New Cell Mol Biotech
j.9/36 , 2019

Research article

Scan online to view this article

DNA immunization and viral load in vaccinated Trout following experimental infection with infectious pancreatic necrosis virus (IPNV)

Sohrab Ahmadivand[1], Mehdi Soltani[1*], Mahdi Behdani [2], Reza Hassanzade [3]

1- Department of Aquatic Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran
2- Biotechnology Research Center, Venom & Biotherapeutics Molecules Laboratory, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran
3- Central Veterinary Laboratory, Iran Veterinary Organization, Tehran, Iran

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 11:10 +0330 on Saturday February 15th 2020

Abstract

Aim and Background: This study was aimed to constructs and evaluate of a DNA vaccine against infectious pancreatic necrosis virus, the causative agent of a contagious viral disease (IPN) responsible for high mortalities in different fish species worldwide.

Materials and methods: The VP2 gene of a native IPNV isolate was cloned into an eukaryotic expression vector (pcDNA3.1) under the control of the cytomegalovirus (CMV) promoter. The recombinant plasmid was amplified in *Escherichia coli*, and verified using HindIII and XhoI endonuclease analysis. The expression of the antigen and ability of constructed vaccine to reduce viral load in survivors were intramuscularly evaluated in trout fry at doses of 2, 5 and 10 µg/fish.

Results: The expression of administrated antigen (VP2) was confirmed by RT-PCR on 30 days post-vaccination. The vaccine significantly decreased IPNV-VP4 transcripts as marker of viral load in the kidney and spleen tissues of the survivors on 45 days post-challenge.

Conclusion: This study confirms the ability of the constructed DNA vaccine to immunize rainbow trout against IPNV and decrease viral load in survivors, consequently prevention of asymptomatic carrier state and virus shedding.

Keywords: DNA vaccine, trout, IPNV, VP2, viral load, VP4

Corresponding author:
Department of Aquatic Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran
Email: msoltani@ut.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی مولکولی
دوره ۹ - شماره -۳۶ پائیز ۱۳۹۸

مقاله تحقیقی

برای مشاهده این مقاله به صورت آنلاین اسکن کنید

ایمنی‌زایی واکسن ژنتیکی DNA و کاهش بار ویروسی در قزل‌آلا پس از عفونت تجربی با ویروس نکروز عفونی پانکراس (IPNV)

سهراب احمدی‌وند[۱]، مهدی سلطانی*[۱]، مهدی بهدانی[۲]، رضا حسن‌زاده[۳]

۱-گروه بهداشت و بیماری‌های آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران
۲- بیوتکنولوژی پزشکی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
۳- مرکز تشخیص کنترل دارو و مواد بیولوژیک، سازمان دامپزشکی کشور، تهران، ایران

چکیده

سابقه و هدف: ویروس نکروز عفونی پانکراس (IPNV) عامل بیماری واگیردار IPN است که باعث تلفات شدید در گونه‌های مختلف آبزیان می‌گردد. این مطالعه با هدف ساخت و ارزیابی واکسن DNA علیه بیماری IPN در قزل‌آلا انجام گردیده است.

مواد و روش‌ها: در مطالعه حاضر واکسن DNA با استفاده از کد کردن آنتی‌ژن (VP2) سویه بومی ویروس IPNV در وکتور یوکاریوتی pcDNA 3.1 حاوی پروموتور سیتومگالوویروس(CMV) ایجاد و توسط باکتری *E. coli* کلون گردید. تأیید حضور آنتی‌ژن VP2 در وکتور و صحت واکنش لیگاسیون با استفاده از هضم آنزیمی توسط آنزیم‌های Hind III و XhoI صورت گرفت. کارایی واکسن DNA در بچه ماهیان قزل‌آلا با استفاده از تزریق عضلانی دوزهای ۲، ۵ و ۱۰ میکروگرم پلاسمید حاوی توالی آنتی‌ژن ارزیابی گردید. بیان آنتی‌ژن در بافت طحال ماهیان واکسینه شده و هم‌چنین قابلیت ایمنی‌زایی و کاهش بار ویروسی در ماهیان بازمانده از عفونت تجربی با استفاده از بیان ژن IPNV-VP4 بررسی گردید.

یافته‌ها: حضور آنتی‌ژن تجویز شده ۳۰ روز بعد از واکسیناسیون در بافت طحال ماهیان با استفاده واکنش RT-PCR تأیید گردید. هم‌چنین بیان نسبی ژن IPNV-VP4 (مارکر بار ویروسی) در بافت طحال و کلیه ماهیان واکسینه شده بازمانده در ۴۵ روز بعد از عفونت تجربی به‌طور معنی‌داری پایین‌تر از گروه‌های کنترل بود.

