

ارزیابی واکسن DNA ترکیبی حاوی ژن گلیکوپروتئین‌های نو ترکیب B-1 و D-1 ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک

محمد آقاابراهیمیان^۱، دکتر محمدحسن روستایی^{۲*}، دکتر حوریه سلیمانجاهی^۳، دکتر کیوان زندی^۴

^۱ کارشناسی ارشد ویروس‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس

^۲ استاد گروه ویروس‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس

^۳ استادیار گروه ویروس‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس

^۴ استادیار ویروس‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بوشهر

چکیده:

ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک انسانی (HSV-1) عامل ایجاد بیماری‌های مهمی در انسان می‌باشد. با توجه به افزایش شیوع ویروس هرپس در جامعه و ظهور مستمر سویه‌های جدید مقاوم به درمان‌های جاری، لازم است تا برای پیشگیری از ابتلاء افراد حساس و بروز بیماری در آنها اقدام به تولید یک واکسن مؤثر شود. برای این کار واکسن‌های متفاوتی تولید شده‌اند که واکسن‌های حاوی DNA از جمله کاندیداهای مناسب برای این مقصود می‌باشند. در این پژوهش با استفاده از کلون‌های حاوی ژن کد کننده گلیکوپروتئین D ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک (pcDNA3-gD-1) یا ژن کد کننده گلیکوپروتئین B این ویروس (pcDNA3-gB-1) و یا ترکیبی از این دو کلون اقدام به ایمن‌سازی موشهای BALB/c حساس و سپس ارزیابی پاسخ ایمنی موشها شد. برای این کار سه گروه از موشهای BALB/c به ترتیب با: pcDNA3-gD-1 یا pcDNA3-gB-1، یا ترکیبی از این دو کلون مورد تلقیح قرار گرفتند. هر گروه مجموعاً ۳ بار و هر بار به فاصله ۲۱ روز با کلون‌های مربوط تلقیح شدند و قبل و بعد از هر تزریق از آنها خونگیری به عمل آمد. ضمناً به یک گروه مجزا از موشها به عنوان شاهد مثبت، سویه استاندارد KOS از ویروس هرپس تیپ یک (HSV-1) تزریق شد، حال آنکه به دو گروه مجزا نیز که به عنوان شاهد منفی در نظر گرفته شده بودند به ترتیب PBS و پلاسمید فاقد ژن تلقیح شد. بیست و یک روز پس از آخرین تزریق، موشهای مربوط به گروههای ۶ گانه با تزریق ویروس وحشی HSV-1 مورد چالش قرار گرفتند. ضمناً آزمایش خنثی سازی 100 TCID₅₀ ویروس هرپس با رفتهای دو برابر از هر کدام از نمونه خونهای تهیه شده انجام پذیرفت. یافته‌های به دست آمده از این پژوهش بیانگر این است که کلون‌های فوق‌بتهایی و یا به طور توأم توانستند ایمنی موشها را تحریک و ضمن ایجاد آنتی‌بادی خنثی کننده ویروس حاد در آنها، باعث پیدایش مقاومت در موشها برابر ویروس چالش شوند. تولید آنتی‌بادی پس از سومین تزریق به حداکثر مقدار خود رسید. موشهایی که به آنها ترکیبی از دو کلون تلقیح شده بود دارای عیار بالاتری از آنتی‌بادیهای خنثی کننده ویروس در مقایسه با دو گروهی که فقط یک کلون به آنها تزریق شده بود شدند، در حالی که در گروههای شاهد منفی آنتی‌بادی تولید نشد. در عین حال موشهای واکسینه در مقایسه با موشهای شاهد منفی توانستند مقاومت واضحی علیه ویروس چالش نشان دهند.

