Archive of SID

DOI: 10.22092/vj.2019.116524.1396
شماره ۱۲۴ پاییز ۱۳۹۸
تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های بیولوژیک

پروتئین‌های ایمنی‌زای مشترک بین سروتیپ‌های پاستورلا مولتوسیدا: کاندیدهائی برای بهبود واکسن

• **سعید عطایی کچویی (نویسنده مسئول)**
بخش تحقیق و تشخیص بیماریهای طیور، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، ترویج و آموزش کشاورزی، کرج، ایران
• **نجمه معتمد**
بخش تحقیق و تشخیص بیماریهای طیور، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، ترویج و آموزش کشاورزی، کرج، ایران
• **صبا عطایی کچویی**
دپارتمان سلولي مولكول، دانشكده علوم زيستي، دانشگاه خوارزمي، كرج، ايران
تاریخ دریافت: ۱۳۹۶-۰۹-۲۶ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷-۱۱-۱۴
Emali: ataei111@hotmail.com

چکیده

وجود تنوع در سروتیپ‌های عامل بیماری وبای مرغان از یک سو و عدم ایجاد مقاومت کامل محافظت‌کننده به وسیله کاربرد واکسن‌های مونووالان در برابر تیپ‌های دیگر، تحقیقات در راستای شناسائی عوامل ایمنی‌زائی که بین این تیپ‌های مختلف مشترک باشند را الزام‌آور کرده است. به منظور شناسائي پروتئين‌هاي ايمن يزاي مشترك بين سروتيپ‌هاي A1،A3،A4 پاستورلا مولتوسيدا، ايمونوبلاتينگ آنتي‌ژن خام سو نيكه در برابر آنتي‌سرم مورد بررسي قرار گرفت. ۳۵ قطعه جوجه ۲ ماهه در ۷ گروه ۵ تائي تقسيم و با سروتيپ‌هاي مذكور به صورت مونووالان و تري والان در چهار نوبت با فواصل زماني ۱۴ روز بين نوبت اول و دوم و ۱۰ روز بين نوبت دوم و سوم و سوم و چهارم تزريق شدند. اولين تزريق آنتي‌ژن‌ها با آدجوان كامل فروند، تزريقات دوم و سوم با آدجوان ناقص فروند و تزريق چهارم بدون آدجوان انجام گرفت. از ميان پروتئين‌هائي كه قادر به ايجاد پاسخ هومورال قابل تعيين با ايمونو بلاتينگ بودند دست كم پنج عامل ايمني‌زا هستند كه در بين اين سه سروتيپ تحت مطالعه مشابه هستند به شكلي كه آنتي‌بادي‌هاي توليد شده طي پاسخ ايمني به ايمن‌سازي جوجه‌ها با سوسپانسيون پيكره باكتري قادر به واكنش با هر يک از هر سه سروتيپ مي‌باشد. مولكول ۳۹ كيلو دالتوني كه به شكل بارزتري واكنش داده بود، به عنوان كانديدا جهت ادامه مطالعات و توليد واكسن معرفي مي‌گردد.

کلمات کلیدی: پاستورلا مولتوسیدا، وبای مرغان، پروتئین‌های ایمنی‌زای مشترک، واکسن

www.SID.ir

Archive of SID

Veterinary Researches & Biological Products No 124 pp: 38-46

Title:Cross-reactive immunogenic proteins of *P.multocida* serotypes: candidates for improving vaccine

By: Ataei Kachooei, S., (Corresponding Author) Department of Avian Diseases, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Karaj, Iran. Motamed, N., Department of Avian Diseases, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Karaj, Iran. and Ataei Kachooei, S., Department of Cellular Molecular Biology, Faculty of Life Sciences, Kharazmi University, Karaj, Iran.

Received: 2017-12-17 Accepted: 2019-02-03

Emali: ataei111@hotmail.com

Because *P.multocida* serotypes have no cross protection Several studies have been focused on identification of immunogenic molecules shared between different serotypes in the hope of production of a wide-range vaccine effective against all causative serotypes. In the present study, crude sonicated cell extracts of *P. multocida* serotypes A:1, A:3, and A:4 were immunoblotted against chicken hyper-immune sera in order to identify cross-reactive immunogenic proteins of them. 35 chickens aged two months randomly divided into 7 groups of five and were injected by monovalent or trivalent serotypes with time intervals of 14 days between first and second injections, and 10 days between second and third and third to fourth injections. The first inoculum was adjuvanted with complete Freund adjuvant (CFA), the second and third inocula were adjuvanted with incomplete Freund adjuvant (IFA), and the fourth one was without any adjuvant. Results showed that there are at least 5 cross-reactive immunogenic proteins in serotypes A:1, A:3, and A:4, in a way that antibodies produced by chicken in an immune response to immunization with whole cell Pasteurella suspensions are able to react with each of the 3 serotypes. These cross-reactive agents are proteins (or at least in some parts) with the molecular weight of 39, 40, 37, 53, and 30 K.Da. The 39 K.Da band was the most prominent immunoblott and introduced as candidate for molecular identification and future vaccine studies.

Keywords: *Pasteurella multocida*; fowl cholera; cross-reactive immunogen, vaccine