نتیجه‌گیری: این پژوهش نشان می‌دهد که واکسن DNA ساخته شده می‌تواند باعث ایمنی‌زایی قزل‌آلا علیه ویروس IPNV و کاهش بار ویروسی در ماهیان بازمانده از بیماری و درپی مانع از ایجاد حاملین بدون علائم بالینی و انتشار ویروس گردد.

واژه‌های کلیدی: آنتی‌ژن VP2، ویروس IPNV، واکسن DNA، قزل‌آلا، VP

مقدمه

ویروس نکروز عفونی پانکراس (IPNV) متعلق‌به جنس آکوا بیرنا ویروس[۱] و خانواده بیرنا وریده[۲]، عامل بیماری واگیردار به نام نکروز عفونی پانکراس[۳] درآبزیان است که باعث تلفات بالا به‌ویژه در بچه ماهیان نورس تازه به تغذیه افتاده و بچه ماهیان انگشت قد می‌گردد (۱). علاوه‌بر

[1] Aquabirnavirus
[2] Birnaviridae
[3] Infectious pancreatic necrosis

نویسنده مسئول:
گروه بهداشت و بیماری‌های آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران
پست الکترونیکی: msoltani@ut.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۲/۲۱
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۲/۳۰

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 11:10 +0330 on Saturday February 15th 2020

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 11:10 +0330 on Saturday February 15th 2020

مرگ و میر بالا و ضرر و زیان اقتصادی ناشی از آن، ماهیان بهبود یافته از بیماری IPN تمام طول زندگی حامل این ویروس بوده و آن را از راه انتقال عمودی و افقی و از طریق مدفوع و مواد تناسلی در زمان تکثیر به محیط دفع می‌کنند که این مسئله باعث ماندگاری ویروس در جمعیت ماهیان می‌شود (۲،۱). بیش از یک دهه است که این بیماری در ایران با سرعت پیش‌رونده‌ای به‌صورت یک بیماری همه‌گیر درآمده و باعث ضرر و زیان-های اقتصادی به صنعت در حال رشد قزل‌آلای کشور گردیده است. به‌طوری‌که بر اساس برآوردهای به‌عمل آمده بیش‌تر مزارع کشور درگیر این بیماری هستند و بیش‌تر بچه ماهیان تولیدی در اثر این بیماری تلف می‌شوند (۴،۳).

همانند دیگر بیماری‌های ویروسی اقدامات بهداشتی و واکسیناسیون تنها راه برای جلوگیری یا کنترل عفونت-های ناشی ازIPNV هستند. با این وجود تاکنون تلاش-های انجام شده برای تولید واکسن IPN نتایج یکسانی را در برنداشته واین بیماری هنوز به‌عنوان مشکل اصلی برای پیشرفت آبزی‌پروری در سرتاسر جهان مطرح است (۱). تاکنون از واکسن‌های کشته، تخفیف حدت یافته و تحت واحد (پروتئین نوترکیب) برای مصون‌سازی در برابر IPNV استفاده شده است که فقط برخی از آن‌ها به-صورت تجاری در دسترس بوده و بقیه هم فقط در سطح آزمایشگاهی مورد استفاده قرار گرفته‌اند(۵). برای مثال واکسن‌های غیرفعال کشته به‌صورت تزریقی و در دوزهای بالا و به‌صورت مکرر استفاده می‌شوند و به‌دلیل هزینه‌های بالای تولید و مصرف این نوع واکسن‌ها مقرون به‌صرفه نیستند و هم‌چنین تأثیری بر میزان ویروس در حاملین بدون علائم بالینی ندارند (۵،۶). هم‌چنین واکسن‌های تجاری، جدا از مشکلات بهداشتی و تولیدی، متناسب با سویه‌های بومی ایران نیز نیستند.

واکسن‌های DNA، پلاسمید (DNA) هستند که پروتئین آنتی‌ژن ویروسی را در سلول‌های میزبان توسط پروموتور سیتومگالوویروس انسانی (CMV) کد می‌کنند و همانند واکسن‌های زنده و یا تخفیف حدت یافته باعث تحریک ایمنی سلولی و هومورال می‌گردند (۷،۸،۹). به‌طوری‌که دارای قابلیت برانگیختن هر سه بازوی اصلی ایمنی اکتسابی شامل سلول‌های T کمک‌کننده، آنتی‌بادی‌ها و سلول‌های T سمی (CTLs) هستند (۷،۸،۹). واکسن‌های مبتنی‌بر DNA مزایای زیادی دیگری دارند ازجمله این‌که ایمن بوده و ریسک ایجاد بیماری مانند واکسن‌های زنده وجود ندارد (۷). به‌علاوه این واکسن‌ها به‌دلیل داشتن موتیف‌های سیتوزین-فسفات-گوانین (CpG) قابلیت برانگیختن ایمنی ذاتی را نیز دارند (۱۰)، تولید آن‌ها ارزان و شرایط نگهداری راحت بوده و هم‌چنین می‌توان حتی با یک بار تزریق (عضلانی) وکتور کدکننده آنتی‌ژن موجود را به‌راحتی دربرابر بیماری ایمن نمود (۸). ایمنی-زایی توسط DNA واکسن‌ها در ماهیان اولین بار علیه IHNV[4] در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان صورت گرفت که هم‌اکنون نیز (Apex-IHN®, Novartis Animal Health) به‌صورت تجاری در دسترس است (۱۱). در مورد IPNV ، مطالعه‌های اخیر نشان داده است که ژن VP2 کاندیدای مناسبی برای استفاده در طراحی واکسن DNA برای این ویروس است (۱۲،۹). هم‌چنین تجویز واکسن DNA در آزادماهیان بیش ۷۸٪ درصد محافظت را در برابر IPNV ایجاد کرده و باعث کاهش درصد حاملین ویروس نیز شده است (۱۲).