واژگان کلیدی: واکسن، ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک، گلیکوپروتئین D، کلون pcDNA3-gD-1، کلون pcDNA3-gB-1

مقدمه:

در این پژوهش از هرکدام از کلونهای pcDNA3-gB-1 یا pcDNA3-gD-1 حاوی ژن کد کننده گلیکوپروتئین D یا B از ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک (Herpes Simplex Virus type 1 (HSV-1) بود به طور مجزا و یا توأم به عنوان کاندیدا جهت ایمن‌زایی موش‌های BALB/c حساس استفاده شد. برای انجام این کار گروه‌های مختلف موشها به طور مجزا با هرکدام از کلونهای فوق و مخلوطی از آنها تزریق و نتیجه حاصل از این کار با نتایج به دست آمده از تزریق گروههای شاهد مثبت یا منفی که به ترتیب با سوش استاندارد ویروس HSV-1 به نام KOS، یا PBS یا پلاسمید فاقد ژن تزریق شده بودند مقایسه گشت. در پایان تمام گروههای ۶ گانه موش با ویروس حاد HSV-1 چالش شدند که نتیجه کار نشان دهنده توانایی کلونها در القاء ایمنی علیه ویروس حاد بود.

مواد و روشها:

موشها

موشهای BALB/c ماده با سن هشت تا دوازده هفته از مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی خریداری و در شرایط مطلوب نگهداری شدند.

سلول

در این پژوهش برای تکثیر ویروس از رده سلولهای پایدار کلیه گوساله استفاده شد. منشاء این سلولها از کلیه سالم یک گوساله نر ۱۰ روزه بوده است که توسط دکتر خدمتی در مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی با پاساژهای منظم و مکرر به رده پایدار تبدیل شده است.

ویروس‌های هرپس سیمپلکس تیپ یک HSV-1 و HSV-2 باعث طیف وسیعی از بیماری‌های انسانی می‌شوند که شامل عفونت‌های سیستمیک در نوزادان و افراد دارای ایمنی ناقص، عفونت‌های موضعی مانند استوماتیت التهاب قرنیه، عفونت در ارگان‌های تناسلی (Genitalis)، انسفالیت و عفونت‌های احشایی در میزبان با ایمنی سازشکار Immunocompromised می‌باشد (۱-۳). هر دو ویروس فوق توانایی منحصر به فردی در ایجاد خفتگی پس از عفونت اولیه در گانگلیون‌های افراد آلوده دارند. بنابراین همیشه این افراد در معرض خطر بیماری راجعه قرار دارند. علیرغم کوشش بسیار طی سالیان متمادی، واکسن پیشگیری کننده مؤثری علیه عفونت‌های HSV وجود ندارد (۴). مطالعات اخیر حکایت از آن دارد که ایمنی هومورال Humoral Immunity (HMI) و ایمنی با واسطه سلولی Mediated Immunity (CMI) از جمله مکانیسم‌های ایمنی مربوط به کنترل بیماری HSV هستند (۵).

گرچه واکسن ویروس زنده تخفیف حدت یافته (Live attenuated virus vaccine) می‌تواند HMI و CMI را القاء کند ولی نگرانیهایی در مورد مصرف این واکسن وجود دارد که از آن جمله می‌توان به توانایی ویروس واکسن در ایجاد خفتگی، فعال شدن مجدد یا تلفیق با ویروس بیماری‌زا، و پتانسیل انکوژن بودن تعدادی از ژن‌های HSV اشاره کرد. واکسن‌های ساب یونیت Subunit vaccines بی‌خطر هستند ولی نسبت به واکسن‌هایی که دارای ارگانیسم‌های تکثیر شونده هستند کارایی کمتری در القای CMI دارند. واکسن‌های DNA ای کاندیدای دیگری برای پیشگیری از بیماری‌های ناشی از HSV هستند. ایمن‌سازی با واکسن DNA ای که حاوی DNA پلاسمیدی کد کننده ژن‌های ویروسی تحت کنترل پروموتور قوی یوکاریوت است، بیان داخل سلولی پروتئین‌ها را به همراه دارد (۶).

ویروس

به طور مجزا در محیط آگاردار L.B دارای $50 \mu\text{g} / \text{ml}$ آمپی سیلین تکثیر داده شد.

