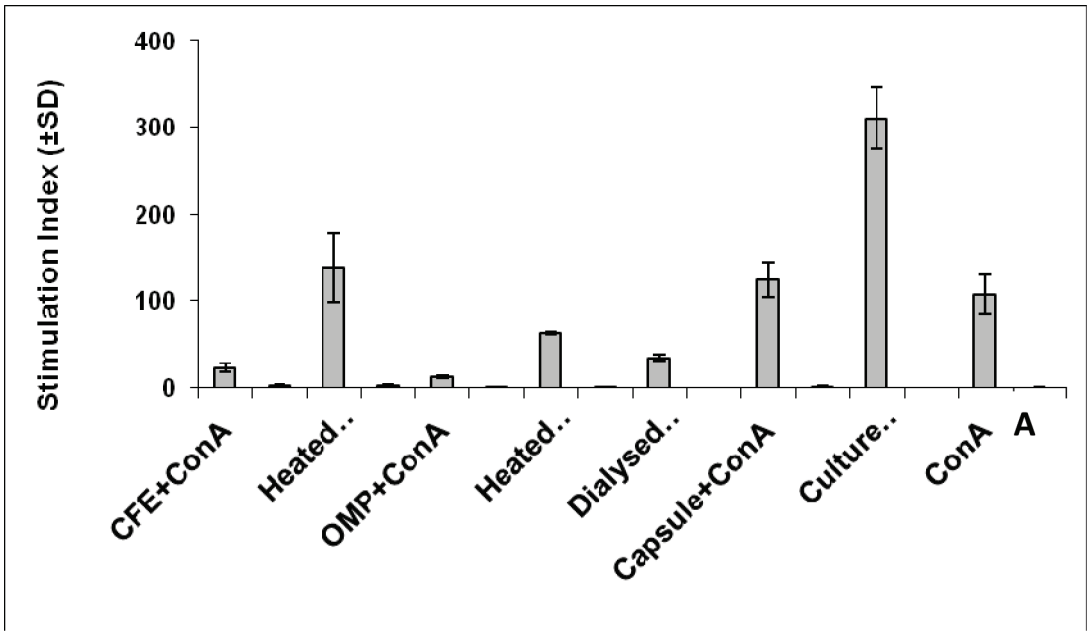


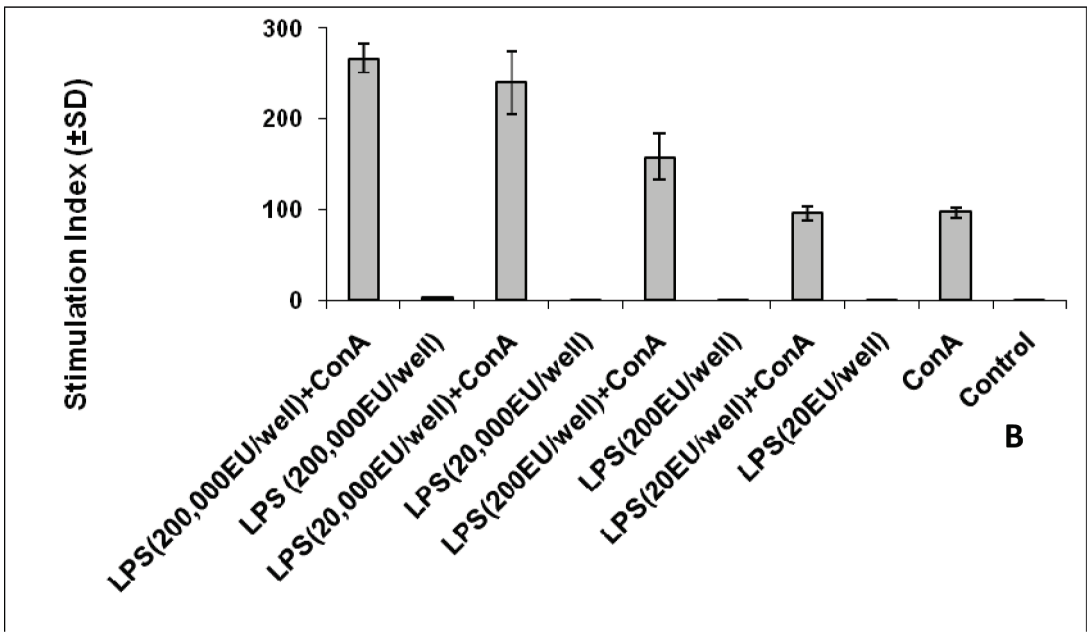

**شكل ۳- اثر عصاره CFE پاستورلا مولتی سیدا بر پاسخ تكثيری PBMC ها به ConA. میله ها نشان دهنده میانگین مقادیر كشت های سلول سه تایی و میله های خطا نشان‌گر انحراف استاندارد است.**