در پژوهش حاضر واکسن DNA کدکننده آنتی‌ژن VP2 سویه شایع ویروس IPNV در ایران (سروتیپ Sp) ایجاد شده و سپس از طریق تجویز به روش تزریق عضلانی در بچه ماهیان قزل‌آلا قابلیت ایمنی‌زایی و کاهش میزان ویروس در ماهیان بازمانده پس از عفونت تجربی با استفاده از بیان ژن VP4 ویروسIPNV ارزیابی شده است.

مواد و روش‌ها

۱- واکسن

واکسن DNA با استفاده توالی کدکننده پروتئین کپسید VP2 (آنتی‌ژن سطحی ویروس) در وکتور یوکاریوتی pcDNA 3.1 (Invitrogen) که دارای پروموتور سیتومگالوویروس انسانی (CMV) است مطابق دستورالعمل‌های قبلی ساخته شد (۹،۱۲). بدین‌منظور پس از انتخاب سویه بومی (سروتیپ Sp) توالی آنتی‌ژن سطحی ویروس (پروتئین کپسید، ۱۳۴۷ bp) در وکتور

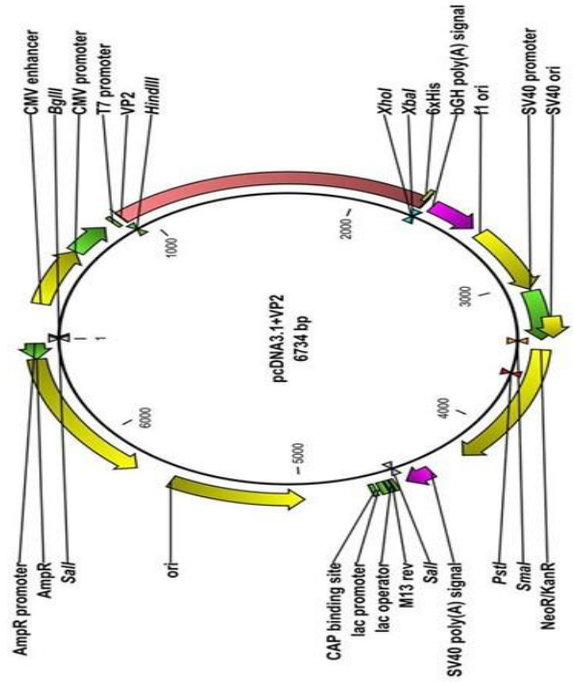
[4] Infectious hematopoietic necrosis virus

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 11:10 +0330 on Saturday February 15th 2020

pGHn سنتز و پس از برش توسط آنزیم‌های محدود کننده Hind III, XhoI، با استفاده از آنزیم DNA T4 Ligase لیگاسیون انجام و توالی کدکننده آنتی‌ژن در وکتور یوکاریوتی pcDNA.3.1 قرار داده شد (شکل ۱). سپس وکتور نوترکیب حاوی آنتی‌ژن (pcDNA-VP2) با استفاده از روش ترانسفورماسیون کلریدکلسیم وارد باکتری *E. Coli* سویه Top10 گردید و باکتری در محیط LB حاوی آمپی‌سیلین در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت و کلون شد (شکل ۲). پس از انتقال و ظهور کلون‌های نوترکیب بر روی محیط انتخابی و تأیید حضور آنتی‌ژن در وکتور نوترکیب با استفاده از Colony PCR و هضم آنزیمی، استخراج ناقل از کلون‌های نوترکیب انجام و با استفاده از کیت تجاری کیت MEGA شرکت Qiagene وکتور حاوی آنتی‌ژن موردنظر خالص‌سازی و کیفیت و کمیت آن تعیین گردید.



