DOI: 10.22092/vj.2020.128693.1667
شماره ۱۳۰ بهار ۱۴۰۰
تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های بیولوژیک

یافته‌های اخیر در زمینه توکسین‌های NetB و TpeL جهت تولید واکسن علیه بیماری انتریت نکروتیک طیور

• لیدا عبدالمحمدی خیاو
بخش تحقیق و تولید واکسن های بی هوازی، آزمایشگاه تخصصی تحقیقات کلستریدیا، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران
•رضا پیله چیان لنگرودی (نویسنده مسئول)
بخش تحقیق و تولید واکسن های بی هوازی، آزمایشگاه تخصصی تحقیقات کلستریدیا، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران
• علیرضا پردیس
بخش تحقیق و تولید واکسن های بی هوازی، آزمایشگاه تخصصی تحقیقات کلستریدیا، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران
تاریخ دریافت: ۱۳۹۸-۰۹-۱۸ تاریخ پذیرش:۱۳۹۸-۱۱-۳۰
Email: langgroudi@gmail.com

چکیده

کلستریدیوم شامل طیف گسترده‌ای از باکتری‌های میله‌ای شکل بی هوازی گرم مثبت و اسپورزا است که دارای ۲۰۳ گونه بوده و بر اساس چهار توکسین اصلی یوتا (iA)، آلفا (cpa)، بتا (cpb) و اپسیلون، به پنج تایپ (A، B، C، D، E) طبقه‌بندی می‌شود. این باکتری‌ها یکی از مهم‌ترین عوامل بیماری‌زایی در حیوانات هستند. توکسین‌های متنوع این باکتری نقش مهمی در بیماری‌زایی دارند که از جمله جدیدترین آن‌ها می‌توان به NetB و TpeL اشاره نمود. این توکسین‌ها در ایجاد بیماری‌های متنوعی از جمله انتریت نکروتیک نقش دارند. در این مقاله مروری بر مطالعات انجام یافته بر روی کلیات توکسین‌های NetB و TpeL ارائه می‌گردد. همچنین پیشرفت‌های اخیر جهت تولید واکسن‌های نسل جدید را ارائه و تجزیه و تحلیل‌هایی که توسط دانشمندان با استفاده از نرم‌افزارهای بیوانفورماتیک روی توالی‌های *tpeL* و *netB* برای تولید پروتئین نوترکیب انجام یافته، مورد بررسی قرار می‌گیرد. در این راستا محققین در آزمایشات مختلف ژن فیوژن را توسط PCR سنتز نموده و پلاسمید نوترکیب را در باکتری *E. coli* ترانسفورم کرده‌اند. پروتئین فیوژن حاصله توسط نیکل(Ni-NTA) خالص شده و جهت تأیید از تکنیک‌های SDS-PAGE و وسترن‌بلات استفاده گردیده و جهت سنجش ایمنی، آزمایش خنثی‌سازی سرم در خرگوش استفاده شده است. همچنین در مطالعات دیگر موتانت‌هایی با فعالیت سایتوتوکسیک کمتر توسط کیت به صورت site-directed mutagenesis طراحی شده و با توالی‌سازی تأیید شدند. نتایج مطالعات آنان حاکی از آن است که واکسن‌های نسل جدید می‌توانند به عنوان کاندید واکسن علیه انتریت نکروتیک طیور مورد استفاده قرار گیرند.

کلمات کلیدی: توکسین TpeL، NetB، کلستریدیوم پرفرینجنز، واکسن‌های نسل جدید، بیوانفورماتیک

www.SID.ir

Archive of SID

Veterinary Researches & Biological Products No 130 pp: 26-37

Recently acquired for NetB and TpeL toxins for vaccine production to protect against avian necrotic enteritis

By: Abdolmohammadi Khiav, L., Department of Anaerobic Vaccine Research and Production, Specialized Clostridia Research Laboratory, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Karaj, Iran. Pilehchian Langroudi, R., (Corresponding Author) Associate Professor Department of Anaerobic Vaccine Research and Production, Specialized Clostridia Research Laboratory, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Karaj, Iran. and Paradise, A.R., Department of Anaerobic Vaccine Research and Production, Specialized Clostridia Research Laboratory, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Karaj, Iran.