شکل ۴- اثر عصاره CFE گونه های باکتریایی مختلف بر پاسخ تکثیری PBMC ها به ConA. میله ها نماینده پاسخ تکثیری در حضور (سلول های تیمار شده) (۴A)و عدم وجود (سلول های تیمار نشده) (۴B) عصاره CFE تهیه شده از گونه های باکتریایی مختلف است. کشت های سلول به تعداد سه گوده برای هر تیمار تهیه و نتایج نمایش داده شده میانگین سه گوده است.




شکل ۵. اثر تیمارهای مختلف *پاستورلا مولتی‌سیدا* (A) و LPS (B) بر روی پاسخ تکثیری PBMC ها به ConA. میله ها نماینده میانگین نتیجه آزمایش بر روی سه گوده کشت سلول و میله خطا نمایشگر میانگین انحراف خطا است .

سروتیپ ۲:B بر روي PBMCهاي جداسازي شده از گوساله‌ها در زمان‌هاي مختلف پس از چالش استفاده شد.

عصاره CFE *پاستورلا مولتي‌سيدا* هيچ اثر تحريكي بر روي PBMC هاي جداسازي شده از گوساله‌هاي واكسينه و كنترل در مراحل مختلف بعد از چالش نشان نداد. فقدان تحريك‌پذيري PBMCها در اثر تماس با عصاره CFE ممكن است به سبب فقدان پاسخ سلولي باشد. به عبارت ديگر، اگر در حيوانات آلوده شده با *پاستورلا مولتي‌سيدا* يك پاسخ سلولي (تحريك سلولي) در طي هفته بعد از چالش وجود داشته باشد، PBMC هاي جداسازي شده مي‌بايست در حضور CFE (به عنوان آنتي‌ژن) تكثير شوند. هم‌چنين شايد قابل انتظار باشد كه PBMCها از گوساله‌هاي واكسينه مي‌بايست به حضور CFE پاسخ دهند، اما در عمل اين امر مشاهده نگرديد.

به دليل عدم امكان ادامه آزمايش‌ها بر روي دام، به منظور ادامه آزمايشات بر روي اثر سركوب‌گري *پاستورلا مولتي‌سيدا* بر روي پاسخ PBMC، تصميم گرفته شد كه آزمايش in vitro با به كارگيري عصاره پاستورلا كه حاوي تمامي اجزاي اورگانيسم باشد، ادامه يابد. براي اين منظور، سيستم آزمايش in vitro طراحي شد كه در آن PBMC به دست آمده از گوساله سالم پيش از اضافه كردن ConA به آن، با عصاره CFE تيمار گرديد. آزمايش‌هاي مقدماتي با به كار گيري غلظت‌هاي مختلف عصاره نشان داد كه ميزان ۱۰ ميكروگرم در هر گوده غلظت مناسبي از عصاره است كه در آن سلول‌هاي PBMC ($۲ \times ۱۰^{۵}$ در هر گوده) به طور طبيعي رشد كرده و از طرف ديگر پاسخ تكثيري آن‌ها به ConA سركوب گرديد.

براي يافتن غلظت مناسب ConA در آزمايش‌هاي in vitro، آزمايش‌هاي بيشتر با استفاده از غلظت‌هاي مختلف ConA نشان داد كه ميزان يک ميكروگرم در گوده غلظت مناسبي از ConA است كه در آن PBMC قادر به تكثير و سركوب مي‌باشد. در آزمايش‌هاي in vitro نشان داده شد كه پاسخ تكثيري PBMCها به ميزان ۶۰ تا ۱۰۰ برابر سلول‌هاي تيمار نشده مي‌باشد. اين قدرت افزايش تكثير پس از تماس اين سلول‌ها با عصاره‌ي CFE تهيه شده از *پاستورلا مولتي‌سيدا* به مدت يک ساعت سركوب مي‌شود. شرايط ذكر شده در اين آزمايش‌هاي in vitro به عنوان روش استاندارد براي ادامه مطالعات بر روي PBMC سازگار شده است.