مقدمه

بيماري پاستورلوز طيور *(Pasteurellosis)* يا وباي مرغان *(Fowl Cholera)* از بيماري‌هاي باكتريائي طيور و پرندگان وحشي است. بيماري توسط سروتيپ‌هاي مختلف باكتري گرم منفي پاستورلا مولتوسيدا *(Pasteurella multocida)* ايجاد مي‌شود. وباي مرغان يك بيماري اوليه محسوب و شكل حاد آن منجر به سپتي سمي و مرگ پرنده مي‌شود. اشكال مزمن بيماري نوع غالب آن در پرورش صنعتي ماكيان مي‌باشد. بيماري وباي مرغان عامل خسارت اقتصادي قابل توجهي در مزارع صنعتي پرورش طيور و نيز در مزارع سنتي پرورش طيور است. سروتيپ‌هاي كپسولي A, B, D, E و F به عنوان عامل بيماري در پرندگان گزارش شده است، هر چند به جز سروتيپ E ساير سروتيپ‌ها از ميزبان‌هاي پرنده جدا شده است. طيف وسيعي از پرندگان به اين بيماري حساس مي‌باشند. سروتيپ‌هاي A:۱ و A:۳ و A:۴ از معمول‌ترين عوامل ايجادكننده وباي مرغان در بيشتر كشورها مي‌باشند، هر چند تمامي ۱۶ سروتيپ سوماتيك پاستورلا مولتوسيدا، و حتي برخي تيپ‌هاي كپسولي D نيز به عنوان عامل بيماري گزارش شده‌اند (۸ و ۱۷). اولين موارد شناسائي اين بيماري به گذشته بسيار دور يعني سال ۱۶۰۰ ميلادي بر مي‌گردد. بسياري از مطالعات ابتدائي بر روي شناخت نقش ميكروارگانيسم‌ها در ايجاد بيماري‌هاي عفوني بر روي اين بيماري صورت گرفته است. استفاده از تكنيك كاهش حدت باكتري‌ها براي تهيه واكسن زنده به منظور ايمن‌سازي در برابر بيماري بيش از يكصد سال پيش توسط دانشمند فرانسوي لوئي پاستور بر روي عامل اين بيماري يعني پاستورلا مولتوسيدا انجام شد. پيشرفت‌ها و مطالعات زيادی از آن زمان تا كنون بر روی واكسن‌های پاستورلا مولتوسيدا صورت گرفته است. جيائو و همكاران (۲۰۱۶) استفاده از موتانتی كه در ژن phoP نقص دارد، در ايمنی‌زايی و به عنوان واكسن پيشنهاد كردند ايشان ايمنی‌زايی موتانت phoPΔ را در برابر چالش با سويه‌های حاد بررسی و ۵۴٪ حفاظت گزارش كردند (۱۳). گانگ و همكاران (۲۰۱۶) ايمنی‌زايی واكسن نوتركيب ژن فيمبريای پاستورلا مولتوسيدا (rPtfA) سروتيپ A1 در مقايسه با واكسن زنده تخفيف حدت يافته را بررسی و سطح ايمنی را به ترتيب ۴۵٪ و ۷۵٪ گزارش كردند. با اين حال به دليل تنوع در سروتيپ و عدم ايجاد ايمنی متقاطع ناشی از واكسيناسيون با يک سروتيپ عليه سروتيپ ديگر شناسايی پروتئين‌های ايمنی‌زای مشترک برای استفاده در يک دوز واكسن مونووالان با هدف رسيدن به حداكثر ايمنی‌زايی از اهميت بالايی برخوردار است (۹).

www.SID.ir

Archive of SID

بيشتر سويه‌هاي پاستورلا داراي كپسولي پلي ساكاريدي بر روي سطح خود هستند كه از نظر سرولوژيك مي‌توان آن‌ها را به سروتيپ‌هاي A, B, D, E و F تقسيم‌بندي كرد. كپسول از پلي ساكاريدها، ليپوپلي ساكاريدها (LPS) و برخي انواع پروتئين‌ها تشكيل شده است. آنتي‌ژني در كپسول پاستورلا مولتوسيدا كه عامل ويژگي و اختصاصيت سروتيپ‌ها است جزء مواد ليپوپلي ساكاريدي است. در آزمايش هماگلوتيناسيون پاسيو كه به عنوان روشي آزمايشي براي سروتايپينگ كپسولي به كار مي‌رود، هر دو مواد ليپوپلي ساكاريدي و پلي‌ساكاريدي بر روي گلبول‌هاي قرمز جذب مي‌شوند و در آزمايش نقش كليدي دارند (۱۹). در مورد پاستورلاهاي ايجادكننده وباي مرغان سويه‌هاي كپسول‌دار و بدون كپسول سروتيپ A(strain X-37) داراي قدرت ايمني‌زائي يكساني در ايمن‌سازي پرندگان در برابر بيماري وباي مرغان هستند. در سروتيپ A كپسول داراي هيالورونيك اسيد مي‌باشد، باور بر اين است كه اين ماده در بيماري‌زائي اين سويه نقش مهمي بازي مي‌كند (۲۴). البته در مورد سروتيپ‌هاي كپسولي B:۲ نشان داده شده است كه موتانت‌هاي بدون كپسول بيماري‌زائي خود را از دست داده و حتي از آن‌ها به عنوان واكسن زنده استفاده شده است (۴). به طور كلي باور بر اين است كه LPS داراي نقش مهمي در بيماري‌زائي سويه‌هاي مختلف پاستورلا مي‌باشد. LPS قادر به ايجاد شوك در ميزبان مبتلا به عفونت مي‌باشد. در بين گونه‌هاي مختلف پرندگان، بوقلمون نسبتا در برابر آثار كشنده LPS جدا شده از سويه‌هاي عامل وباي مرغان داراي مقاومت بيشتري است. LPS ناخالص جدا شده از باكتري مي‌تواند مقاومت در برابر بيماري ايجاد كند ولي LPS خالص به تنهائي از ايمني‌زائي برخوردار نيست (۱۶). از پاستورلا مولتوسيداي سروتيپ A عامل ايجادكننده وباي مرغان موتانتي تهيه شده است كه توانائي سنتز آنزيم هپتوزيل ترانسفراز (Heptosylteransferase) را از دست داده بود. اين آنزيم در سنتز LPS لازم است كه در حضور آن قند هپتوز به LPS افزوده مي‌شود. بيماري‌زائي اين موتانت براي مرغ بسيار كمتر بوده و از اين روي به عنوان كانديداي مناسب واكسن زنده براي بيماري وباي مرغان شناخته شد (۱۱). باور عمومي بر اين است كه بسياري از عوامل حدت باكتري‌ها بر روي سطح آن‌ها قرار دارند و تعدادي از آن‌ها در اتصال به سلول‌هاي ميزبان و تهاجم به آن نقش‌هاي كليدي بازي مي‌كنند. علاوه بر اين پروتئين‌هاى غشاى خارجى (OMPs) از آن‌جائي كه طي فرآيند عفونت در تماس مستقيم با سيستم ايمني ميزبان هستند مي‌توانند به شكل اجزاي ايمني‌زاي باكتري‌هاي گرم منفي عمل كنند (۱۰). از اين روي، OMPs بيشترين توجه را در مطالعات مربوط به بررسي تعامل ميزبان و عوامل بيماريزا به خود اختصاص داده‌اند. بيش از ۷۰ پروتئين غشاي خارجي يا پروتئين وابسته به غشاي خارجي در پاستورلا مولتوسيدا شناسائي شده است (۱۲).