Received: 2019-12-09 **Accepted: 2020-02-19**

Email: langgroudi@gmail.com

Clostridium is a broad genus of rod-shaped, anaerobic, gram-positive and spore-forming bacteria. It has 203 species and is classified into five isotypes (A, B, C, D, and E) based on four major toxins, iota (iA), alpha (cpa), beta (cpb) and epsilon (etx). These bacteria are one of the most important causes of disease in animals. Various toxins of these bacteria play an important role in pathogenesis. Newly discovered toxin such as NetB and TpeL could be mentioned. These toxins are involved in a variety of diseases, including necrotic enteritis. This article presents an overview of studies on NetB and TpeL toxins. Furthermore recent advances had been provided in the production of new generation vaccines. In this article, we demonstrated that the sequences of *tpeL* and *netB* were investigated using bioinformatics software for recombinant protein production. Different regions of the gene were selected and evaluated for fusion protein synthesis. The fusion gene was synthesized by PCR and the recombinant plasmid was transformed into *E. coli*. Then the fusion protein was purified by NI-NTA and used for confirmation by SDS-PAGE and Western blotting. Serum neutralization test was done to evaluate of antibody in rabbits. Mutants with less cytotoxic activity were also designed by site-directed mutagenesis kits and confirmed by sequencing. The results of this study suggested that new-generation vaccines could be used as a candidate vaccine against avian necrotic enteritis.

Key words: TpeL, NetB, Clostridium perfringens, new-generation vaccines, bioinformatics

مقدمه

کلستریدیوم شامل طیف گسترده ای از باکتری‌های بی‌هوازی، گرم مثبت و اسپورزا است که در محیط‌های مختلف از جمله خاک، رسوبات دریایی، فاضلاب و همچنین دستگاه گوارش و مدفوع انسان و حیوانات یافت می‌شوند (۴۹). برخی از گونه‌های کلستریدیوم بیماریزا می‌توانند در داخل پیکره میزبان به عنوان بخشی از فلور میکروبی معمولی یا به عنوان اسپورهای نهفته و بدون عوارض جانبی ظاهری وجود داشته باشند (۴۴). تغییراتی از قبیل اختلال در میکروبیوم روده با استفاده از آنتی بیوتیک‌ها، رادیوتراپی، شیمی درمانی یا بیماری‌هایی مانند سرطان یا نوتروپنی می‌توانند شرایطی را برای بیماری‌زایی کلستریدیوم ایجاد نمایند (۴۱). اگزوتوکسین‌های کلستریدیوم باعث آسیب خفیف تا کشنده می‌شوند که بر روی دستگاه گوارش (انتروتوکسین‌ها)، بافت‌های نرم و اندام‌ها (سموم تخریب کننده بافت) تأثیر نموده یا باعث اختلال عملکرد عصبی (نوروتوکسین‌ها) می شوند (۳).

کلستریدیوم پرفرینجنز دارای ۲۰۳ گونه بوده و بر اساس چهار توکسین اصلی (iA) iota، آلفا (cpa)، بتا (cpb) و اپسیلون etx، به پنج تیپ A ,B C, D, E طبقه بندی می‌شود (۲۳). همچنین این باکتری توکسین‌های فرعی سیگما، تتا، کاپا،لامبدا، مو، نو، نوروآمینیداز (سیالیداز) و انتروتوکسین را تولید می‌نماید. کلیه توکسین‌های این باکتری از جنس پروتئین و اگزوتوکسین هستند (۳۲).