پس از مشاهده فعاليت سركوبي عصاره CFE در آزمايش‌هاي in vitro، ادامه آزمايش‌ها بر روي شناسايي اوليه عامل يا عوامل سركوب‌گر موجود در عصاره متمركز گرديد. براي تعيين اختصاصيت اين اثر سركوب‌گر به پاستورلا مولتي سيدا ۲:B، عصاره خام بدون سلول (CFE) برخي از اورگانيسم‌هاي مشابه و غير مشابه ديگر نيز تحت آزمايش قرار گرفتند. از مجموعه ارگانيسم‌هاي *استافيلوكوكوس ارئوس*، *اشرشيا كلي*، *مانهميا هموليتيكا* و *پاستورلا مولتي‌سيدا* سروتيپ D خوكي، فقط مورد اخير خواص سركوب‌گري از خود نشان داد. خواص سركوب‌گري ايمني *پاستورلا مولتي‌سيدا*سروتيپ D خوكي در مطالعه‌اي ديگر بر روي چالش خوك و موش بر كاهش پاسخ آنتي‌بادي IgG اين حيوانات نشان داده شد (۱۶). مطالعه‌اي بر روي آثار سركوبي توكسين همين سروتايپ (PMT) بر پاسخ ايمني نشان داده است كه اين توكسين قادر به كاهش فعاليت لنفوسيت‌هاي T (T cell) از طريق اثر سركوب‌گري بر مونوسيت‌ها است (۱۷). هرچند مطالعه اخير نشان داده است كه توكسين PMT بر تمايز T cell اثر گذاشته و آن را به سوي Th۱۷ سوق مي‌دهد كه اين امر از طريق فعال‌سازي مكانيسم فاكتورهاي نسخه‌برداري STAT انجام مي‌شود (۱۸).

به منظور شناسايي اوليه عامل يا عوامل سركوب‌گر موجود عصاره CFE *پاستورلا مولتي‌سيدا*، تيمارهاي متفاوتي بر روي عصاره انجام شد. آزمايشات نشان داد كه حرارت دادن عصاره تا دماي ۸۰ درجه سانتي‌گراد به مدت پنج دقيقه اثر سركوب‌گري را به طور كامل از بين مي‌برد. اين امر نشان‌دهنده پروتئيني بودن عامل فعال سركوب‌گر موجود در عصاره يا وجود حداقل بخشي پروتئيني در ساختار آن مي‌باشد، به طوري‌كه آن را به حرارت حساس نموده است. آزمايش ديگر با استخراج پروتئين غشاء خارجي (OMP) از *پاستورلا مولتي‌سيدا* ۲:B نشان داد كه اين جزء از عصاره نيز با شدت بيشتري ويژگي سركوب‌گري را دارا مي‌باشد. اثر سركوب‌گري اين جزء از عصاره كه جزء پروتئين‌هاي غشاء خارجي است نيز به حرارت حساس مي‌باشد. ديااليز عصاره با غشاي ۱۰ كيلودالتون تاثيري بر اثر سركوب‌گري عصاره نشان نداد. اين بدين معني است كه جزء يا اجزاي سركوب‌گر موجود در عصاره از اندازه‌اي بزرگتر از ۱۰ كيلودالتون برخوردار مي‌باشند. از اجزاي مهم سلولي *پاستورلا مولتي‌سيدا* كپسول پلي‌ساكاريدي آن مي‌باشد. در ادامه آزمايش‌ها، كپسول پلي‌ساكاريدي تهيه شده از ارگانيسم هيچ‌گونه اثر سركوب‌گري از خود نشان نداد. مايع‌رويي كشت پاستورلا در محيط مايع هيچ‌گونه اثر سركوب‌گري از خود نشان نداد. اين امر نشان‌دهنده اين واقعيت است كه ماده يا مواد سركوب‌گر موجود در عصاره در محيط كشت ترشح يا آزاد نمي‌شوند و جزئي از اجزاي باكتري هستند.

