✓ پژوهش و سازندگی، شماره ۵۱، تابستان ۱۳۸۰

خصوصیات زیست شناسی سویه RB_{51} *Brucella abortus*

● اسماعیل ذوقی ● عبداله عبادی ● مهران یاراحمدی و ● محمد خداشناس
اعضاء هیأت علمی مؤسسه تحقیقاتی واکسن و سرم‌سازی رازی - کرج

تاریخ دریافت: تیرماه ۱۳۷۹ تاریخ پذیرش: اسفندماه ۱۳۷۹

چکیده

از طریق کشت مکرر سویه اسموس (صاف) ۲۳۰۸ *B. abortus* بر روی محیط آگار اختصاصی بروسلاها با غلظت‌های مختلف ریفامپین و پنی‌سیلین سویه جهش یافته (موتانت) مقاوم به دو آنتی‌بیوتیک فوق مشتق گردیده و RB_{51} نام گرفته است. این سویه راف(خشن) بوده و در آزمایش با آگریفلاوین اتوآگلوتینه شده و رنگ کریستال ویوله را جذب می‌نماید. لیپوپلی ساکارید دیواره سلولی سویه RB_{51} فاقد زنجیره O- جانبی بوده و در تزریق به حیوانات تولید پادتن هومورال را موجب نمی‌گردد. از نظر بیوشیمیایی، سویه RB_{51} در قابلیت استفاده از قند - الکل اریتریتول به سویه والد ۲۳۰۸ خود شباهت دارد. تزریق زیرجلدی این سویه در موش BALB/C و خوکچه هندی به جایگزینی باکتری در طحال منجر شده، که در موش تا ۳ هفته و در خوکچه هندی تا ۴ هفته دوام می‌یابد. در تزریق داخل صفاقی موش نیز طی ۳هفته باکتری از طحال پاک می‌شود. این سویه با ثبات بوده و در پاساژهای مکرر کشت آزمایشگاهی (in Vitro) و در بدن حیوان زنده (in Viro) برگشت‌پذیری به حالت صاف ندارد. ساختار پادگنهای پروتئینی سویه RB_{51} مشابه سویه‌های اسموس می‌باشد. ایمن‌سازی موش BALB/C با دُز 1×10^{8} و خوکچه هندی با دُز 2×10^{9} به محافظت قابل توجهی در مقابل آلودگی با سویه صاف حاد ۵۴۴ *B. abortus* منجر می‌گردد و ایمنی حاصله از طریق ایمنی سلولی ایجاد می‌شود.

کلمات کلیدی: *Brucella abortus*، زیست‌شناسی، سویه RB_{51}، واکسن

✓ **Pajouhesh & Sazandegi, No 51 PP:35-38**

Biological characteristics of *Brucalla abortus* strain RB_{51}

By: E. Zowghi, A. Ebadi, M. Yarahmadi and M. Khodashenas Institute Razi, P.O. Box 11365-1558, Tehran, Iran.

A rifampin - penicillin resistant mutant of *Brucella abortus* was derived by repeated passage of smooth strain 2308 on specific brucella agar medium with varying concentrations rifampin and pencillin, and designated RB_{51}. This strain is rough and its colonies absorbed crystal violet and autoagglutinated with acriflavine, No O - Chain component was detected in lipopolysaccharide of RB_{51}, and therefore, it doesn't induce humoral antibodies in animals injection. Biochemically RB_{51} resembles parental strain 2308 in its ability to utilize erythritol. Subcutaneously inoculation of RB_{51} into BALB/C mice and guinea - pigs results in a splenic colonization which is cleared within 3 and 4 weeks post infection respectively. Also, interaperitoneal inoculation of RB_{51} into mice results in splenic colonization that is cleared after 3 weeks. RB_{51} is a stable strain and doesn't revert to smooth phase upon passage in vitro and in vivo. The proteins antigenic structure of RB_{51} resembles to smooth strains. Immunization of BALB/c mice with 2×10^{8} and guinea - pigs with 2×10^{9} viable organisms confers significant protection against challenge with virulent *Brucella abortus* strain 544.