شکل ۱- دیاگرام وکتور pcDNA3.1 حاوی آنتی‌ژن (VP2) ایمن زای ویروس عامل بیماری نکروز عفونی پانکراس (IPN)

۲- واکسیناسیون

به‌منظور ارزیابی میزان ایمنی‌زایی، ماهیان ۴-۵ گرم قزل-آلا با استفاده از دوزهای ۲، ۵ و ۱۰ میکروگرم از واکسن DNA از طریق تزریق عظلانی واکسینه شده و در دمای ۱۳-۱۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۹۰ روز نگهداری شدند. به‌علاوه دو گروه هم به‌عنوان کنترل با پلاسمید فاقد با PBS [۵] تزریق شدند (هر گروه ۹۰ ماهی). بیان و حضور آنتی‌ژن در بافت طحال ماهیان واکسینه شده ۳۰ روز پس از ایمن‌سازی با استفاده از واکنش RT-PCR و پرایمرهای اختصاصی VP2 (جدول ۱) مطابق روش ارائه شده توسط Ahmadivand و همکاران (۹) ارزیابی گردید.

ژن (Acc. No)	محصول (bp)	دما سانتی‌گراد	پرایمر (5'-3')
VP4[1] (M18049)	84	59	F-AGGAGATGACATGTGCTACACCG R-CCAGCGAATATTTTCTCCACCA
EF-1 α[1] (AF498320)	150	59	F-GATCCAGAAGGAGGTCACCA R-TTACGTTCGACCTTCCATCC
VP2[2] (KX66515)	405	58	F-GTTCGACAAGCCATACGTCC R-GCTTGGTGATGTTCTCGGTC

جدول ۱- مشخصات مربوط به توالی و دمای ذوب پرایمرهای استفاده شده برای انجام واکنش RT-qPCR و RT-PCR

[۱] RT-qPCR; [۲] RT-PCR

۴- میزان بار ویروسی در ماهیان زنده مانده پس از عفونت تجربی

در روز ۳۰ پس از ایمن‌سازی تمامی گروه‌های واکسینه و کنترل مورد چالش ویروس IPNV به روش داخل صفاقی و با تیتر ۲×۱۰^{۶} $TCID_{50}$ قرار داده شدند. برای ردیابی میزان بار ویروسی در ماهیان زنده مانده، ۴۵ روز پس از عفونت تجربی از هر یک از گروه‌ها بافت‌های کلیه و طحال ۵ ماهی نمونه‌برداری و بیان نسبی ژن VP4 (پروتئاز) ویروس IPNV نسبت‌به ژن رفرنس *EF-1a* از طریق واکنش RT-qPCR بررسی شد (۹). برای انجام واکنش RT-qPCR با استفاده از کیت‌های تجاری مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده (Geneall, Korea) از نمونه‌های بافتی RNA استخراج و سپس cDNA سنتز گردید. در نهایت با استفاده از پرایمرهای اختصاصی(جدول ۱) واکنش در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۲/۵ میکرولیتر از معرف SYBR Green (Qiagen, Germany)، ۱/۵ میکرولیتر cDNA و ۰/۳میکرولیتر از هریک از پرایمرها و آب مقطر استریل

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 11:10 +0330 on Saturday February 15th 2020

درچاهک‌های ۴۸ تایی و با استفاده از سیستم Applied Biosystems انجام شد. برنامه واکنش، ابتدا در مرحله اول ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰ دقیقه و سپس با ۴۰ سیکل از ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ ثانیه و ۵۹ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۶۰ ثانیه ادامه یافت. سپس مرحله دوم شامل ۹۵ درجه سانتی‌گراد و ۵۹ درجه سانتی‌گراد هر کدام به‌مدت۶۰ ثانیه انجام گردید. در صورت منطبق بودن منحنی ذوب، تغییرات بیان ژن موردنظر با استفاده از Ctهای به‌دست آمده از ژن هدف با Ctهای حاصل از ژن رفرنس با استفاده از فرمول $2^{-\Delta Ct}$ محاسبه شد (۱۳).

۵- روش تجزیه و تحلیل داده‌ها

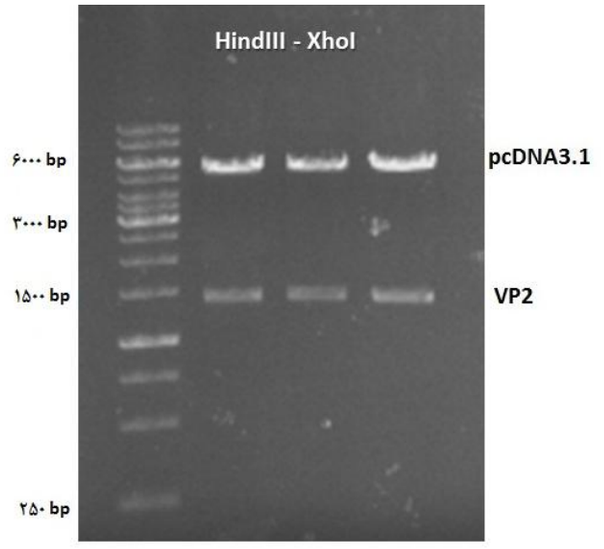
داده‌های به‌دست آمده به‌صورت میانگین ± انحراف استاندارد در سطح ۹۵٪ ($p<۰/۰۵$) توسط آنالیز واریانس یکطرفه(ANOVA) با استفاده از نرم‌افزار SPSS 23 با یکدیگر مقایسه شدند.