در سروتيپ‌هاي A:۱ و A:۳ پاستورلا مولتوسيدا عامل وباي مرغان پروتئيني ۳۹kDa شناسائي شده است كه قادر به ايجاد مقاومت در برابر عفونت مي‌Aباشد. اين مولكول ۳۹kDa ليپو پروتئين بوده و به نام *Plp B* (*Pasteurella lipoprotein B*) نام‌گذاري شده است (۲۴). پروتئين ۳۹kDa كه با ساخت كپسول در ارتباط است به عنوان عامل چسبندگي معرفي شده است (۱ و ۳).

در ايران بيماری پاستورلوز طيور شايع بوده و از سال‌ها پيش به منظور پيشگيری واكسن كشته باكترين همراه آدجوان هيدروكسيد آلومينيوم مصرف می‌شود. اين واكسن كه در موسسه تحقيقات واكسن و سرم سازی رازی توليد می‌شود حاوی سروتيپ A:۱، سروتيپ غالب در كشور، می‌باشد. در ايران گزارش‌هائی حاكی از وجود ساير سروتيپ‌ها از جمله ۳A و ۴A وجود دارد. از جمله علل ضعف واكسن‌های كشته پاستورلوز طيور محافظت هومولوگ می‌باشد در نتيجه واكسيناسيون با هر سروتيپ فقط قادر به ايجاد ايمنی در برابر همان سروتيپ است و در مقابل ساير سروتيپ‌ها مقاومت ايجاد نمی‌كند به همين دليل در برخي كشورها در تهيه واكسن پاستورلوز طيور از سه سروتيپ مختلف استفاده می‌گردد (واكسن تري والان). شناسائی عوامل ايمنی‌زای مشترک بين سروتيپ‌های مختلف امكان افزايش ايمنی‌زائی واكسن با به كارگيری آن‌ها در واكسن

جدول ۱- برنامه ايمن سازي جوجه ها

شماره گروه	مشخصات گروه	تعداد جوجه
۱	سويه A1 + Adj	۵
۲	سويه A3 + Adj	۵
۳	سويه A4 + Adj	۵
۴	A4 , A3, A1 + Adj	۵
۵	سويه A4 , A3, A1	۵
۶	سويهA1 + ژل آلوم (واكسن توليدی موسسه)	۵
۷	كنترل	۹

www.SID.ir

Archive of SID

و همچنین امکان تولید واکسن مونووالان با توانائی ایجاد ایمنی در برابر سروتیپ‌های مختلف را ایجاد می‌کند. در این مطالعه سه سروتیپ شایع پاستورلا در ایران مورد بررسی قرار گرفت تا در حد امکان مقدمه شناسائی برخی از پروتئین‌های ایمنی‌زا ی مشترک بین این سه سروتیپ فراهم گردد.

مواد و روش کار

تعداد ۳۵ جوجه SPF ۱ ماهه به صورت رندم در ۷ گروه ۵ تائي تقسيم و در قفس‌های مجزای شماره‌گذاری شده نگهداري شدند. به منظور تهیه آنتی‌سرم، ایمن‌سازی جوجه‌های گروه ۱ و ۲ و ۳ به ترتیب با سویه‌هاي A:۱ و A:۳ و A:۴ به همراه آدجوان انجام شد. به گروه ۴ هر سه سویه باهم به همراه آدجوان و به جوجه‌های گروه ۵ هر سه سویه بدون ادجوان تزریق شد. يكي از بچ‌هاي واكسن كشته پاستورلوز سروتیپ A:۱ موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی انتخاب و در گروه ۶ استفاده شد. تزریقات به روش داخل عضلاني (IM) داخل عضله سینه در چهار نوبت با فواصل زماني ۱۴ روز بین تزریق اول و دوم و ۱۰ روز بین تزریقات دوم و سوم و همچنین سوم و چهارم انجام شد. اولین تزریق آنتی‌ژن‌ها با آدجوان کامل فروند (CFA) وتزریقات دوم و سوم با آدجوان ناقص فروند و تزریق چهارم بدون آدجوان انجام گردید (جدول ۱ و ۲). در گروه کنترل تزریقات مطابق جدول زمان‌بندي انجام گردید ولي ماده تزریقي فقط شامل نرمال سالین بود.

خون‌گیري

یک هفته پس از آخرین تزریق برای تهیه سرم هایپر ایمیون خونگیري از جوجه‌هاي واکسینه و کنترل (غیر واکسینه) از ورید بال صورت گرفت. سرم خون‌هاي گرفته شده جدا و تا زمان انجام آزمایش‌هاي مربوطه در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداري شد.

تهیه عصاره سلولی CE (cell lysate extract)

سویه‌هاي A:۱ و A:۳ و A:۴ پاستورلا مولتوسیدا بر روي محیط آبگوشت تریپتوز فسفات (TPB) کشت داده شدند. از کشت‌هاي ۱۸ ساعته پس از اطمینان از خلوص با رنگ‌آمیزي گرم و مشاهده مستقیم با میکروسکوپ نوري، پیکره باکتري با استفاده از بافر فسفات (PBS) سه مرتبه شستشو و جدا شد. سوپانسیون غلیظ باکتریائي از اجرام شسته شده تهیه و با استفاده از سونیکاتور سونیکه شد تا پیکره باکتري‌ها شکسته شوند. سوسپانسیون براي سه بار هر بار ۶۰ ثانیه سونیکه شد و در هر بار بین سونیکه کردن بر روي ظرف یخ خنك گردید. سلول‌هاي شکسته شده طي سونیکاسیون به مدت ۳۰ دقیقه در دماي ۴ درجه سانتی‌گراد با شتاب ۳۰۰۰xg سانتریفیوژ شدند. در مرحله بعد مایع‌روئي جدا و با فیلتر ۰٫۲ µm فیلتر شد. این سوسپانسیون به دست آمده حاوی تقریبا تمامی مولکول‌ها و مواد تشکیل‌دهنده باکتری است که در شرایط کشت in-vitro ساخته می‌شود. این عصاره به دست آمده به نام عصاره تام (cell lysate extract) و به اختصار CE نام‌گذاری می‌شود. در ادامه مطالعه در تمامی مراحل از این عصاره استفاده شد.