Key words: *Brucella abortus*, Biology, RB_{51} strain, Vaccine

مقدمه

به طور طبیعی دو گونه شایع *B. abortus* و *B. melitensis* در ایران به شکل اسموس وجود داشته و حاوی هوموپلیمر پروزامین بصورت زنجیره O- جانبی لیپوپلی‌ساکارید خود می‌باشند (۱). پروزامین زنجیره O- لیپولی‌ساکارید پادگن غالب ایمنی هومورال بوده و پاسخ پادتن را موجب می‌گردد (۲). پاسخ ایمنی در مقابل زنجیره O- سویه‌های اسموس بروسلا مشکلاتی را در تشخیص سرولوژی بروسلوز باعث می‌شود. در تعدادی از حیوانات واکسینه با واکسن‌های زنده S_{19} یا Rev.1 تیترهای پادتن برای مدت زمان طولانی دوام یافته و تمایز عفونت را در بررسی‌های سرولوژی مانع می‌گردد(۴،۳). از این رو، استفاده از واریانت راف باثبات سویه اسموس بروسلا با فقدان زنجیره O- جانبی لیپوپلی ساکارید و قابلیت تولید ایمنی در میزبان، نماینده ایده‌آلی برای واکسن خواهد بود.

سویه راف تخفیف حدت یافته *B. abortus* RB_{51} از سویه اسموس و حاد ۲۳۰۸ مشتق شده(۵) و خصوصیات باثبات آن بوسیله پژوهندگان بسیاری مورد بررسی قرار گرفته است (۶، ۷، ۸، ۹). چگونگی اشتقاق سویه RB_{51} از سویه ۲۳۰۸ بوسیله Schurig و همکاران (۵) از دانشگاه ویرجینیا ارائه و در شکل ۱ نشان داده شده است. بعد از ۳ پاساژ *B. abortus* سویه ۲۳۰۸ در محیط حاوی غلظت‌های مختلف ریفامپین، پرگنه‌هایی با خصوصیات مورفولوژی راف ظاهر شده که رنگ کریستال ویوله را جذب نموده و با آگریفلاوین اتوآگلوتینه شدند. یکی از این پرگنه‌ها RB (بروسلا راف) نام‌گذاری شده و پاساژهای بیشتری بر روی محیط حاوی غلظت‌های مختلف ریفامپین و پنی‌سیلین داده شد. نتیجتاً در یک مرحله سویه‌ای به شماره RB_{19} با عدم قابلیت جذب پادتن مونوکلونال اختصاصی پروزامین زنجیره O- *B. abortus* به ظهور رسید. به منظور تعیین ثبات سویه جهش یافته مورد نظر، این سویه چندین بار بر روی محیط بدون آنتی‌بیوتیک پاساژ داده شد و سرانجام پس از ۵۱ پاساژ سویه RB_{51} بدست آمد (شکل ۱ و تصاویر ۱ تا ۴).

استفاده رو به افزایش این سویه در تحقیقات بروسلوز شرح کاملی از برجسته‌ترین خصوصیات آن را ارائه داده است. در بررسیهای مختلف کشت آزمایشگاهی (in vitro) و بر روی حیوان زنده (in vivo) عدم

برگشت‌پذیری آن به سویه اسموس نشان داده شده است (۵). این سویه از حدت بیماریزایی بسیار کمی برخوردار بوده و ضمن تولید ایمنی پایدار، پادتن در مقابل زنجیره O- لیپوپلی ساکارید را تولید نمی‌نماید. در گزارش حاضر، خصوصیات سویه RB_{51} در ارتباط با پاره‌ای تجربیات در بخش بروسلوز مؤسسه رازی ارائه می‌گردد.