ژن اکثر توکسین‌های کلستریدیوم پرفرینجنز بجز Alpha *C. perfringens*

www.SID.ir

Archive of SID

toxin (CPA) و Perfringolysin O (PFO) که روی کروموزوم قرار دارند، در پلاسمیدهای بزرگ ۴۵ کیلوبایت تا ۱۴۰ کیلوبایت رمز می‌شوند. البته *C. perfringens* enterotoxin (CPE) این باکتری را می توان در کروموزوم یا پلاسمیدها نیز یافت. بسیاری از این پلاسمیدها از طریق کانژوگاسیون منتقل شده و ناحیه‌ای به عنوان لوکوس *tcp* داشته که در گسترش ژن‌های توکسین و تعیین مقاومت بین سویه‌ها نقش دارند (۷). بیشتر بیماری‌های ناشی از کلستریدیوم پرفرینجنز توسط یک یا چندین توکسین ایجاد می‌شوند. فقط تیپ‌های A و C به بیماری های انسان ارتباط داشته، در حالی که دیگر توکسین‌ها عامل ایجاد بیماری در حیوانات می باشند (۲۲). با توجه به محل تولید توکسین‌ها، کلستریدیوم پرفرینجنز باعث بیماریهای بافتی، روده‌ای یا سیستمیک می‌شود. عفونت زخم‌ها می تواند منجر به میونکروز کلستریدیایی (گانگرن گازی) شود، در حالی که تولید توکسین‌ها در روده منجر به انتریت یا انتروکولیت می‌گردد. عفونت‌های روده‌ای ممکن است در هنگام جذب توکسین به جریان خون به درون روده (انتروتوکسمی) پیشرفت کند و بر روی اندام‌های دوردست مانند کلیه، ریه یا مغز تأثیر بگذارد (۲۲). به تازگی توکسین‌های جدیدتر به نام NetB و TpeL کشف گردیده که اطلاعات کمی در مورد آن‌ها وجود دارد. در این مقاله مروری بر مطالعات انجام شده بر روی توکسین NetB و TpeL ارائه گردیده است. پیشرفت‌های اخیر در پایگاه‌های اطلاعاتی و فنآوری کلونینگ، زمینه بررسی‌های جدید در تولید واکسن‌های نسل جدید را فراهم نموده است. در این مطالعه تلاش شده به بررسی‌های مختلف در این زمینه اشاره گردد.

کلستریدیوم پرفرینجنز

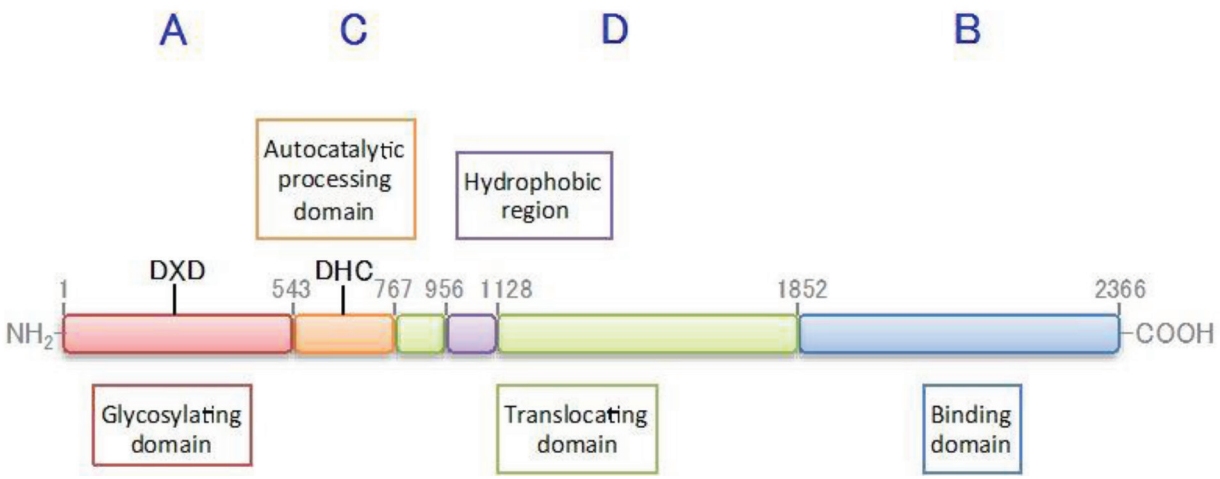
در سال ۱۹۸۹ نقشه ژنی کلستریدیوم پرفرینجنز CPN50 از بیمار مبتلا به سپتی‌سمی ترسیم گردید. کروموزوم حلقوی باکتری ۳/۵۸ میلیون جفت بازی بوده که حاوی ۲۴ لوکوس ژن است. کلستریدیوم پرفرینجنز براساس توکسین‌های اصلی به تیپ‌های مختلف تقسیم می‌شود (۳۲). سویه کلستریدیوم پرفرینجنز تیپ A رایجترین تیپ کلستریدیوم پرفرینجنز است و عضو فلور نرمال روده حیوانات خون گرم می‌باشد (۳۳).