ژل الکتروفورز (SDS-PAGE)

به منظور آنالیز آنتی‌ژن CE تهیه شده مطابق روش مرسوم SDS-PAGE (Laemmli, 1970) انجام شد. وزن مولکولي باندهای مورد نظر با روش مقایسه مکان باندهاي مارکر تخمین زده شد.

ایمونوبلات Immunoblotting

به منظور شناسائي باندهای آنتی‌ژنی بر روي ژل، این باندهاي پلي پپتیدي به روي ممبران منتقل شدند. ممبران‌ها به مدت يك شب با رقت ۲۵۰/۱ انتی‌سرم‌هاي جوجه‌ها در دماي ۴ درجه سانتی‌گراد شیکر شدند. پس از سه بار شستشو ممبران با آنتی‌سرم اختصاصي جوجه Anti-Chicken IgY (IgG)–Peroxidase antibody produced in rabbit) (Sigma)) با رقت ۱۰۰۰/۱ به مدت ۱ ساعت بر روي شیکر انکوبه شد. در مرحله بعد پس از سه مرتبه شستشو با بافر ممبران در محلول حاوي سوبسترا (3-diaminobenzidine tetrahydrochloride) در Tris بافر حاوي پراکسید هیدروژن قرار گرفت. پس از ظهور باندها با افزودن آب فراوان واکنش متوقف و ممبران خشك و مطالعه شد.

نتایج

الکتروفورز عصاره سلولی CE سروتیپ‌های A:۱ و A:۳ و A:۴ پاستورلا

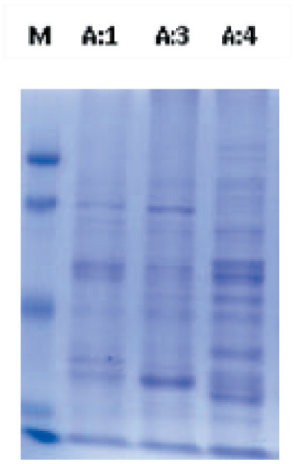
جدول۲- زمانبندی تزریقات

شماره تزریق	تاریخ تزریق(روز آزمایش)	مشخصات تزریق
۱	(صفر)	Ag+ CFA
۲	(۱۴)	Ag+ Adj ناقص
۳	(۲۱)	Ag+ Adj ناقص
۴	(۳۱)	Ag بدون Adj

www.SID.ir

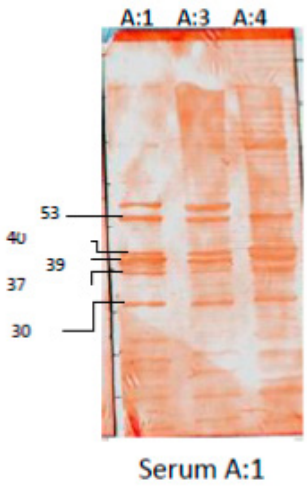
Archive of SID

مولتوسیدا عامل بیماری وبای مرغان بر روی ژل پلی آکریلامید (SDS-PAGE) انجام گردید. در این روش که طی آن مولکول‌های پروتئینی جداسازی و قابل روئیت می‌شوند همانگونه که انتظار می‌رفت تعداد زیادی باندهای مختلف مشاهده گردید (شکل ۱). همانگونه که در تصویر مشاهده می‌شود غالب باندها در هر سه سروتیپ مشابه هستند. با این وجود تعدادی از باندها در سروتیپ‌های تحت مطالعه متفاوت هستند. این تفاوت به دو صورت مشاهده می‌شود. صورت اول اینکه برخی باندها در سروتیپی مشاهده می‌شود که در سایر سروتیپ‌ها قابل مشاهده نیست. صورت دوم اینکه تفاوت در برخی باندهای مشترک به شکل پهنای باند یا شدت رنگ‌پذیری باند قابل مشاهده است که در واقع نشانه تفاوت در میزان پروتئین مربوط است.



شکل ۱- پروفایل عصاره سلولي پاستورلا مولتوسیدا سروتیپ هاي A:۱ و A:۳ و A:۴ بر روي ژل ۱۰٪ SDS-PAGE رنگ آمیزي شده با آبي کوماسي

ایمونوبلات Immunoblotting باندهای جدا شده بر روی ژل در برابر سرم‌های مختلف جوجه‌های تزریق شده با سروتیپ‌های A:۱ و A:۳ و A:۴ به صورت مونووالان و با هر سه سروتیپ به صورت تریوالان انجام گردید. باندهای بدست آمده برای هر سه سروتیپ مختلف بر روی ژل با سرم جوجه‌های تزریق شده با سروتیپ‌های مختلف نیز بلات گردیدند. این بخش از آزمایش به منظور شناسائی آنتی‌ژن‌های مشابه موجود در سروتیپ‌های مختلف است که توانائی تحریک سیستم ایمنی جوجه برای ایجاد آنتی‌بادی‌هائی با توانائی باند شدن با آنتی‌ژن‌های غیر همسان را دارد. این بخش از آزمایش بر روی سرم جوجه‌های تزریق شده با سوسپانسیون تزریقی حاوی هر سه سروتیپ نیز انجام گردید. علاوه بر این بر روی جوجه‌های تزریق شده با واکسن پاستورلوز طیور تولیدی موسسه رازی که واکسن مونووالان حاوی سروتیپ A:۱ است نیز انجام گردید. ایمونوبلات سروتیپ‌های تحت مطالعه در برابر سرم نرمال جوجه هم انجام شد. شناسائی این باندها از این رو دارای اهمیت است که بتوان آن‌ها را از باندهای اختصاصی تفریق نمود. باندهای شناسائی شده در آزمایش ایمونوبلات با سرم نرمال از نگاه این مطالعه دارای اهمیت نبوده و علیرغم مشاهده آن‌ها در سایر آزمایش‌های بلاتینگ با سرم‌های جوجه‌های ایمن به دلیل غیر اختصاصی بودن از لیست باندهای مورد مطالعه حذف و بی‌اهمیت



شکل ۲- ایمونوبلات عصاره سلولي CE پاستورلا مولتوسیدا سروتیپ هاي A:۱ و A:۳ و A:۴ با استفاده از سرم جوجه واکسینه با سروتیپ A:۱

تلقی شدند.