مواد و روش‌ها

سویه‌های *B. abortus* RB_{51} و ۵۴۴ به صورت آمپول لیوفیلیزه در بخش بروسلوز مؤسسه رازی موجود بوده و استفاده شده است. محتوای هر آمپول با بروسلابراس محلول شده و در محیط بروسلا آگار کشت داده شده است. کشت‌ها به مدت ۴۸ تا ۷۲ ساعت در گرمخانه ۳۷ درجه سانتیگراد حاوی هوا یا در جار حاوی گاز دی‌اکسید کربن (CO_2) به میزان ۵ تا ۱۰ درصد قرار گرفته است. شناسایی پرگنه‌های اسموس و راف با آکریفلاوین و رنگ کریستال ویوله سنجیده شد (۱۰، ۱۱).

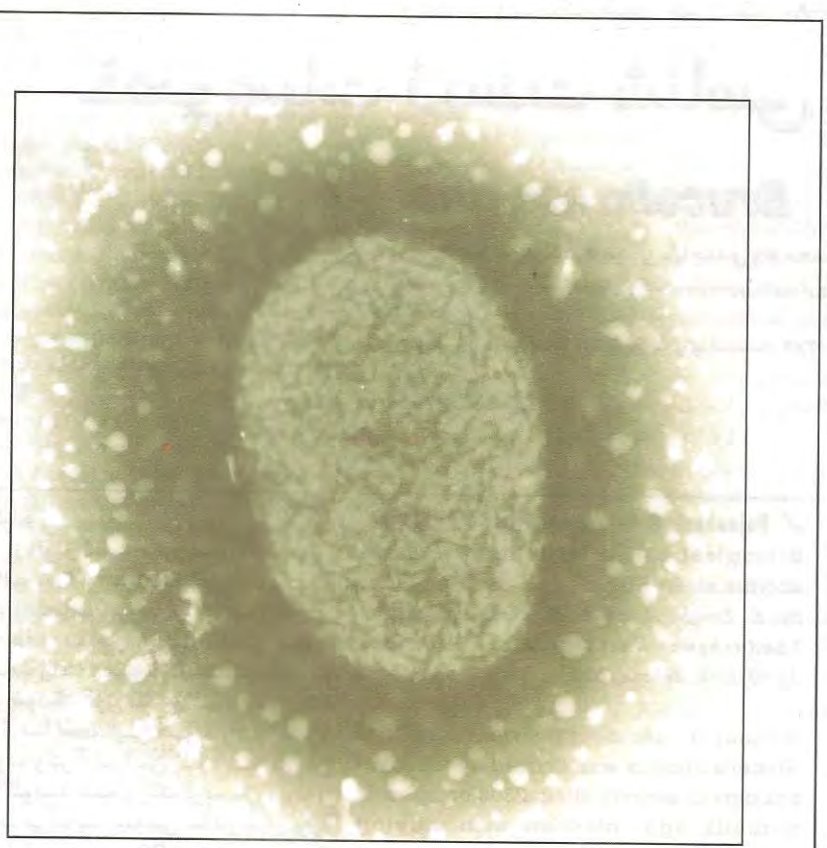
خوکچه‌های هندی نژاد پربرایت معروف به موکوتاه انگلیسی و موشهای BALB/C از بخش تحقیق و پرورش حیوانات آزمایشگاهی مؤسسه رازی تأمین گردید. پس از تجربیات مقدماتی، دُز ۲×۱۰^{۹} و ۱×۱۰^{۸} جرم یا واحد تشکیل پرگنه (C.F.U) سویه RB_{51} به ترتیب جهت ایمن‌سازی خوکچه‌ها و موشها به طریق زیرجلدی در موش و داخل عضلانی در خوکچه هندی مورد استفاده قرار گرفت.