بسيار محتمل است كه عصاره CFE تهيه شده حاوي مقاديري هرچند جزئي از LPS باشد. در ادامه براي نشان دادن نقش احتمالي اين جزء از سلول در اثر سركوب‌گري، LPS خالصي از باكتري گرم منفي اشرشيا كلي تهيه و اثر آن بر روي سلول‌هاي PBMC آزمايش گرديد. آزمايش‌ها نشان داد LPS به كار رفته نه تنها قادر به كاهش پاسخ تكثيري سلول‌ها نيست، بلكه غلظت‌هاي بالاي آن باعث افزايش اثر تكثيري ConA مي‌باشد. به منظور توجيه اين اثر تكثيري بايستي به اين نكته توجه داشت كه LPSبه عنوان عاملي با ويژگي تكثيركنندگي لنفوسيت B شناخته مي‌شود. از طرف ديگر، به لحاظ خواص سمي، LPS ممكن است به برخي از سلول‌هاي PBMC آسيب برساند. بعيد به نظر مي‌رسد كه LPS احتمالي موجود در عصاره اثر سوئي بر PBMC گوساله داشته باشد، زيرا عصاره CFE به تنهايي در غلظت به كار رفته هيچ‌گونه اثر سوئي نشان نداد. در مطالعه ديگري بر روي LPS به‌دست آمده از اشرشياكلي نشان داده شده است كه اين ماده قادر به ايجاد تكثير در PBMC گاوي است(۱۹). همچنين مطالعه مشابه ديگري نشان داد كه LPS به‌دست امده از *پاستورلا مولتي‌سيدا* سروتيپ A۳ اثر تكثيري بر روي لنفوسيت‌هاي B موش دارد(۲۰). مطالعه مشابه بر روي يرسينيا (*Yersinia pseudotuberclosis*) (عامل گاستروانتريت و لنفادنوپاتي انسان) نشان‌دهنده اثر مهاري اين باكتري بر روي لنفوسيت T بود (۲۱). مطالعات بعدي نشان داد كه پروتئين خارجي YopH عامل اين سركوب مي‌باشد (۲۲). مطالعات بعدي بر روي يرسينيا نشان داد كه مكانيسم اين سركوب از طريق هدف قرار دادن مولكول‌هاي LAT (Linker for activation of T cells) مي‌باشد (۲۳).

در مجموع، نتايج نشان داد كه عامل يا عوامل سركوب‌گر موجود در عصاره CFE پروتئيني يا دست كم بخشي از آن پروتئيني است و جزء پروتئين‌هاي غشاء خارج سلولي OMP است. اين مواد سركوب‌گر جزء املاح يا مواد شيميايي نيست، زيرا پس از دياليز با غشاء آستانه‌اي ۱۰ كيلو دالتون همچنان اثر سركوب‌گري باقي ماند. اين مطالعه شواهد ابتدايي از آثار سركوب‌گري *پاستورلا مولتي‌سيدا* سروتايپ B:۲ را ارائه مي‌دهد. بي شك مستندات و شواهد آزمايشگاهي بيشتري براي تاييد اين آثار از يك سو و مكانيسم اين سركوب از سوي ديگر پيشنهاد مي‌شود

## تشکر و قدردانی

بدين‌وسيله نويسندگان لازم مي‌دانند از حمايت‌هاي مؤسسه تحقيقات واكسن و سرم‌سازي رازي براي تامين امكانات اين مطالعه تشكر نمايند.

### منابع مورد استفاده

1. Brunham, R. C., Plummer, F. A. & Stephens, R. S. 1993. Bacterial antigenic variation, host immune response, and pathogen-host co-evolution. *Infectious Immunity*. 61: 2273-2276.

2. Hornef, M. W., Wick, M. J., Rhen, M. & Normark, S. 2002. Bacterial strategies for overcoming host innate and adaptive immune responses. *Nature Immunology*. 3: 1033-1040.

3. Tizard, I.R., 2013. Veterinary Immunology, in: Immunity to Bacteria and Fungi, 9th ed. USA, Philadelphia, Saunders-Elsevier, pp. 283-295.

4. Schwab, J. H. 1975. Suppression of the immune response by microorganisms. *Bacteriological Reviews*. 39: 121-143.

5. Aktories, K., Orth, J. H.C., Adler, B. 2012. *Pasteurella multocida*, Molecular biology, Toxins and Infection, 1ed. Germany, Berlin Heidelberg, Springer-Verlang.pp. pp. 63-72.