نتایج

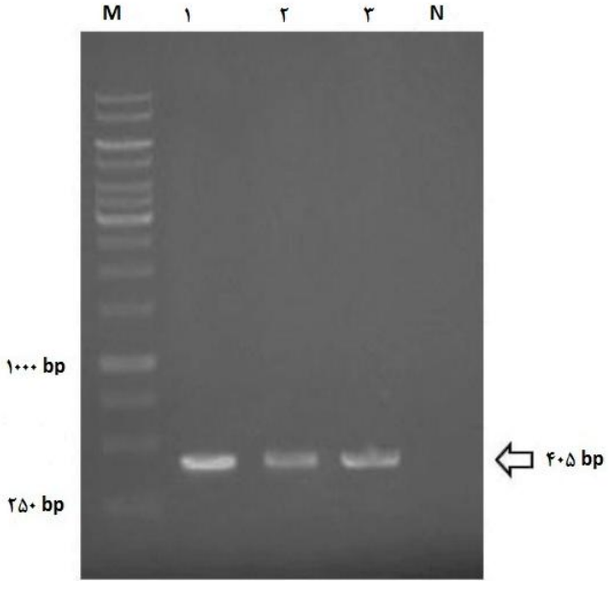
۱- واکسن

تأیید حضور آنتی‌ژن VP2 در وکتور و صحت واکنش لیگاسیون پس از تعیین کیفیت و کمیت پلاسمیدهای استخراج شده با استفاده از هضم آنزیمی توسط آنزیم‌های Hind III و XhoI صورت گرفت. پس از الکتروفورز قطعه مربوط به آنتی‌ژن VP2 و هم‌چنین وکتور pcDNA3.1 مشاهده شدند (شکل ۲).

به‌علاوه در روز ۳۰ بعد از واکسیناسیون بیان آنتی‌ژن VP2 در بافت طحال ماهیان تمامی گروه‌های ایمن شده توسط پرایمرهای اختصاصی (اندازه محصول ۴۰۵ bp) با انجام واکنش RT-PCR مطالعه گردید. پس از انجام واکنش باند مربوط به آنتی‌ژن VP2 در نمونه‌های بافتی بررسی شده مشاهده گردید که نشان دهنده توزیع و بیان مناسب واکسن تجویز شده است (شکل ۳).



شکل ۲- هضم آنزیمی وکتور حاوی آنتی‌ژن با استفاده از آنزیم‌های برشی Hind III و Xho I جهت تأیید صحت لیگاسیون و حضور آنتی‌ژن VP2 در وکتور یوکاریوتی pcDNA3.1. محصول واکنش بر روی ژل آگارز ۱٪ و مارکر 1000 bp آنالیز شده است.



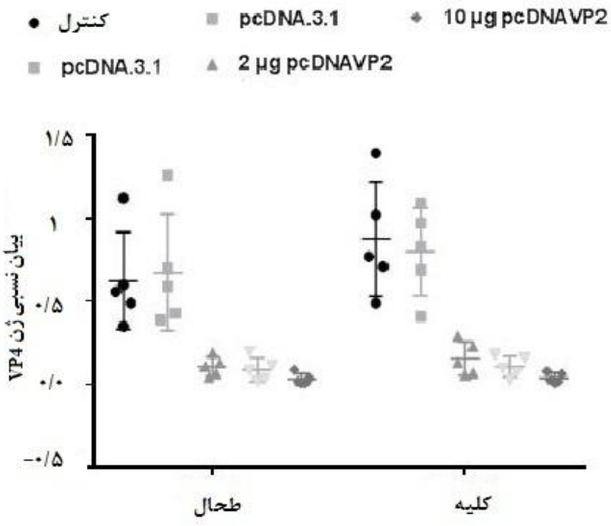
شکل ۳- بررسی محصول واکنش RT-PCR جهت تأیید بیان و حضور آنتی‌ژن VP2 در بافت‌های ماهیان ایمن شده با واکسن DNA یک ماه پس از واکسیناسیون. M: (مارکر ۱۰۰۰ bp)، N: کنترل منفی (وکتور pCDNA.3.1)، ستون‌های ۱، ۲ و ۳ به‌ترتیب نمونه بافت طحال ماهیان ایمن شده با دوز ۲، ۵ و ۱۰ میکروگرم واکسن است. ژل آگارز ۱٪ استفاده شده است.

www.SID.ir

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 11:10 +0330 on Saturday February 15th 2020

۳- میزان بار ویروسی[6]