به منظور تعیین زمان حذف باکتری RB_{51} از طحال حیوانات هر هفته ۲ خوکچه هندی و ۲ موش کالبدگشایی شده و طحال آنها بطور استریل برداشت و کشت گردید. این بررسی تا ۶ هفته ادامه یافت. در هر مرحله نمونه خون جهت آزمایش سرولوژی ارسال گردید.

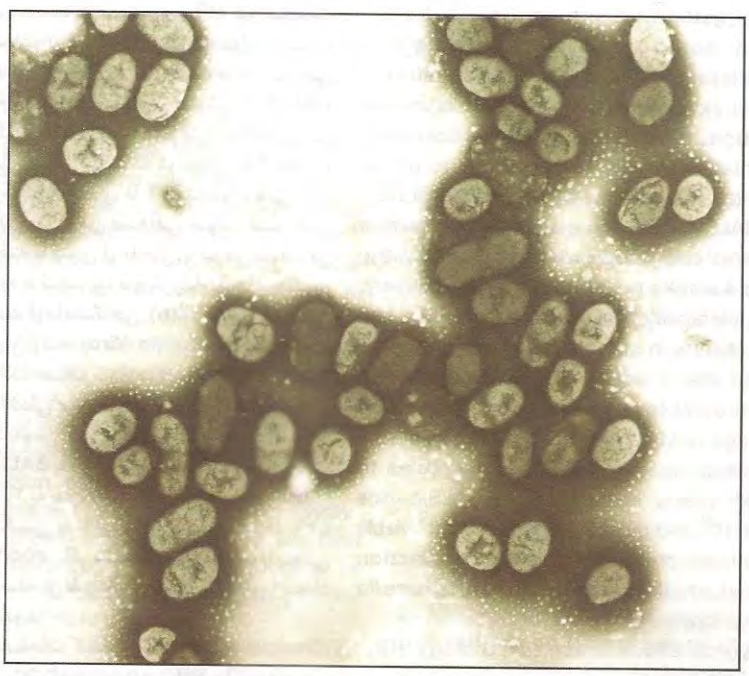
در تعیین مقاومت در مقابل سویه حاد، پس از ۶ هفته واکسیناسیون ۴ خوکچه با دُز ۵×۱۰^{۳} و ۴ موش با دُز ۵×۱۰^{۲} جرم سویه اسموس و حاد ۵۴۴ *B. abortus* و در مقایسه با گروه کنترل غیرواکسینه آلوده شدند. شش هفته بعد تمامی حیوانات کالبدگشایی شده و طحال آنها از نظر آلودگی با سویه چالنج کشت گردید.

نتیجه

سویه راف RB_{51} باثبات بوده و پس از ۳۵ پاساژ بر روی محیط آزمایشگاهی هیچگونه تغییر کیفی نشان نداده، هرچند که ثبات و عدم برگشت‌پذیری آن به حالت اسموس پس از ۹۳ بار کشت مکرر در محیط آزمایشگاهی (in vitro) و ۱۵ بار بر روی حیوان زنده (in vivo) به ثبوت رسیده(۵) و بوسیله پژوهندگان بسیاری مورد تأیید بوده است (۱۲، ۱۳، ۱۴). پرگنه‌های راف RB_{51} رنگ کریستال ویوله را به خود گرفته و با آکریفلاوین آگلوتینه می‌شوند. این سویه به گاز دی‌اکسیدکربن (CO_2) جهت رشد نیاز نداشته و در محیط بروسلاآگار بدون خون یا مواد اضافی دیگر به خوبی رشد می‌کند. خصوصیات بیوشیمیایی سویه RB_{51} در مقایسه با دیگر سویه‌ها در جدول ۱ نشان داده شده است (۵).