ازدیاد پلاسمیدها، تعیین غلظت و هضم آنزیمی با

BamHI

به منظور استخراج و تخلیص کلونهای pcDNA3-gD-1 و pcDNA3-gB-1 در مقیاس کم از روش جوشاندن (Boiling Minipreparation) و در تولید انبوه از روش لیز قلیایی (Alkaline Lysis Maxipreparation) استفاده و غلظت DNA پلاسمیدی استخراج شده با استفاده از روش اسپکتوفوتومتری تعیین شد (۷-۸). به منظور تأیید وجود ژنهای gD-1 و gB-1 در پلاسمیدهای نوترکیب pcDNA3-gD-1 و pcDNA3-gB-1، محصولات مینی پرپ و ماکسی پرپ هر یک از این پلاسمیدها به طور جداگانه تحت هضم آنزیمی با BamHI قرار و فراورده‌های حاصل از آن بر روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز گشت.

تعیین MLD₅₀

(50 Percent Mouse Lethal Dose)

MLD₅₀ با استفاده از روش کربر (Karber) تعیین شد.

ایمن‌سازی موشهای BALB/c و خونگیری

موشهای BALB/c سالم و حساس در ۶ گروه ده‌تایی تقسیم و به هر یک از گروه‌ها یکی از مواد به شرح و میزان زیر تزریق شد:

الف) پلاسمید بیان کننده ژن gD-1 به میزان ۹۰

میکروگرم در ۱۰۰ میکرولیتر PBS

ویروس وحشی هرپس سیمپلکس تیپ ۱ از یک بیمار مبتلا به ضایعات جلدی - مخاطی در صورت جدا و تعیین هویت شده بود. برای کار با ویروس استاندارد نیز از سویه KOS استفاده شد. هر کدام از این ویروسها به طور مجزا دریاخته‌های پایدار کلیه گوساله تکثیر داده شد و پس از تعیین TCID₅₀ آنها، در فریزر -۷۰ درجه سانتیگراد نگهداری شد.

محیط کشت سلول

از محیط DMEM (Dulbecco's Modified Essential Medium) حاوی ۱۰ درصد سرم حرارت دیده گوساله برای تکثیر یاخته‌ها استفاده شد. پس از آلوده‌سازی یاخته‌ها با ویروس، مقدار سرم در محیط به ۲ درصد تقلیل داده شد.

باکتری

از سویه *DH5α* باکتری *E.coli* برای تکثیر پلاسمیدهای مورد استفاده در این پژوهش بهره‌گیری شد. این باکتری در محیط L.B فاقد آمپی سیلین رشد و تکثیر داده شد.

پلاسمیدها

از دو کلون pcDNA3-gD-1 و pcDNA3-gB-1 که به ترتیب واجد ژن کد کننده گلیکوپروتئین D ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک و ژن کد کننده گلیکوپروتئین B این ویروس بودند استفاده شد. هر کدام از این کلونها دارای پروموتور اولیه ویروس سیتومگال Cytomegalovirus (CMV) هستند که ژن مربوط در پائین دست آن جابجایی شده و هر دو کلون دارای ژن ایجاد مقاومت برابر آمپی سیلین می‌باشند. برای تکثیر این کلونها از سویه *DH5α* باکتری *E.coli* استفاده و باکتری میزبان با روش شوک حرارتی ترانسفورم گشت. سپس هر کدام از باکتریهای ترانسفورم شده

نتایج:

در شکل ۱ نتیجه الکتروفورز محصولات مینی‌پِرپ کلنی‌های واجد pcDNA3-gB-1 و pcDNA3-gD-1 پس از هضم آنزیمی با BamHI نشان داده شده است. همانطور که در این شکل مشاهده می‌شود هضم ژنوم هر کلون منجر به پیدایش دو قطعه DNA شده است. در ستون M استاندارد وزن ملکولی DNA و در هر کدام از ستونهای 1 و 2 دو باند مشاهده می‌شود. باندهای ستون 1 شامل قطعه pcDNA3 با طول ۵۴۴۶ و قطعه مربوط به ژن gB-1 با طول حدود ۲۸۵۰ نوکلئوتید و باندهای ستون 2 شامل قطعه مربوط به pcDNA3 با طول ۵۴۴۶ و باند مربوط به ژن gD-1 با طول حدود ۱۲۰۰ نوکلئوتید است.