برای ردیابی میزان ویروس بیان نسبی ژن VP4 ویروس IPNV در بافت کلیه و طحال ماهیان واکسینه شده و کنترل زنده مانده از بیماری در روز ۴۵ بعد از عفونت تجربی با استفاده RT-qPCR تعیین گردید. بر اساس نتایج بیان نسبی ژن VP4 ویروس در ماهیان واکسینه شده به‌صورت معنی‌داری کم‌تر از گروه‌های واکسینه نشده بود ($p<۰/۰۵$) . میزان بیان ژن VP4 در بافت کلیه ماهیان واکسینه نشده به‌ترتیب ۱۰، ۲۵ و ۴۱ برابر بیش‌تر از میزان اندازه‌گیری شده در هر یک از گروه‌های ایمن شده با دوزهای۲، ۵ و۱۰ میکروگرم بود. هم‌چنین میزان بیان نسبی آن در بافت کلیه کمی بیش‌تر از بافت طحال گروه‌ها واکسینه شده و کنترل بود (شکل ۴).



شکل ۴- بیان نسبی ژن VP4 ویروس IPNV در بافت کلیه و طحال ماهیان واکسینه شده و کنترل زنده مانده در روز ۴۵ پس از عفونت تجربی. در روز۳۰ پس از ایمن‌سازی با استفاده از تزریق عظلانی واکسن (pcDNA3-VP2) به میزان۲، ۵ و ۱۰ میکروگرم به ازای هر ماهی، تمامی گروه‌های واکسینه و کنترل (IPNV) در دو تکرار (۳۰ ماهی) مورد چالش ویروسIPNV با تیتر $TCID_{50}$ $۱۰^{۶}$ × ۲ به ازای هر ماهی به‌صورت تزریق داخل صفاقی قرار گرفتند. بیان نسبی ژن VP4ویروس نسبت‌به ژن رفرنس *EF-1a* در در بافت کلیه و طحال (۵ ماهی) ماهیان زنده مانده هریک از گروه‌ها براساس فرمول $2^{-\Delta CT}$ محاسبه شده است.

بحث

بیماری ویروسی نکروز عفونی پانکراس (IPN) نوعی بیماری واگیردار در ماهیان از جمله قزل‌آلا است که هر ساله باعث تلفات و زیان‌های اقتصادی زیادی در دنیا و ایران می‌شود. به‌علاوه ماهیان بهبود یافته از بیماری IPN تمام طول زندگی حامل این ویروس بوده و آن را از راه عمودی و افقی به سایر ماهیان انتقال می‌دهند که در گسترش بیماری و تداخل با سایر بیماری‌ها نقش مهمی دارد (۱،۲).

در حال حاضر بیش تر واکسن‌های تجاری در دسترس علیه IPNV به‌صورت ویروس کشته و تعداد کمی به‌صورت پروتئین نوترکیب هستند که به‌صورت داخل صفاقی تزریق می‌گردند. اگرچه واکسن‌های کشته و نوترکیب بیش‌تر باعث برانگیختن پاسخ ایمنی هومورال نسبت‌به عوامل ویروسی می‌گردند در حالی‌که این پاسخ برای جلوگیری از ایجاد حاملین بدون علائم بالینی کافی نیست (۶،۱۴).

ازین‌رو حتی با وجود پیشرفت‌های اخیر در واکسیناسیون ماهیان و دردسترس بودن تعدادی واکسن تجاری حتی در مزارعی که از این واکسن‌ها استفاده می‌کنند، بیماری می‌تواند بروز یابد و کنترل آن اهمیت بسیار زیادی دارد (۶،۱۴).

در مطالعه حاضر واکسن DNA با استفاده از سویه بومی ویروس عامل بیماری IPN با استفاده از کد کردن آنتی‌ژن (VP2) ویروس در وکتور یوکاریوتی pcDNA3.1 حاوی پروموتور CMV (با قابلیت بیان مستقیم آنتی‌ژن در میزبان) ایجاد و توسط باکتری *E. Coli* کلون گردید. به‌علاوه بچه ماهیان ۵-۴ گرم قزل‌آلا با استفاده از تزریق عضلانی دوزهای ۲، ۵ و ۱۰ میکروگرم واکسن ایمن شده و پس از عفونت تجربی میزان بار ویروس در ماهیان بازمانده ارزیابی گردید.

تززریق داخل عضلانی از مؤثرترین و رایج‌ترین راه‌های استفاده از DNA واکسن‌ها در ماهیان است. به‌طوری‌که تزریق داخل عضلانی ۱۰ نانوگرم واکسن DNA به قزل‌آلای ۲-۴ گرمی باعث ایجاد ایمنی مناسب در برابر رابدوویروس‌های آبزیان (IHNV و VHSV) می‌شود (۸). مکانیسم ایمنی‌زایی واکسن‌های DNA هنوز به‌طور کامل مشخص نشده‌اند ولی به‌نظر می‌رسد که پلاسمید DNA به‌وسیله سلول‌های عضلانی و منوسیت‌ها جذب شده و سپس آنتی‌ژن را به‌عنوان یک آنتی‌ژن داخلی همراه با مولکول MHC کلاس I روی سلول عضلانی و یا همراه

[6] Viral load

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 11:10 +0330 on Saturday February 15th 2020

MHC کلاس I و II روی سلول‌های ارائه‌کننده آنتی‌ژن بیان می‌کنند که درپی باعث تحریک ایمنی سلولی و هومورال می‌شوند (۷).