تصویر شماره ۱- (۷۹/۲/۱۰) ×۶۰۰۰۰ *Brucella abortus* strain RB_{51}



تصویر شماره ۲- (۷۹/۲/۱۲) ×۱۰۰۰۰ *Brucella abortus* strain RB_{51}

سویه RB_{51} به آمپی‌سیلین، کلرامفنیکل، جنتامایسین، کاناماسین، نئومایسین، اوکسی تتراسیکلین، کاربنی‌سیلین، سفالوتین، استرپتومایسین، نیتروفورانتوئین، تتراسیکلین، اریترومایسین و تری‌متوپریم / سولفامتوکسازول حساس بوده، ولیکن به ریفامپین، پنی‌سیلین و فورازولیدن مقاوم است(۵). در آزمایش میکروسکوپی با رنگ‌آمیزی گرم، مشابهت بیشتر این سویه از نظر اندازه و مورفولوژی با سویه والد ۲۳۰۸ نشان داده شده است.

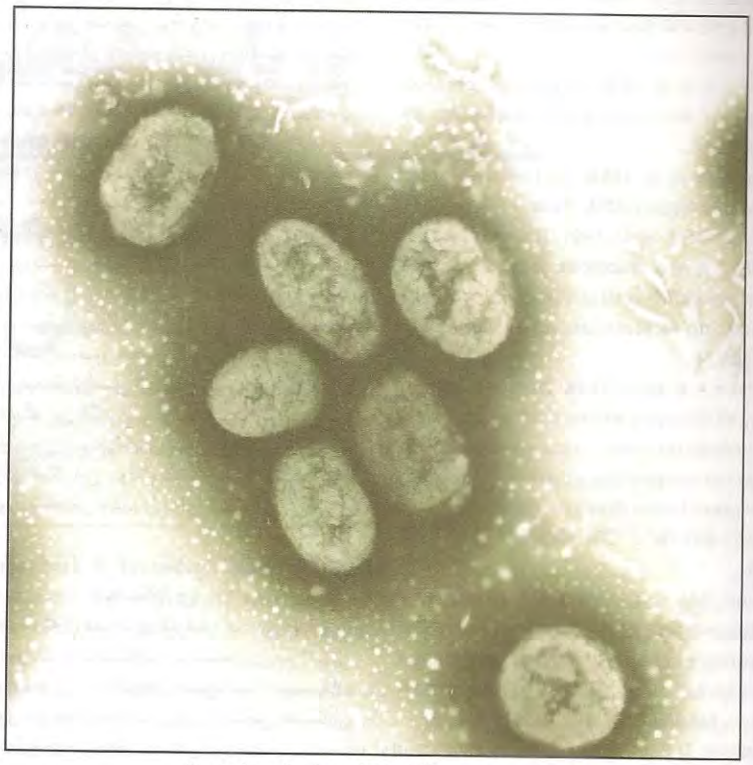
تعداد باکتری RB_{51} جدا شده از طحال خوکچه‌ها پس از ۴ هفته تلقیح به تعداد قابل ملاحظه‌ای کاهش نشان داد و از هفته پنجم به بعد کاملاً حذف شد. بطور مشابه باکتریهای RB_{51} تا ۳ هفته در طحال موشهای BALB/C دوام داشته و از کشت هفته چهارم به بعد باکتری جدا نگردید. محو سریع سویه RB_{51} از طحال حیوانات بر قابلیت بیماریزایی ضعیف آن دلالت می‌کند. گزارشهای بسیاری نیز نشان داده‌اند که باکتریهای مقاوم به ریفامپین نسبت به سویه‌های حساس به این آنتی‌بیوتیک از حدت بیماریزایی بسیار کمتری برخوردارند (۱۵). به علت عدم وجود زنجیره O- لیپوپلی ساکارید در سویه RB_{51}، پادتن هومورال علیه آن تولید نشده و تمامی واکنش‌های سرولوژی حیوانات در مراحل مختلف منفی بوده است. از طرفی دیگر، وجود پادگنهای پروتئینی مشابه دیگر سویه‌های اسموس در آن نشان داده شده است (۵).