همچنین نتایج حاصل از آزمایش خشتی سازی ویروس با نمونه‌های پلاسمای به دست آمده از موش‌های گروه تست و کنترل نشان داد که هر یک از ساختارهای DNA ای اعم از pcDNA3-gB-1، pcDNA3-gD-1 یا ترکیب توأم آنها قادر به القاء پاسخ آنتی‌بادی خشتی کننده در حیوانات تزریق شده هستند.

قبل از هر گونه تزریق، آزمایش نمونه‌های پلاسمای در رقت $\frac{1}{2}$ نشان داد که کلیه نمونه‌ها فاقد آنتی‌بادی اولیه ضد HSV-1 بودند. سطح آنتی‌بادی موجود در پلاسمای حیوانات بیست و یک روز پس از اولین، دومین و سومین تزریق pcDNA3-gB-1 به ترتیب برابر بود با: کمتر از $\frac{1}{8}$ ، بین $\frac{1}{16}$ تا $\frac{1}{64}$ ، و بین $\frac{1}{32}$ تا $\frac{1}{128}$. این سطح از آنتی‌بادی در پلاسمای پس از سه تزریق pcDNA3-gD-

1 به ترتیب برابر بود با: کمتر از $\frac{1}{8}$ ، بین $\frac{1}{32}$ تا $\frac{1}{128}$ ، و بین $\frac{1}{32}$ تا $\frac{1}{128}$. در حالی که حیوانات دریافت کننده ترکیب توأم این کلونها عیار بالاتری از آنتی‌بادی خشتی

ب (پلاسمید بیان کننده ژن gB-1 به میزان ۹۰ میکروگرم در ۱۰۰ میکرولیتر PBS

ج (ترکیبی از هر دو پلاسمید نو ترکیب فوق به میزان ۴۵ میکروگرم از هر فرآورده پلاسمیدی در ۱۰۰ میکرولیتر PBS

د (ویروس استاندارد HSV-1، سویه KOS با عیار 3000 TCID₅₀ ذره ویروس در ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون ویروسی

ه) pcDNA3 فاقد ژن به میزان ۹۰ میکروگرم در ۱۰۰ میکرولیتر PBS

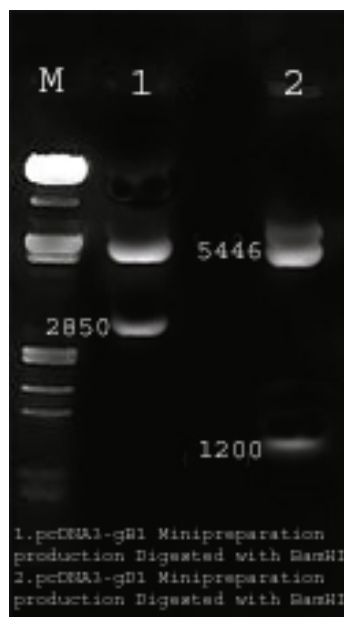
و) PBS به میزان ۱۰۰ میکرولیتر

ویروس استاندارد KOS از راه داخل صفاقی تزریق و بقیه مواد فوق از راه داخل عضلانی تلقیح شد. از همه موشها قبل از تلقیح خونگیری به عمل آمد و آزمایش خشتی سازی ویروس با پلاسمای آنها انجام شد.

هر یک از گروه‌ها تحت سه تزریق به فاصله بیست و یک روز از هم قرار گرفتند و قبل از تزریق اول و بیست و یک روز پس از هر تزریق، از موشها خونگیری و جهت ارزیابی عیار آنتی‌بادی خشتی کننده ویروس در آنها مورد آزمایش قرار گرفت. برای این کار ابتدا هر یک از نمونه‌های پلاسمای به مدت ۳۰ دقیقه در ۵۶ درجه سانتیگراد حرارت داده شدند و سپس رقت‌های دو برابر از هر پلاسمای با حجم مساوی از TCID₅₀ ۱۰۰ ویروس وحشی هرپس سیمپلکس تیپ یک مخلوط و پس از حرارت‌دهی در ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ دقیقه، به یاخته‌های پایدار کلیه گوساله تلقیح شد.