در آبزی‌پروری، اکثر تحقیقات DNA واکسن‌ها روی ویروس‌ها انجام شده است و دلیل این کار اهمیت این پاتوژن‌ها، فقدان واکسن‌های کارآمد و قیمت بالای تولید واکسن‌های کشته ویروسی است (۸). در مورد IPNV، مطالعه‌های اخیر نشان داده است که ژن VP2 کاندیدای مناسبی برای استفاده در طراحی واکسن DNA برای این ویروس است (۹،۱۲). در بررسی کنونی نیز واکسن DNA علیه بیماری ویروسی IPN با کد کردن آنتی‌ژن VP2 در وکتور pcDNA3.1 ایجادگردید. حضور آنتی‌ژن VP2در وکتور و صحت واکنش لیگاسیون با هضم آنزیمی تأیید گردید. هم‌چنین ۳۰روز بعد از ایمن‌سازی حضور آنتی‌ژن در بافت طحال تمامی گروه‌های واکسینه شده با استفاده از واکنش RT-PCR تأیید گردید که نشان‌دهنده قرار گیری مناسب آنتی‌ژن در وکتور، بیان مناسب آن از طریق پروموتور CMV و در نهایت انتقال آنتی‌ژن از طریق خون به سایر اندام‌های بدن است که می‌تواند موجب برانگیختن پاسخ‌های ایمنی و محافظت میزبان در برابر ویروس گردد (۷).

به‌طور مشابه در مطاالعه‌های قبلی نیز پخش و بیان آنتی‌ژن VP2 ویروسIPNV (۹،۱۲) ، آنتی‌ژن G ویروس IHNV (۱۵) در بافت‌های مختلف ماهیان قزل‌آلای ایمن شده با واکسن DNA انکپسوله شده با میکروذرات آلژینات‌سدیم و نانوذرات کیتوزان-تری پلی‌فسفات و هم-چنین بیان پروتئین کپسید نوداویروس در ماهی باس آسیایی ایمن شده با واکسن DNA انکپسوله شده با نانوذرات کیتوزان گزارش شده است (۱۶).

در مطالعه‌های قبلی (۹،۱۲) بیان ژن VP4 به‌عنوان مارکر بار ویروسی در ماهیان واکسینه شده علیه بیماری ویروسی IPN به کار برده شده است. در این مطالعه نیز بیان ژن IPNV-VP4 در ماهیان زنده مانده از چالش ویروسی بررسی گردید. بر اساس نتایج بیان ژن VP4 در بافت طحال ماهیان واکسینه شده به‌طور معنی‌داری کم‌تر از گروه کنترل بود که نشان‌دهنده کاهش بار ویروسی و قابلیت واکسن ساخته شده برای تحریک پاسخ ایمنی سلولی به‌ویژه سلول‌های سلول‌های T سمی (CTLs) و جلوگیری از ایجاد حاملین بدون علامت پس از بروز بیماری است که از مزیت‌های واکسن DNA نسبت‌به واکسن‌های تجاری دردسترس است و با مطالعه‌های قبلی نیز هم‌خوانی دارد (۹،۱۲،۱۵،۱۷).

بر اساس نتایج هر سه دوز (۲، ۵ و۱۰ میکروگرم) به-صورت معنی‌داری باعث کاهش بیان ژن مارکر (VP4) و میزان بار ویروسی شده اند. بنابرین با در نظر گرفتن هزینه تولید و نتایج ایمنی‌زایی، پایین‌ترین دوز استفاده شده یعنی ۲ میکروگرم/ ماهی می‌تواند برای واکسیناسیون پیشنهاد گردد.

نتیجه‌گیری

بر اساس نتایج به‌طور خلاصه می‌توان عنوان نمود که آنتی‌ژنVP2 از طریق وکتور یوکاریوتی pcDNA3.1 به طور مستقیم در بافت‌های میزبان بیان شده و تجویز آن در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان می‌تواند باعث ایمنی‌زایی و کاهش قابل توجه بار ویروسی در ماهیان بازمانده از بیماری (براساس نتایج بیان ژن IPNV-VP4) گردد و درپی از گسترش ویروس توسط حاملین بدون علائم بالینی جلوگیری نماید.