کلستریدیوم پرفرینجنز تیپ A

کلستریدیوم پرفرینجنز تیپ A سویه ۱۳ دارای ۳۰۳۱۴۳۰ bp است و ۲۶۶ منطقه رمز کننده روی آن تشخیص داده شد. این سویه دارای G+C ٪۲۸/۶ است. این کروموزوم ۱۰ ژن rRNA و ۹۶ ژن tRNA دارد (۴۰). کلستریدیوم پرفرینجنز تیپ A تولید توکسین‌های متنوعی از جمله آلفا توکسین می‌نماید. ژن کدکننده این توکسین پروتئینی (cpa) روی DNA کروموزومی و نزدیک مبدا همانندسازی قرار دارد و یکی از حفاظت شده‌ترین نواحی درون کروموزوم باکتری است (۱۴). به تازگی توکسین TpeL در کلستریدیوم پرفرینجنز تیپ A شناسایی شده است. این توکسین با ایجاد بیماری‌های مختلف از جمله انتریت نکروتیک طیور از جمله توکسین‌های بیماری‌زا است (۲۴) که آپوپتوز را القاء نموده و در افزایش این بیماری نقش بسزایی دارند. به علاوه *netB* که ارتباط آن با انتریت نکروتیک مشخص گردیده است از جمله توکسین‌های این باکتری می‌باشد (۳۶).

TpeL

یکی از اعضای خانواده توکسین‌های گلیکوزیله کننده کلستریدیایی است (۳۱) که شامل توکسین‌های A و B کلستریدیوم دیفیسیل همینطور توکسین کشنده و هموراژیک کلستریدیوم سوردلی و آلفا توکسین کلستریدیوم نووئی هستند. این توکسین توسط کلستریدیوم پرفرینجنز تیپ‌های A B



شکل ۱- حوضه‌های LCTs (۲۶).

www.SID.ir

Archive of SID

و C ایجاد می‌شود. نام توکسین از TpeL: toxin *C. perfringens* large cytotoxin گرفته شده است. این توکسین در سال ۲۰۰۷ شناسایی و از مایع فوقانی کلستریدیوم پرفرینجنز تیپ C سویه MC1 جدا گردید (۲). در سال ۲۰۱۲ این توکسین از کلستریدیوم پرفرینجنز تیپ A جداسازی و توسط تکنیک HPLC تخلیص گردید (۵). واریته دیگری از این توکسین با فعالیتی کمتر و با وزن مولکولی حدود ۱۵کیلودالتون نیز یافت شده است (۴). در سال‌های اخیر تعدادی از منابع اطلاعات مرتبط با این توکسین را انتشار داده‌اند.

ژن *tpeL*

TpeL بزرگ‌ترین توکسین در میان توکسین‌های کلستریدیوم پرفرینجنز است. توالی این توکسین با توالی‌های بعضی از توکسین‌های کلستریدیایی همولوگ بوده که تحت عنوان LCTs نامیده می‌شود. این توکسین‌ها شامل بیش از چند حوضه (عمدتا ABCD) است (۱۳). حوضه A در ناحیه N – ترمینال قرار گرفته که مسئول فعالیت گلیکوزیل ترانسفراز است (۱۲). در کنار آن ناحیه سیستئین پروتئاز قرار گرفته (حوضه C) (۶). حوضه اتصال به گیرنده در C- ترمینال قرار گرفته (حوضه B) (۱۰) (حوضه تکراری پلی پپتید) C- ترمینال شامل چندین اسید آمینه بوده (تکرار بلند) که توسط ۳۱ اسید آمینه (تکرار کوتاه) جدا می‌شود (۳۱). بین حوضه C و توالی تکراری (حوضه D) محل قرار گیری توکسین بوده که احتمالا مسئول تحویل گلیکوزیل ترانسفراز به داخل سیتوزول سلول هدف است. این حوضه حاوی نواحی هیدروفوبیک است که برای ورود توکسین به داخل غشاهای اندوزوم مهم است. این نواحی در شکل های ۱ و ۲ آورده شده است.