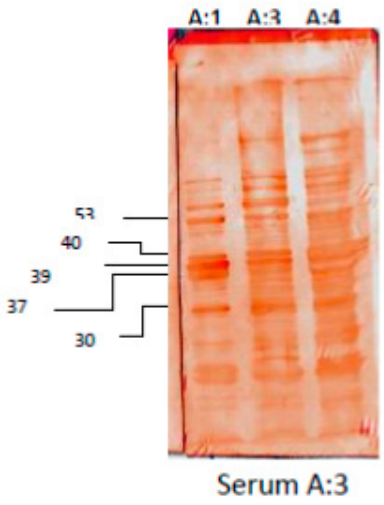
شکل ۲ ایمونو بلات باندهای سه سروتیپ مورد مطالعه را در برابر سرم جوجه ایمن شده با سروتیپ A:۱ را نشان می‌دهد. همانگونه که در تصویر مشاهده می‌شود تعداد قابل توجهی باند (حدود ۲۰ باند) در هر سروتیپ مشاهده می‌شود. از مجموعه باندهای مشاهده شده که واکنشی قوی داشته و در هر سه سروتیپ قابل مشاهده است سه باند با وزن مولکولی تقریبی ۳۹ ، ۴۰، و ۳۷ کیلو دالتون است. علاوه بر این باندی قوی با وزن مولکولی تقریبی ۵۳ کیلو دالتون مشاهده می‌شود که در هر سه سروتیپ واکنش نسبتا همسانی دارند. با توجه به شکل باند مشترک قابل توجه در محدوده وزن مولکولی ۳۰ کیلو دالتون مشاهده می‌شود که در هر سه سروتیپ واکنشی با قدرت مشابه نشان داده است. باندهای مشترک دیگری در محدوده بالای ۶۰ کیلو دالتون قابل مشاهده است که به دلیل مشاهده آن‌ها در ایمونوبلات با سرم نرمال از نگاه این مطالعه قابل توجه نمی‌باشد و جزء باندهای اختصاصی مشترک تلقی نمی‌شود.

شکل ۳ ایمونوبلات باندهای سه سروتیپ مورد مطالعه را در برابر سرم جوجه ایمن شده با سروتیپ A:۳ را نشان می‌دهد. جالب توجه اینکه مشابه آزمایش ایمونوبلات با سرم جوجه‌های ایمن شده با سروتیپ A:۱ در این آزمایش سه باند با وزن مولکولی تقریبی ۳۹ ، ۴۰، و ۳۷ کیلو دالتون به شکل شاخصی قابل مشاهده است. از بین این سه باند، باند ۳۹ کیلو دالتونی واکنشی قویتر در مقایسه با دو باند دیگر یعنی ۴۰ و ۳۷ کیلو دالتونی نشان داده است. در این آزمایش نیز مشابه آزمایش

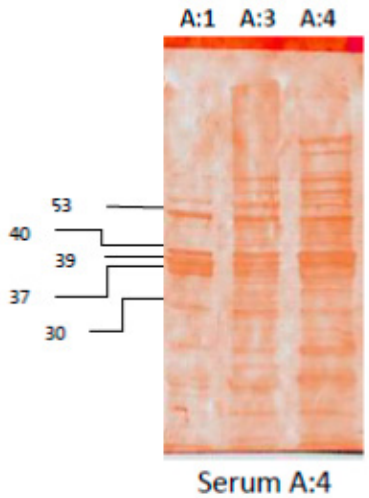
www.SID.ir

Archive of SID

قبل باند ۵۳ کیلو دالتونی در هر سه سروتیپ مشاهده می‌شود. این باند نیز مانند باند ۳۹ کیلو دالتونی در مقایسه با سایر باندها از قدرت واکنش بالائی برخوردار است. در این آزمایش نیز مانند آزمایش قبل باند مشترک قابل توجهی در محدوده وزن مولکولی ۳۰ کیلو دالتون مشاهده می‌شود که در هر سه سروتیپ قابل مشاهده است. باندی با واکنش نسبتا قوی در محدوده وزن مولکولی ۵۳ کیلو دالتون در هر سه سروتیپ



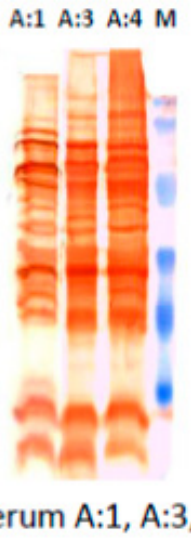
شکل ۳- ایمونوبلات عصاره سلولی CE پاستورلا مولتوسیدا سروتیپ های A:۱ و A:۳ و A:۴ با استفاده از سرم جوجه واکسینه با سروتیپ A:۳



شکل ۴- ایمونوبلات عصاره سلولی CE پاستورلا مولتوسیدا سروتیپ های A:۱ و A:۳ و A:۴ با استفاده از سرم جوجه واکسینه با سروتیپ A:۴

مشاهده می‌شود. این باند در آزمایش قبل نیز مشاهده شد.

شکل ۴ ایمونوبلات باندهای سه سروتیپ مورد مطالعه را در برابر سرم جوجه ایمن شده با سروتیپ 4A نشان می‌دهد. در این آزمایش نیز مانند دو آزمایش پیش سه باند با وزن مولکولی تقریبی ۳۹ ، ۴۰، و ۳۷ کیلو دالتون به شکل شاخصی قابل مشاهده است. از میان این سه باند، باند ۴۰ و ۳۹ کیلو دالتونی نسبت به سایر باندها واکنش قویتری از خود نشان داده‌اند. در این آزمایش نیز مشابه دو آزمایش قبل باند ۵۳ کیلو دالتونی در هر سه سروتیپ مشاهده می‌شود. این باند در مقایسه با سایر باندها قدرت واکنش بالاتری دارد. در این آزمایش نیز باند مشترکی در محدوده وزن مولکولی ۳۰ کیلو دالتون مشاهده می‌شود که در هر سه سروتیپ



شکل ۵- ایمونوبلات عصاره سلولی CE پاستورلا مولتوسیدا سروتیپ های A:۱ و A:۳ و A:۴ با استفاده از سرم جوجه واکسینه با سوسپانسیون تری والان حاوی سروتیپ های A:۱ و A:۳ و A:۴.