سپاسگزاری

این مطالعه با حمایت معاونت پژوهشی دانشگاه تهران و قطب بهداشت و بیماری‌های آبزیان کشور و با همکاری انستیتو پاستور ایران و سازمان دامپزشکی کشور به اجرا در آمده که تشکر و قدردانی خود را از آنان اعلام می-داریم. هم‌چنین از حمایت‌های جناب آقای علی احمدی-وند برای انجام پروژه تقدیر و تشکر می‌نماییم.

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 11:10 +0330 on Saturday February 15th 2020

منابع

1.Evensen Ø, Santi N. Infectious pancreatic necrosis virus In: Mahy BWJ Van Regenmortel M.H.V (Ed.) Encyclopedia of virology (3rd edn). Academic Press Oxford, 2008; pp. 83−89.

2.Rodriguez Saint-Jean S, Borrego JJ, Perez-Prieto SI. Infectious pancreatic necrosis virus: biology pathogenesis and diagnostic methods. Adv Virus Res, 2003; 62: 113-165.

3.Soltani M, Rouholahi S, Ebrahimzadeh Mousavi HA, Abdi K, Zargar A, Mohamadian S. Genetic diversity of Infectious Pancreatic Necrosis Virus (IPNV) in farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Iran. Bulletin European Association of Fish Pathologists, 2015; 34: 155-164.

4.Ahmadivand S, Soltani M, Mardani K, Shokrpoor S, Rahmati-Holasoo H, Mokhtari A, Hasanzadeh R. Isolation and identification of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) from farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Iran. Acta Trop, 2016; 156: 30-36.

5.Gudding R, Lillehaug A. Evensen Ø. Fish Vaccination. Ed. by John Wiley & Sons Ltd Chichester UK. 2014. doi: 10.1002/9781118806913.ch22.

6.Munang'andu HM, Sandtro A, Mutoloki S, Brudeseth BE, Santi N, Evensen O. Immunogenicity and cross protective ability of the central VP2 amino acids of infectious pancreatic necrosis virus in Atlantic salmon (*Salmo salar L.*). 2013. PLoS One 8:e54263.

7.Tonheim TCh, Bøgwald J, Dalmo RA. What happens to the DNA vaccine in fish? A review of current knowledge. Fish & Shellfish Immunol, 2008; 25:1-18.

8.Evensen Ø, Leong JA, DNA vaccines against viral diseases of farmed fish. Fish Shellfish Immunol. 2013; 35: 1751-1758.

9.Ahmadivand S, Soltani M, Behdani M, Evensen O, Alirahimi E, Hassanzadeh R, Soltani E. Oral DNA vaccines based on CS-TPP nanoparticles and alginate microparticles confer high protection against infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) infection in trout. Dev Comp Immunol, 2017; 74: 178-189.

10.Pietretti D, Wiegertjes GF. Ligand specificities of Toll-like receptors in fish: indications from infection studies. Dev. Comp. Immunol, 2014; 43: 205-222.

11. Alonso M, Leong JA. Licensed DNA Vaccines against Infectious Hematopoietic Necrosis Virus (IHNV). Recent Pat DNA Gene Seq, 2013; 7: 62-65.

12. Ballesteros NA, Rodriguez Saint-Jean S, Perez-Prieto SI. Food pellets as an effective delivery method for a DNA vaccine against infectious pancreatic necrosis virus in rainbow trout (*Oncorhynchus mykissWalbaum*). Fish Shellfish Immunol, 2014; 37: 220–228.

13. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2DDCt method. Methods, 2001; 25: 402-408.

14. Bootland LM, Dobos P, Stevenson RMW. Immunization of adult brook trout Salvelinus fontinalis (Mitchill) fails to prevent the infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) carrier state. J Fish Dis, 1995; 18: 449-458.

15. Ballesteros NA, Alonso M, Saint-Jean SR, Perez-Prieto SI. An oral DNA vaccine against infectious haematopoietic necrosis virus (IHNV) encapsulated in alginate microspheres induces dose-

www.SID.ir

dependent immune responses and significant protection in rainbow trout (*Oncorrhynchus mykiss*). Fish Shellfish Immunol, 2015; 45: 877-88.

16. Vimal S, Abdul Majeed S, Nambi KSN, Madan N, Farook MA, Venkatesan C, Taju G, Venu S, Subburaj R, Thirunavukkarasu AR, Sahul Hameed AS. Delivery of DNA vaccine using Chitosan-Tripolyphosphate (CS-TPP) nanoparticles in Asian sea bass *Lates calcarifer* (Bloch 1790) for protection against nodavirus infection. Aquaculture, 2014; 421: 240–246.

17. Ballesteros NA, Rodriguez Saint-Jean S, Perez-Prieto SI. Immune responses to oral pcDNA-VP2 vaccine in relation to infectious pancreatic necrosis virus carrier state in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Vet Immunol Immunopathol, 2015; 165: 127-137.

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 11:10 +0330 on Saturday February 15th 2020

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 11:10 +0330 on Saturday February 15th 2020

www.SID.ir