خوکچه‌های هندی و موشهای واکسینه در مقابل سویه حاد ۵۴۴ *B. abortus* به طور ۱۰۰ درصد مقاومت نشان دادند، در حالی که تمامی حیوانات گروههای کنترل به سویه چالنج آلوده شدند.

بحث

سویه RB_{51} *B. abortus* از سویه اسموس ۲۳۰۸ پس از کشت‌های مکرر در محیط غذایی حاوی ریفامپین و پنی‌سیلین مشتق شده است. این سویه راف بوده، رنگ کریستال ویوله را جذب نموده، با آکریفلاوین اتوآگلوتینه شده و از زمان اشتقاق آن در سال ۱۹۸۲ با ثبات باقی مانده است(۵،۱۴،۱۶). عدم برگشت‌پذیری باکتری به شکل اسموس پس از ۹۳ مرتبه کشت آزمایشگاهی (in vitro) و ۱۵ بار تزریق پیاپی در موش (in vivo) به ثبوت رسیده است(۵). سویه RB_{51} فاقد پروزامین زنجیره O- لیپوپلی ساکارید بوده و قادر به جذب پادتن مونوکلونال اختصاصی پروزامین گونه‌های اسموس بروسلا نیست. در مقابل، دیگر پادگنهای دیواره سلولی باکتری مشابه این پادگن‌ها در سویه‌های اسموس بوده و در بررسیهای مقایسه‌ای غشا خارجی این سویه با سویه‌های ۲۳۰۸، ۱۹ و ۴۵/۲۰ به وسیله الکتروفورز وجود تقریباً همانند پادگنهای پروتئینی در چهار سویه نشان داده شده است (۵، ۶). عدم وجود زنجیره O- لیپوپلی ساکارید در این باکتری، آن را در یک موقعیت ممتاز قرار داده و در تزریق به حیوان تولید پادتن قابل شناسایی در روشهای متداول سرولوژی را موجب نمی‌گردد.

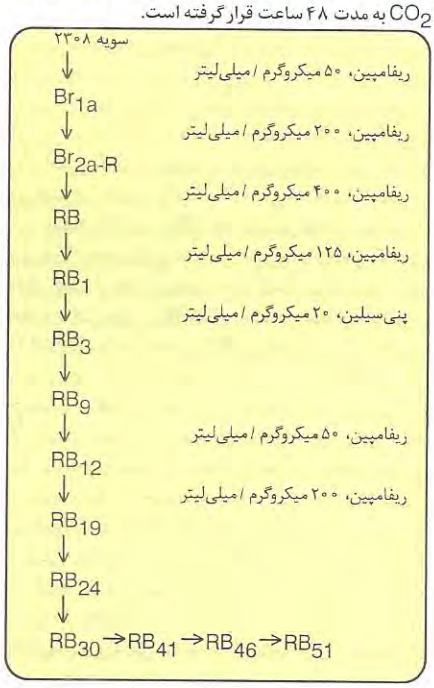
نیازهای رشد سویه RB_{51} مشابه سویه‌های ۲۳۰۸، ۱۹ و ۴۵/۲۰ بوده و به گاز دی‌اکسیدکربن (CO_2)، خون یا مواد اضافی دیگر احتیاج ندارد. در آزمایش‌های میکروسکوپی با رنگ‌آمیزی گرم مشابهت بیشتر این



تصویر شماره ۳- (۷۹/۲/۱۳) ×۲۲۰۰۰ *Brucella abortus* strain RB_{51}

تصویر شماره ۴- (۷۹/۲/۱۶) ×۳۶۲۰۰ *Brucella abortus* strain RB_{51}

شکل ۱- اشتقاق سویه RB_{51} از سویه ۲۳۰۸ *B. abortus* تمامی کشت‌ها در گرمخانه ۳۷ درجه سانتیگراد و ۵٪ گاز CO_2 به مدت ۴۸ ساعت قرار گرفته است.