قابل مشاهده است.

شکل ۵ ایمونو بلات باندهای سه سروتیپ مورد مطالعه را در برابر سرم جوجه ایمن‌شده با سوسپانسیون تریوالان حاوی سروتیپ‌های A:۱ و A:۳ و A:۴ نشان می‌دهد. همان‌گونه که در تصویر مشاهده می‌شود تعداد باندها در مقایسه با ایمونوبلات‌های با استفاده از سرم‌های مونووالان بیشتر است. در این آزمایش باندی با واکنشی بسیار قوی در محدوده وزن مولکولی ۳۰ کیلو دالتون در هر سه سروتیپ مشاهده می‌شود که قوی‌ترین واکنش را نسبت به سایر باندها به خود اختصاص داده است. در این آزمایش نیز باندهای ۳۹ و ۴۰ کیلو دالتونی قابل مشاهده است. هر چند به دلیل تراکم و تعدد، باندها به وضوح آزمایش‌های قبل قابل تفریق نیستند. این وضعیت به ویژه در محدوده وزن مولکولی بالای ۵۰ بیشتر به چشم می‌خورد. در محدوده وزن مولکولی پائین‌تر از ۲۰ کیلودالتون دو باند پهن غیر واضح مشاهده می‌شود که احتمالا مجموعه‌ای از چندین باند با وزن‌های مولکولی نزدیک هم است که بر روی ژل به طور کامل از هم جدا نشده بوده‌اند و قابل تمیز نیستند. در این محدوده وزن مولکولی مجموعه‌ای از باندهای واکنش غیر اختصاصی

www.SID.ir

Archive of SID

در سرم نرمال نیز مشاهده می‌شود که از اهمیت آن‌ها به عنوان عوامل ایمنی‌زای اختصاصی می‌کاهد.

بحث

امروزه شناسائی مولکول‌های مختلف باکتری‌های بیماری‌زا و تعیین نقش هر یک در بیماری‌زائی و ایجاد ایمنی محافظت‌کننده در میزبان از اهمیت بسیار زیادی برخوردار است. از میان مولکول‌های موثر در ایجاد ایمنی پروتئین‌ها دارای جایگاه ویژه‌ای هستند (۱۲). پاستورلا مولتوسیدا از جمله عوامل بیماری‌زائی است که در دامپزشکی به لحاظ تنوع بیماری‌های ایجاد کرده از اهمیت بسیار بالائی برخوردار است. شناسائی ژنوم کامل پاستورلا مولتوسیدا عامل وبای مرغان در سال ۲۰۰۱ کمک شایانی به شناسائی و یا پیش‌بینی مولکول‌های مختلف و نقش آن‌ها در فرآیند بیماری کرده است (۱۵). وبای مرغان از جمله بیماری است که سروتیپ‌های مختلف A این باکتری به فرم‌های مختلف حاد و مزمن در طیف وسیعی از پرندگان ایجاد می‌کند. علیرغم گذشت بیش از یک قرن از ابداع واکسن برای پیشگیری از این بیماری و اخیرا کشف بزرگ تعیین سکانس کامل ژنوم این بیماری هنوز تحقیقات در جهت شناسائی عوامل ایمنی‌زا به شکل گسترده‌ای ادامه دارد. از سوی دیگر شناسائی مولکول‌های مختلف و نقش هر یک در ایجاد مراحل مختلف تهاجم میزبان و بیماری ادامه دارد. وجود تنوع در سروتیپ‌های عامل بیماری وبای مرغان از یک سو و عدم ایجاد مقاومت کامل محافظت کننده به وسیله کاربرد واکسن‌های مونووالان در برابر تیپ‌های دیگر تحقیقات در راستای شناسائی عوامل ایمنی‌زائی که بین این تیپ‌های مختلف مشترک باشند را الزام آور کرده است. نتایج این مطالعه نشان داد که از میان پروتئین‌هائی که قادر به ایجاد پاسخ هومورال قابل تعیین با ایمونو بلاتینگ بودند دست کم پنج عامل ایمنی‌زا هستند که در بین این سه سروتیپ تحت مطالعه مشابه هستند به شکلی که آنتی‌بادی‌های تولید شده طی پاسخ ایمنی به ایمن‌سازی جوجه‌ها قادر به واکنش به هر یک از سه سروتیپ می‌باشد. این عوامل ایمنی‌زای مشترک در آزمایش ایمونوبلاتینگ با سرم مثبت جوجه‌ها پروتئین‌هائی یا مولکول‌هائی که در بخش دارای دست کم ساختار پروتئینی با وزن مولکولی ۳۹، ۴۰، ۳۷، ۵۳، و ۳۰ کیلو دالتونی است قرار می‌گرفتند. از بین این پنج مولکول، مولکول ۳۹ کیلو دالتونی به شکل بارزتری در آزمایش‌های ایمونوبلات مشاهده شد.

در مورد باکتری‌های گرم منفی غشاء خارجی وظایف حیاتی بر عهده دارد که تقریبا غالب آن‌ها توسط پروتئین‌های موجود در این غشاء انجام می‌شود. از آنجائی‌که این پروتئین‌های غشاء خارجی (OMP) تماس مستقیم با محیط داخل بدن میزبان دارد اعتقاد بر این است که این پروتئین‌ها دارای نقش تعیین کننده در مکانیسم‌های ورود و بیماری‌زائی می‌باشند. علاوه بر این از آنجائی‌که این مولکول‌ها در دسترس و تماس مستقیم با سیستم ایمنی میزبان هستند عمدتا توسط سیستم ایمنی شناسائی می‌شوند و پاسخ ایمنی به ویژه پاسخ هومورال بر علیه این مولکول‌ها ایجاد می‌شود (۵) از این رو مطالعات به سمت شناسائی پروتئین‌های غشاء خارجی پاستورلا به عنوان عوامل ایمنی‌زا متمرکز شده‌اند. به عنوان مثال در مطالعه‌ای مشابه بر روی پاستورلا مولتوسیدا سروتیپ B:۲ عامل سپتی سمی همراژیک گاو و گاومیش تعدادی از این پروتئین‌ها شناسائی شدند و دو تا از پروتئین‌هاي OMP با وزن مولکولی ۵۰ و۳۷ کیلو دالتون به عنوان OMP ایمونوژن قوی معرفی گردید (۲).