چالش موشهای BALB/c با ویروس وحشی HSV-1

هر یک از گروههای ۶ گانه مذکور با MLD₅₀ ۱/۶۵ از ویروس وحشی HSV-1 با تزریق داخل صفاقی چالش شدند.

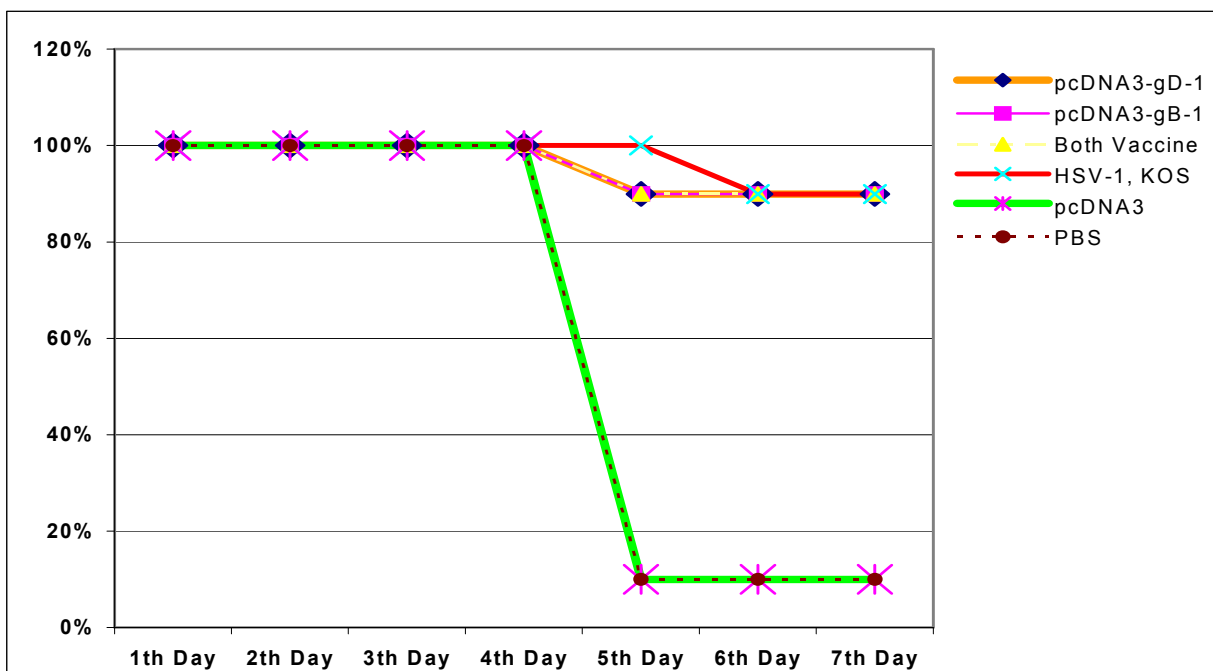


شکل ۱ - نتیجه الکتروفورز محصولات مینی پرپ کلنی های واجد pcDNA3-gB-1 و pcDNA3-gD-1 پس از هضم آنزیمی با BamHI
M: استاندارد وزن ملکولی DNA 1: pcDNA3-gB-1 هضم شده با آنزیم BamHI 2: pcDNA3-gD-1 هضم شده با آنزیم BamHI

همچنین پس از چند آزمایش مشخص شد که MLD50 $\frac{2}{2}$ برابر بود با: 20000000 TCID₅₀.
در راستای بررسی حفاظت موشهای BALB/c ایمن شده، برابر چالش با دُز کشنده ویروس وحشی، بیست و یک روز پس از آخرین تزریق، همه گروههای موشی با 1.65 MLD50 از ویروس وحشی HSV-1 چالش شدند. همانطور که در نمودار ۱ مشاهده می شود در حالی که ۹۰ درصد از موشهای گروههای (الف) تا (د) در گروههای آزمایش و شاهد مثبت تا هفت روز پس از چالش با ویروس حاد HSV-1 زنده ماندند، فقط ۱۰ درصد از حیوانات گروههای (ه) و (و) در گروههای شاهد منفی توانستند برابر ویروس چالش مقاومت لازم به ذکر است که در اکثر موارد علایم فلج پاهای عقب قبل از مرگ حیوان ظاهر شد