جدول شماره ۱- واکنش‌های بیوشیمیایی سویه RB_{51} در مقایسه با دیگر سویه‌های *B. abortus*

	RB_{51}	۲۳۰۸	۱۹	۴۵/۲۰
اوره آز	+	+	+	+
اکسیداز	+	+	+	+
احیاً نیترات	-	+	-	-
افزایش رشد با :				
گلوکز	+	+	+	+
آرابینوز	-	+	-	-
مالات	-	+	-	-
رشد در حضور:				
اریتریتول ۰/۵درصد	+	+	-	+
حساسیت به ریفامپین	-	+	+	+

سویه از نظر اندازه و مورفولوژی با سویه والد ۲۳۰۸ خود نشان داده شده است. از طرفی دیگر، الگوی مصرف کربوهیدراتهای RB_{51} و ضعف در احیاً نیترات بوسیله آن بیشتر به سویه‌های ۱۹ و ۴۵/۲۰ تا سویه ۲۳۰۸ شباهت دارد (۵). از این‌رو، محتمل است در سیر جهش به مورفولوژی راف، RB_{51} نیز جهش‌هایی را از سر گذرانده که بر قابلیت‌های متابولیک آن تأثیر گذارده است. با وجود این، قابل توجه است که برخلاف سویه ۱۹، قابلیت رشد در حضور قند - الکل اریتریتول بوسیله سویه RB_{51} حفظ شده است.

میزان جرم یا واحد تشکیل پرگنه (c.f.u) ۲×۱۰^{۹} و ۱×۱۰^{۸} به ترتیب جهت خوکچه هندی و موش BALB/C بی‌ضرر و ایمنی‌زا می‌باشد. در حیوانات تلقیح شده هیچگونه پادتن هومورال علیه پروزامین زنجیره O- قابل شناسایی نبوده، هرچند که پاسخ پادتن در مقابل پادگنهای سلولی *B. abortus* به غیر از زنجیره O- لیپوپلی ساکارید ایجاد می‌شود. باکتریهای RB_{51} از قابلیت بیماریزایی ضعیفی برخوردار بوده و در مدت زمان کوتاه ۴ هفته در خوکچه هندی و ۳ هفته در موش از طحال حذف می‌شوند. در حالیکه وجود سویه‌های اسموس حاد تا ۲۴ هفته و حتی سویه ۱۹ تا ۱۲ هفته در طحال به ثبت رسیده است (۱۷، ۱۸).

تلقیح دُز واحد باکتری در خوکچه‌ها و موش‌ها به مقاومت ۱۰۰ درصد در مقابل سویه حاد ۵۴۴ *B. abortus* و در مقایسه با گروه کنترل منجر شده و این نتیجه در بررسیهای بسیاری از پژوهندگان در حیوانات مختلف به ثبوت رسیده است (۵، ۱۹، ۲۰، ۲۱).

عدم تولید پادگن هومورال علیه زنجیره O- لیپوپلی ساکارید سویه‌های اسموس بروسلا، قابلیت بیماریزایی ضعیف و ایمنی‌زایی مناسب به وسیله RB_{51}، *B. abortus* این باکتری را در موقعیتی استثنایی قرار داده که به عنوان سویه واکسن مورد استفاده قرار گرفته است. ویژگی دیگر این سویه مقاومت به ریفامپین بوده که به عنوان شاخص مفیدی برای شناسایی آن عمل می‌نماید.

سپاسگزاری

بدینوسیله از همکاری کارکنان بخش تحقیق و پرورش حیوانات آزمایشگاهی مؤسسه رازی در تأمین خوکچه هندی و موش‌های مورد نیاز صمیمانه سپاسگزاری می‌شود. زحمات بی‌دریغ تمامی همکاران بخش بروسلوز موجب نهایت امتنان است.

منابع مورد استفاده

1- Bundle D.R. et al, 1987. The lipopolysaccharides of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis*. Ann. Inst. Pasteur. Microbiol; 138: 92-98.