توجه به پروتئین‌های غشائی سروتیپ‌های عامل پاستورلوز طیور به عنوان عوامل ایمنی‌زا در مطالعات اخیر این حوزه معطوف شده است (۱، ۲۲). علاوه بر این به دلیل اختصاصی بودن ایمنی در بین سروتیپ‌های مختلف توجه محققین به شناسائی پروتئین‌های ایمنی‌زای مشترک بین سروتیپ‌ها معطوف گردید. این موضوع به این امید است تا بتوان با بکارگیری این پروتئین‌های ایمنی‌زای مشترک به واکسنی دست یافت تا بتوان با تزریق آن ایمنی محافظت‌کننده در برابر سروتیپ‌های مختلف ایجاد کرد (۲۰، ۲۴). این موضوع هدفی است که در مطالعه حاضر نیز دنبال شد.

یافته‌های مطالعه حاضر مبنی بر شناسائی پنج پروتئین ایمنی‌زا که در بین سه سروتیپ A:۱ و A:۳ و A:۴ مشترک است با مطالعه‌ای دیگر همخوانی دارد. در مطالعه طباطبائی و همکاران نیز پنج پروتئین OMP شناسائی شدند که خواص ایمنی متقاطع (cross-protective) از خود نشان دادند (۲۳). البته در این مطالعه سروتیپ A:۳ انجام گرفته بود و از مجموع پنج باند شناسائي شده دو باند ۳۹ و ۵۲ کیلو دالتون آن با مطالعه ما مشابهت داشت. این مطالعه مهم‌ترین باند شناسائي شده را با روش مس اسپکترومتري OMP PlpB شناسائي و به عنوان پروتئین با خواص ايمني متقاطع معرفي کرد.

نتایج مطالعه حاضر با مطالعه‌ای جامع که به تازگی انجام شد نیز مطابقت دارد. در مطالعه‌ای که در استرالیا انجام شد تعداد ۷۱ مولکول کاندیدای واکسن ساب یونیت با روش نوترکیب تهیه شد و قدرت ایمنی‌زائی آن‌ها بر روی جوجه و موش ارزیابی شد. نتیجه جالب توجه این مطالعه اینکه از میان ۷۱ مولکول کاندیدای واکسن که با تکنولوژی واکسینولوژی معکوس (reverse vaccinology) انتخاب شدند فقط یک پروتئین نوترکیب قادر به ایجاد ایمنی محافظت کننده بود. این پروتئین که جزء OMP است *PlpE* نامیده می‌شود و دارای وزن مولکولی ۳۹ کیلو دالتون است. این مطالعه همچنین نشان داد که این پروتئین ۳۹ کیلودالتونی که از سروتیپ A:۱ تهیه شده بود قادر به ایجاد ایمنی در برابر چالنج با سروتیپ هترولوگ A:۳ نیز می‌باشد (۱۲). این یافته همخوانی بسیار نزدیکی با مطالعه ما داشت که طی آن نشان داده شد که پروتئینی ۳۹ کیلو دالتونی جزء عوامل ایمنی‌زائی بود که بین هر سه سروتیپ تحت مطالعه مشترک بود.

مطالعات قبلي PlpE را در جوجه و موش به آنتي‌ژن محافظت‌کننده شناسائي کرده بود (۳۴). در مورد Mannheimia haemolytica نیز *PlpE* به عنوان مولکولي بسیار محافظت‌کننده در گاو شناسائي شده است و جالب اینکه بین این دو مولکول *PlpE* قرابت سکانس آمینو اسیدي به میزان ۲۲٪ وجود دارد (۷). *PlpE* مولکولي OMP است که داراي قطعه لیپیدي است و در مانهمیا همولیتیکا در سطح خارجي باکتري قرار دارد و در فرآیند کشته شدن باکتري توسط سیستم کمپلمان نقش دارد (۱۸). در واکسن تجاري مانهمیا همولیتیکا که در گوساله‌ها استفاده مي‌شود اضافه کردن *PlpE* نوترکیب به واکسن باعث مقاومت کوساله در برابر چالنج با دو سروتیپ ۱ و ۶ شده است(۶ و ۲۱). از سوي دیگر نشان داده

www.SID.ir

Archive of SID

شده است که PlPE در بين تمامي سويه‌هاي شناخته شده پاستورلا از قرابت و مشابهت بسيار بالائي (۹۰-۱۰۰٪) برخوردار است(۲۲). با توجه به وجود اين پروتئين ايمني‌زا در هر سه سروتيپ تحت مطالعه ما ممكن است بتوان مانند روشي كه براي بهبود ايمني‌زائي واكسن مانهميا مرسوم شد، بتوان در مورد واكسن باكترين پاستورلوز طيور مؤسسه رازي نيز بتوان با افزودن *PlpE* ايمني‌زائي واكسن را افزايش داد و همچنين ايمني در برابر سروتيپ‌هاي A:۳ و A:۴ كه در واكسن موجود نيستند نيز ايمني ايجاد نمود. البته اين موضوع نياز به مطالعات بيشتر و انجام آزمايش‌هاي مربوط دارد.

اين عوامل ايمنی‌زای مشترک مولکول‌هائی پروتئيني هستند (يا مولكول‌هائي كه در بخشی دارای ساختاری پروتئينی هستند) با وزن‌هاي مولكولی ۳۹، ۴۰، ۳۷، ۵۳ و ۳۰ كيلو دالتون. اين مطالعات شامل شناسائي مولكولي اين جزء ۳۹ كيلو دالتوني و همچنين بررسي امكان افزودن اين جزء به واكسن فعلي توليد مؤسسه رازي به منظور افزايش دامنه ايمني‌زائي آن براي ايجاد مقاومت در برابر عفونت با ساير سروتيپ‌ها مي‌باشد.