را نشان دادند که به ترتیب برابر بود با: کمتر از $\frac{1}{8}$ ، بین $\frac{1}{64}$ تا $\frac{1}{128}$ ، و بین $\frac{1}{64}$ تا $\frac{1}{256}$. گروه موشهای تزریق شده با ویروس استاندارد HSV-1 (سویه KOS) بالاترین سطح از آنتی بادی را تولید کردند که بعد از دومین و سومین تزریق به ترتیب بین $\frac{1}{16}$ تا $\frac{1}{128}$ ، و بین $\frac{1}{128}$ تا $\frac{1}{512}$ بود. گروههای (ه) و (و) فاقد آنتی بادی ضد HSV-1 قابل ردیابی در پلاسما بودند.
بیشترین تغییر در عیار آنتی بادی های حاصل از تزریق دُزهای یادآور اول و دوم مربوط به گروه دریافت کننده HSV-1 (سویه KOS) بوده و گروه دریافت کننده واکسن توام که پس از تزریق اولین دُز یادآور بالاترین عیار آنتی بادی را داشت پس از تزریق یادآور دوم، در رتبه دوم از لحاظ افزایش مقدار عیار آنتی بادی قرار گرفت.

نمودار ۱، درصد موشهای تزریق شده که پس از چالش با ویروس وحشی HSV-1 تا هفت روز زنده ماندند کنند.



ژن‌های مربوط به این پروتئین‌ها برای راه‌اندازی پاسخ ایمنی در موشهای حساس BALB/c استفاده شد. در این تحقیق پس از آزمایشهای دقیق و تکرار این آزمایشها نشان داده شد که ایمن‌سازی با هر یک از پلاسمیدهای کد کننده ژن‌های gD یا gB ویروس HSV-1، منجر به تولید آنتی‌بادی‌های خنثی کننده ویروس وحشی HSV-1 می‌شود ولی ایمن‌سازی با ترکیب توام این ساختارها مؤثرتر است. چنانکه متوسط عیار آنتی‌بادی در پلاسمای موشهای دریافت کننده واکسن توام پس از دومین تزریق بالاتر از گروههای واکسینه دریافت کننده هر یک از ساختارهای DNA ای فوق‌بنهایی بود، ولی این عیار در هیچیک از گروهها به آنچه که در گروه دریافت کننده ویروس استاندارد و فعال HSV-1 (سویه KOS) پس از سومین تزریق به دست آمد نرسید، زیرا در این گروه ویروس در یاخته‌های حساس موش تکثیر کرده و انبوهی از گلیکوپروتئین‌های سطحی ویروس تولید گشته بود. این یافته حاکی از آن است که وجود بیش از یک القاء کننده سیستم ایمنی میزبان می‌تواند

در انتها، ویروس HSV-1 از نمونه‌های مغز، ریه، غدد لنفاوی، ماهیچه‌ها، کبد و مغز موشهای تلف شده پس از چالش جدا شد.

بحث:

ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک دارای حدود ۱۳ پروتئین در پوشینه خود است که از این میان حداقل ۱۰ پروتئین به صورت گلیکوزیله می‌باشند که هرکدام وظیفه‌ای را برای فعالیت‌های تکثیری ویروس به عهده دارند. گلیکوپروتئین‌های D و B در مراحل اولیه اتصال و ورود ویروس HSV به سلول میزبان نقش دارند (۱ و ۹) و زن‌های این گلیکوپروتئین‌ها در HSV-1 و HSV-2 بسیار حفاظت شده‌اند (۱۰). با توجه به اهمیت افزونتر gD-1 و gB-1 در ایجاد عفونت در یاخته‌های حساس و القاء تولید آنتی‌بادی‌های خنثی کننده ویروس عفونی (۱۱-۱۴)، در این پژوهش از فراورده‌های نوترکیب حاوی

شده‌اند، قادرند بدن را وادار به تولید ایمنی محافظت کننده برابر چالش با دژ کشنده نمایند. ولیکن در تحقیقات بیشتر باید دید که آیا تزریق یک دژ واکسن باز هم برای ایجاد حفاظت در موشها کافی است.