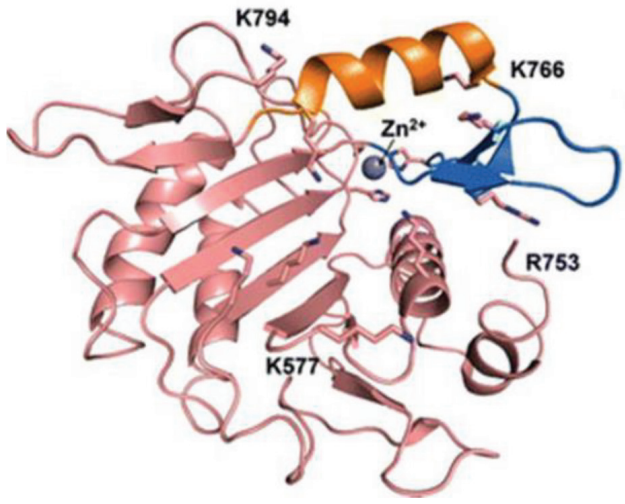
طول کامل C ترمینال از (*tpeL* ۱ -۱۷۷۹) متغیر است. کل توالی کروموزم و پلاسمید در کلستریدیوم پرفرینجنز تیپ A سویه ۱۳ در دسترس است (۴۰). ولی توالی ژن *tpeL* در بعضی سویه‌ها وجود ندارد. این مسئله به این نکته اشاره می نماید که گاهی توالی توکسین‌هایی نظیر اپسیلون و بتا در حین پاساژ سویه‌ها از بین می روند (۹). بنابراین این سویه‌ها با از دست دادن پلاسمید به تیپ A تغییر می نمایند.

ژن *tpeL* در کلستریدیوم پرفرینجنز بر روی پلاسمید قرار گرفته است. در کلستریدیوم پرفرینجنز تیپ C این ناحیه قاب خواندن ۴۹۵۳ باز قرار داشته و ۱۶۵۱ اسید آمینه را رمز می‌نماید. در حالی که ژن رمز کننده این توکسین در کلستریدیوم پرفرینجنز تیپ A به طول ۵۳۴۰ نوکلئوتید است. وزن مولکولی توالی اسیدهای آمینه آن ۱۹۱ کیلودالتون تخمین زده می‌شود. سیگنال پپتید در ناحیه قاب خواندن وجود ندارد (۲۶). ژن *tpeL* در حین فاز اسپورزایی بیان شده و تولید آن تنظیم می‌گردد(۳۰). سعید و همکاران، گرجار و همکاران گزارش نمودند که در بسیاری از کلستریدیوم پرفرینجنز تیپ‌های C و تقریبا همه کلستریدیوم پرفرینجنز تیپ B ژن *tpeL* تقریبا ۳ کیلو باز پایین دست ژن *Cpb* در پلاسمیدهایی با وزن مولکولی ۹۰ یا ۶۵-۶۰ کیلو دالتون قرار گرفته است (۳۸) تنوع سایز پلاسمید کد رمز کننده این توکسین و *netB* در جدول ۱ آورده شده است.

مکانیسم عملکرد توکسین

برای شروع فرایند اتصال به گیرنده و اندوسیتوز با واسطه کلاترین صورت می‌گیرد (۲۹). این توکسین از طریق حوضه B به گیرنده سلول‌های هدف تحت عنوان LDL receptor-related protein 1 (LRP1) می‌چسبد (۳۹).