منابع مورد استفاده

1-Ali, H. A., T. Sawada, H. Hatakeyama, N. Ohtsuki and O. Itoh.2004. Characterization of a 39kDa capsular protein of avian *Pasteurella multocida* using monoclonal antibodies. *Veterinary Microbiology* 100: 43-53

2-Ataei, S., R. Burchmore, , C. Hodgson, , A. Finucane, R. Parton, , and J.G. Coote. 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): 207-210

3-Borrathybay, E., T. Sawada, Y. Kataoka, N. Ohtsu, M. Takagi, S. Nakamura and E. Kawamoto. 2003. A 39 kDa protein mediates adhesion of avian *Pasteurella multocida* to chicken embryo fibroblast cells. *Veterinary Microbiology* 97, 229-243

4-Boyce, J. D. and B. Adler.2001. Acapsular *Pasteurella multocida* B:2 can stimulate protective immunity against pasteurellosis. *Infection and Immunity* 69:1943-1946.

5-Boyce, J. D., P. A. Cullen, V. Nguyen, I. Wilkie, and B. Adler.2006. Analysis of the *Pasteurella multocida* outer membrane sub-proteome and its response to the in vivo environment of the natural host. *Proteomics* 6:870-880.

6-Confer A.W.2009. Update on bacterial pathogenesis in BRD. *Animal Health Research Review* 10:145–148.

7-Dabo S.M, A.W. Confer and R.A. Quijano-Blas. 2003.Molecular and immunological characterization of *Pasteurella multocida* serotype A:3 OmpA: evidence of its role in P. multocida interaction with extracellular matrix molecules. *Microbial Pathology*. 35(4):147-57.

8-De Alwis, M.C.1993. Pasteurellosis in Production Animals: a Review. pp. 11-22. In B. E. Patten, Pasteurellosis in Production Animals. Australian Centre for International Agricultural Research (ACIAR).

9- Gong, Q., N. Qu, M. F. Niu, and C.L. Qin. 2016. Evaluation of immunogenicity and protective efficacy of recombinant ptfA of avian *Pasteurella multocida*. *Iranian Journal of Veterinary Research, Shiraz University* 17(2): 84-88
PMCID: PMC5090136

10- Greenwood, D., R.C. Slack and J. F. Peutherer.2002. Medical Microbiology, a guide to microbial infections: pathogenesis, immunity, laboratory diagnosis and control, Sixteenth ed: Churchill Livingstone. London

11- Harper, M., J.D. Boyce, I.W. Willkie and B. Adler.2003. Signature-tagged mutagenesis of *Pasteurella multocida* identifies mutants displaying differential virulence characteristics in mice and chickens. *Infection and Immunity* 71:5440-5446.

12 - Hatfaludi, T., K. Al-Hasani, J.D. Boyce and B. Adler, (2010). Outer membrane proteins of *Pasteurella multocida*. *Veterinary Microbiology* 144: 1–17.

13- Xiao, K., Q. Liu, X. Liu, Y. Hu, X. Zhao and Q. Kong.2016. Identification of the Avian *Pasteurella multocida* phoP Gene and Evaluation of the Effects of phoP Deletion on Virulence and Immunogenicity. *International journal of Molecular Sciences* 17:12-20

14- Luo, Y., Q. Zeng, J. R. Glisson, M.W. Jackwood, I.H. Cheng and C. Wang.1999. Sequence analysis of *Pasteurella multocida* major outer membrane protein (OmpH) and application of synthetic peptides in vaccination of chickens against homologous strain challenge. *Vaccine* 17: 821-831.

15 -May, B.J, Q. Zhang, L.L Li, M.L Paustian , T.S. Whittam, V. Kapur, .2001. Complete genomic sequence of *Pasteurella multocida*, Pm70. Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America 98(6):3460-5.

16- Muniandy, N., D.N. Love and T.K. Mukkur. 1998. Immunogenicity of purified lipopolysaccharide or protein-oligosaccharide conjugates of *Pasteurella multocida* type 6:B in mice. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 21, 257-279.

17- OIE. 2004. HAEMORRHAGIC SEPTICAEMIA. In Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, 5th edition, 2004: OIE.available online at: www.oie.int/fileadmin/Home/eng/...in.../HAEMORRHAGIC_SEPTICEMIA.pdf

18- Pandher, K., A.W. Confer and G.L. Murphy.1998.Genetic and immunologic analyses of *PlpE*, a lipoprotein important in comple-

www.SID.ir

Archive of SID

ment-mediated killing of Pasteurella hemolytic serotype 1. *Infection and Immunity* 66(12):5613-9.

19- Rimler, R. B. and K.R. Rhoades. 1989. Solubilization of membrane-associated cross-protection factor(s) of *Pasteurella multocida*. *Avian Diseases* 33: 258-263.

20- Rimler, R. B. 2001. Purification of a cross-protective antigen from *Pasteurella multocida* grown in vitro and in vivo. *Avian Diseases* 45:572-580.

21- Roier, s., J.C. Fenninger, D.R. Leitner, G.N. Rechberger, J. Reidl and S. Schild.2006.Immunogenicity of *Pasteurella multocida* and *Mannheimia haemolyticaouter* membrane vesicles. *International Journal of Medical Microbiology* 303(5): 247–256.

22- Singh, A.P., S. Singh, R. Ranjan, S.K. Gupta, V.P. Singh, and B. Sharma.2010.Molecular heterogeneity of plpE gene in Indian isolates of *Pasteurella multocida* and expression of recombinant *PlpE* in vaccine strain of *P. multocida* serotype B: 2. *Journal of Veterinary Sciences* 11(3):227-33.

23- Tabatabai, L. B. and E. S. Zehr.2004. Identification of five outer membrane-associated proteins among cross-protective factor proteins of *Pasteurella multocida*. *Infecion and Immunity* 72:1195-1198.

24- Watt, J. M., E. Swiatlo, M.M. Wade and F.R. Champlin .2003. Regulation of capsule biosynthesis in serotype A strains of *Pasteurella multocida*. *FEMS Microbiology* Letter 225: 9-14

25- Wu, J.R., J.H. Shien, H.K. Shieh, C.F. Chen and P.C. Chang 2007. Protective immunity conferred by recombinant Pasteurella multocida lipoprotein E (*PlpE*). *Vaccine* 25(21):4140-8.

www.SID.ir