تشکر و قدردانی:

از آقای پروفیسور همایون قیاسی، استاد UCLA و آقای دکتر کمال‌الدین خدمتی به ترتیب به خاطر تأمین کلونها و یاخته‌های پایدار BK سپاسگزاری می‌شود.

در پیدایش و افزایش آنتی‌بادی‌های خنثی کننده ویروس حاد مؤثر باشد که با توجه به اینکه محققین دیگر، از جمله قیاسی و همکاران توانسته‌اند با استفاده از بیش از دو گلیکوپروتئین باعث تولید بیشتر آنتی‌بادی‌های خنثی کننده در خون موشهای تحت آزمایش شوند بنابراین این نظریه تأیید می‌شود. نتایج حاصل از چالش موشهای ایمن شده نشان داد که در مقایسه با موشهای شاهد منفی، موشهای دریافت کننده کلونها و یا ویروس استاندارد توانستند مقاومت کاملاً آشکاری را برابر دژ کشنده ویروس وحشی HSV-1 از خود نشان دهند. این یافته‌ها بیانگر این واقعیت است که هر یک از گلیکوپروتئین‌های نوترکیب-gD یا 1 یا gB-1 و یا مجموع آنها که در بدن موش تولید

REFERENCES:

- Fields BN, Knipe DM, Howley PM, et al. *Fields Virology*. 4th ed U.S.A: Lippincott Raven Publisher, 2001, 2399 - 2509.
- Baghian A, Chouljenco VN, D'Auvergne O, et al. Protective immunity against lethal HSV-1 challenge in mice by nucleic acid-based immunization with herpes simplex virus type-1 genes specifying glycoproteins gB and gD. *J Med Microbiol* 2002; 51: 350 - 7.
- Horsburgn BC, Chen SH, Hu A, et al. Recurrent acyclovir-resistant herpes simplex in an immunocompromised patient: Can strain differences compensate for loss of thymidine kinase in pathogenesis? *J Infect Dis* 1998; 178: 618 - 25.
- Deshpande SP, Kumaraguru U, Rouse BT. Why do we lack an effective vaccine against herpes simplex virus infections? *Microbes Infection* 2000; 2: 973 - 8.
- Bernstein DI, Stanberry LR. Herpes simplex virus vaccines. *Vaccine* 1999; 17: 1681 - 9.
- Hanahan D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 1983; 166: 557 - 80.
- Karcher SJ. *Mol Biol - A Project Approach*. U.S.A: Academic Press, 1995,605.
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE. *Short protocols in molecular biology*. 3rd ed. U.S.A: John Willy and Sons,1995,505.
- Plummer G. Review of the identification and titration of antibodies to herpes simplex viruses type I and II in human sera. *Cancer Res* 1973; 33: 1469 - 76.
- Kosovsky J, Vojvodova A, Oravcova I, et al. Herpes Simplex Virus 1 (HSV-1) strain HSZP Glycoprotein B Gene: Comparison of mutations among strains differing in virulence. *Virus Genes* 2000; 20: 27 - 33.
- Ghiasi H, Nesburn AB, Kaiwar R, et al. Immunoselection of recombinant baculoviruses expressing high levels of biologically active herpes simplex virus type 1 glycoprotein D. *Arch Virol* 1991; 121: 163 - 178.
- Nesburn AB, Burke RL, Ghiasi H, et al. Vaccine therapy for ocular Herpes Simplex Virus (HSV) infection: Periocular vaccination reduces spontaneous ocular HSV type 1 shedding in latently infected rabbits. *J Virol* 1994; 68: 5084 - 92.
- Domingo C, Gadea I, Pardeiro M, et al. Immunological properties of a DNA plasmid encoding a chimeric protein of herpes simplex virus type 2 glycoprotein B and glycoprotein D. *Vaccine* 2003; 21: 3565 - 74.
- Bourne N, Milligan GN, Schleiss MR, et al. DNA immunization confers protective immunity on mice challenged intravaginally with herpes simplex virus type 2. *Vaccine* 1996; 14: 1230 - 4.