پس از اندوسیتوز توکسین از طریق حوضه D هیدروفوبیک به غشاهای اندوزوم وارد می‌شود. pH اسیدی اندوزوم موجب تغییر آرایش اولیه شده که منجر به ایجاد حفره می‌شود. اینوزیتول فسفات سیتوزولی با



شکل ۲- آرایش LCTS قبل از فعال شدن و شکستن آن (۱).

www.SID.ir

Archive of SID

حوضه C سیستئین پروتئاز که نزدیک به حوضه گلیکوزیل ترانسفراز قرار گرفته واکنش داده و تغییر آرایش ثانویه را القاء و عملکرد پروتئاز را فعال می‌نماید (۲۶). این فرایند منجر به شکستن توکسین و آزاد شدن حوضه A گلیکوزیل ترانسفراز به داخل سیتوزول می‌شود (۸). در سیتوزول GTPases های کوچک دچار تغییراتی می‌شوند (Rac1، Ras، Rap و Ral برای TpeL گلیکوزیله شده و غیر فعال می‌شوند) (۲۷) (شکل ۳).

غیر فعال شدن پروتئین‌های فوق الذکر موجب تغییرات ریخت شناختی گسترده توسط توکسین از قبیل از دست دادن فیبرهای اکتین و تخریب اتصالات بین سلولی و در نتیجه افزایش نفوذپذیری می‌گردد (۲۶). مطالعات نشان داده میزان فعالیت کشندگی توکسین خالص TpeL در موش (Minimum Lethal Dose (MLD ۶۲ (یک MLD معادل ۱۶µ) و میزان LD۵۰ ۹۱ (یک LD۵۰ معادل ۱۶µ) است (۲).

NetB

این توکسین توسط کلستریدیوم پرفرینجنز تیپ A ایجاد می‌شود. نام NetB از (Necrotic Enteritis Beta-Like Toxin) گرفته شده است. این توکسین برای اولین بار در سال ۱۹۶۱ شناسایی شده و در استرالیا از سویه کلستریدیوم پرفرینجنز تیپ A در جوجه مبتلا به انتریت نکروتیک کشف شد (۱۵).

در سطح جهان، انتریت نکروتیک طیور باعث ۲-۶ میلیارد دلار ضرر سالانه می‌شود. (۴۸). وضعیت ایمنی بدن، تغذیه و سلامت روده حیوانات و عفونت‌های انگلی مانند کوکسیدیوز عوامل مهمی برای مستعد شدن و ابتلا به انتریت نکروتیک طیور است (۲۵). علائم این بیماری شامل اسهال، بی‌اشتهایی و افسردگی در طی چند ساعت پیشرفت نموده و منجر به مرگ و میر می‌شود (۴۲). ممنوعیت استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها باعث افزایش موارد انتریت نکروتیک تحت‌بالینی می‌شود. البته میزان مرگ و میر موارد انتریت نکروتیک تحت بالینی بسیار پایین است (۴۵).

NetB توکسینی pore-forming است که توسط ژن *netB* رمز می‌شود. وزن مولکولی این توکسین ۳۳ کیلو دالتون تخمین زده شد و ژن رمزکننده آن روی پلاسمید قرار گرفته است (۱۵). مطالعات نشان داد که ساختار NetB بیشتر شبیه فرم مونومر دلتا-توکسین (۴۱٪ شباهت توالی) (۴۷) بتا-توکسین کلستر szیدیوم پرفرینجنز (۳۸٪ شباهت توالی) (۱۵) و همچنین اشکال محلول لکوسیدین F استافیلوکوک و لکوسیدین S و لکوتوکسین LukE استاف اورئوس (۴۷) و α-toxin استاف اورئوس (۳۱٪ شباهت توالی) است (۱۵).