6. Jacques, M. 2002. Virulence factors of Pasteurellaceae, formidable animal pathogens. ASM News. 68: 175-179.

7. Benkirane, A., DE Alwis, M.C.L. 2002. Haemorrhagic septicaemia, its significance, prevention and control in Asia. *Veterinary Medicine – Czech*. 47: 234-240.

8. Kubatzky, K. F., Kloos, B., and Hildebrand, D. 2013. Signaling cascades of *Pasteurella multocida* toxin in immune evasion. *Toxins* (Basel). 5: 1664–1681.

9. Srivastava, S. K. 1998. Outer membrane protein of *Pasteurella multocida* serotype B:2 is immunogenic and antiphagocytic. *Indian Journal of Experimental Biology*. 36: 530-532.

10. Ataei, S., Burchmore, R., Hodgson, J., Finucane, A., Parton, R., Coote, JG. 2009. Identification of immunogenic proteins associated with protection against haemorrhagic septicaemia after vaccination of calves with a live-attenuated aroA derivative of *Pasteurella multocida* B:2.*Research in Veterinary Science*. 87(2):207-10.

11. Davies, R. L., Parton, R., Coote, J. G., Gibbs, H. A., Freer, J. H. 1992. Outer-membrane protein and lipopolysaccharide variation in *Pasteurella haemolytica* serotype A1 under different growth conditions. *Journal of General Microbiology*. 138: 909-922.

12. OIE, 2012. Haemorrhagic septicaemia. In Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, 2.4.12, 7th edition, 2012: OIE.

13. Vanden Bush, T. J., Rosenbusch, R. F. 2002. *Mycoplasma bovis* induces apoptosis of bovine lymphocytes. FEMS Immunology & Medical Microbiology. 32: 97-103.

14. Vanden Bush, T. J. & Rosenbusch, R. F. (2004). Characterization of a lympho-inhibitory peptide produced by *Mycoplasma bovis*. *Biochemistry and Biophysics Research Communications* 315, 336-341.

15. De Alwis, M.C.L. (1999). Haemorrhagic Septicaemia. In Australian Centre for International Agricultural Research (ACIAR) Monograph No 57, pp. 141. Canberra Australia.

16. Jordan, R. W., Hamilton, T. D., Hayes, C. M., Patel, D., Jones, P. H., Roe, J. M. & Williams, N. A. 2003. Modulation of the humoral immune response of swine and mice mediated by toxigenic *Pasteurella multocida*. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*. 39: 51-59.

17. Hildebrand, D., Sahr, A., Wolfle, S. J., Heeg, K., and Kubatzky, K. F. 2012. Regulation of Toll-like receptor 4-mediated immune responses through *Pasteurella multocida* toxin-induced G protein signalling. *Cell Communication and Signaling*. 10: 22.

18. Hildebrand, D., Heeg, K., and Kubatzky, K. F. 2015. *Pasteurella multocida* Toxin Manipulates T Cell Differentiation. *Frontiers in Microbiology*. 6: 1273.

19. Stevens, M. G., Olsen, S. C., Cheville, N. F. 1997. Comparative effects of bovine cytokines on cattle and bison peripheral blood mononuclear cell proliferation. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. 20: 155-162.

20. Ryu, H. I., Kim, C. J. 2000. Immunologic reactivity of a lipopolysaccharide-protein complex of type A *Pasteurella multocida* in mice. Journal of Veterinary Science. 1: 87-95.

21. Yao, T., Mecsas, J., Healy, J. I., Falkow, S. & Chien, Y. 1999. Suppression of T and B lymphocyte activation by a *Yersinia pseudotuberculosis* virulence factor, yopH. *The Journal of Experimental Medicine*. 190: 1343-1350.

22. Sing, A., Roggenkamp, A., Geiger, A. M. & Heesemann, J. 2002. *Yersinia enterocolitica* evasion of the host innate immune response by V antigen-induced IL-10 production of macrophages is abrogated in IL-10-deficient mice. Journal of *Immunology*. 168: 1315-1321.

23. Gerke, C., Falkow, S., Chien, Y. H. 2005. The adaptor molecules LAT and SLP-76 are specifically targeted by Yersinia to inhibit T cell activation. *The Journal of Experimental Medicine*. 201: 361-371.