2- Diaz R. et al, 1968. Surface antigens of smooth brucella. J. Bacteriol., 96: 893-901.

3- Nicoletti P, 1981. Prevalence and persistence of *Brucella abortus* strain 19 infections and prevalence of other biotypes in vaccinated adult dairy cattle. J. Am. med. Assoc. 178 : 143 - 145.

4- Woodard L.F. 1981. Do we need another brucellosis vaccine? Mod. vet. Pract. 62 : 857 - 859.

5- Schurig G.G. et al, 1991. Biological properties of RB_{51} : A stable rough strain of *Brucella abortus*. Vet. Microbiol. 28: 171-188.

6- Santos J. M. et al, 1984. Outer membrane proteins from rough strains of four brucella species. Infect Immun. 46 : 188 - 194.

7- Corbeil L. B. et al, 1988. Killing of *Brucella abortus* by bovine sera. Infect. Immun. 56 : 3251 - 3261.

8-Ficht T.A. et al, 1988. A 36 - Kilodalton *Brucella abortus* cell envelope protein is encoded by repeated sequences closely linked in the genomic DNA. Infect. Immun; 56: 2036 - 2040.

9- Smith III, R. et al, 1990a. Bovine t-lymphocite lines reactive with *Brucella abortus*. Am. J. Vet. Res. 51 : 512 - 517.

10- Alton G.G. et al, 1975. Laboratory techniques in brucellosis. WHO monograph sepcies. No. 55. WHO, Geneva.

11-Alton G.G. et al, 1988. Techniques for the brucellosis laboratory.INRA, Paris.

12- Stevens M.G. et al, 1997. *Brucella abortus* strain RB_{51}: A new brucellosis vaccine for cattle. The compendium on continuing education for the practicing veterinarian.vol.19,No.6, June 1997: 766-774.

13- Jensen A.E. et al, 1996. Determination of stability of *Brucella abortus* RB_{51} by use of genomic fingerprinting, oxidative metabolism and colonial morphology and differentiation of $RB]_{51}$ isolated from *Brucella abortus* isolated from bison and elk. J. Clin. microbiol. mar. 1996. 628-633.

14- Enright F.M. et al, 1990. RB_{51} *B. abortus*: A better bovine brucellosis vaccine. Anim. Dis. Res. Workers in southern states conference, March 25-27, Ralegh, NC, USA. Abstract 16. Cited by : Schurig G.G. et al, (1991) (Ref.5).

15- Moorman D.R. et al, 1981. Characteristics of rifampin resistant variants obtained from clinical isolates of *Staphylococeus aureus*. Antimicrob. Agents chemother; 20: 709 - 713. cited by: Schurig G.G. et al (1991) (Ref.5).

16- Palmer M.V.et al, 1997. Safety and immunogenicity of *B. abortus* RB_{51} vaccine in.

17- Enright F.M. et al, 1990. Comparative histopathology in BALB/C mice infected with virulent and attenuated strains of *B. abortus*. Vet. Immun. Immunopathol. 26: 171- 1820.

18- Riglar C. et al, 1980. Macrophage activation during experimental murine brueclosis. II. inhibition of in vitro lymphocyte proliferation brucella - activated macrophages. Cell. Immunol. 49: 154-167.

19- Schurig G. et al, 1997. Use of *B. abortus* SRB_{51} vaccine to protect cattle and avoid serological interference on diagnostic test. 15th international symposium W.A V. M.I. Nicosia, Cypres, 16-21 Feb. 1997.

20- Soberon M. et al, 1997. Evaluation of the *B. abortus* SRB_{51} in adult goats. 15th International symposium W. A. V. M. I. Nicosia, Cypres, 16-21 Feb. 1997.

21- Palmer M.V. et al, 1997. Effects of oral or interavenous inoculation with *B. abortus* strain RB_{51} vaccine in beagles. Am. J. Vet. Res. August 1997 : 851-856.