ساختار ژن *NetB*

ساختار این توکسین با استفاده از جایگزینی مولکولی و با وضوح Å۱,۸ تعیین شد. *netB* چین خوردگی‌های کلی غنی از ورقه β دارد که آن را شبیه آلفا همولیزین استافیلوکوک اورئوس می‌نماید. مولکول شامل ۱۶ رشته β و یک α هلیکس در حوضه‌های لولا (latch) و لبه و پیش ساقه (Prestem) است که داخل β ساندویچ چیده شده است که مشخصه خانواده آلفا همولیزین است. به طور خلاصه، حوضه β ساندویچ شامل یک پنج رشته‌ای و یک شش رشته‌ای از آنتی پارالل ورقه β هستند. ناحیه پیش ساقه (باقیمانده ۱۴۰ تا ۱۸۶) سه رشته آنتی پارالل ورقه β را تشکیل داده که در برابر بسته پنج رشته‌ای از آنتی پارالل ورقه β از β ساندویچ قرار دارد. ناحیه لبه که در شناسایی غشاها و اتصال نقش دارد، شامل چهار رشته آنتی پارالل ورقه β و یک حلقه به خوبی مرتب شده با باقی مانده‌های ۲۰۵ تا ۲۴۲ تشکیل شده است. پایه حوضه لبه شامل تعدادی از گروه‌های آروماتیک در معرض حلال شامل F۱۰۴ Y۱۰۸، Y۱۰۹، Y۲۱۲، Y۲۱۷، Y۲۲۱، Y۲۳۲ بوده و پیش‌بینی می‌شود که این باقیمانده‌ها با غشاء لیپیدی تماس مستقیمی برقرار می‌نمایند. ناحیه‌ای با چگالی مثبت در یک فرورفتگی کم‌عمق، در پایه حوضه لبه مشاهده می‌شود. این جیب توسط زنجیره‌های جانبی K۱۰۷ ، Y۱۰۸، N۲۳۴ ، W۲۸۷ و W۲۹۲

جدول ۱ - تنوع سایز پلاسمید رمز کننده توکسین *tpeL* و *netB* (۲۱).

Type	*tpeL*	*netB*
A	ND	۸۲
B	۶۵/۹۰	-
C	۶۵/۹۰	-
D	-	-
E	-	-

www.SID.ir

Archive of SID

محدود شده است. شکل ۴ ساختار توکسین را نشان می‌دهد (۴۷).

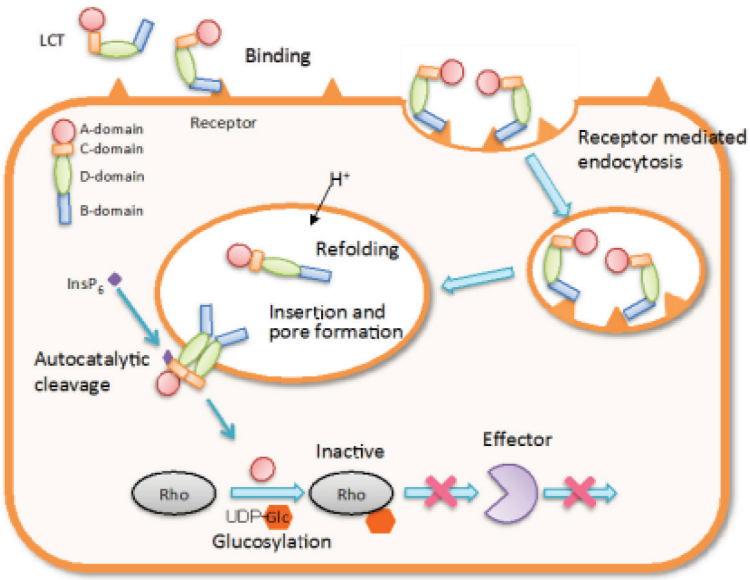
درفت توالی ژنوم برای جدایه‌های کلستریدیوم پرفرینجنز تیپ A طیور و جدایه‌ای از پرنده سالم از طریق فن‌آوری توالی‌یابی با توان بالا مشخص گردید و شناسایی ژن‌های جدید مرتبط با انتریت نکروتیک توسط مقایسه با ژنوم‌های مرجع در دسترس شناسایی شد. ۳۱ قاب خواندن (Open Reading Frame (ORFs منحصر به فرد در همه سویه‌ها موجود بود و پایه ای برای سه مکان بسیار محافظت شده مرتبط با انتریت نکروتیک را تشکیل می‌دهد که به صورت ۱-NELoc (۴۲ NELoc ، ۲-KB (KB ۱۱,۲) و ۳-NELoc (۵,۶ کیلوبایت) طراحی گردیده است. بزرگترین لوکوس، ۱-NELoc که شامل *netB* و ۳۶ ژن اضافی است، منجمله ژن‌هایی که دو لکوسیدین، پروتئین شبه اینترنالین و پروتئین حوضه ricin را رمزگذاری می‌کنند. PFGE و وسترن‌بلات نشان داده سویه درگیر انتریت نکروتیک ۲ تا ۵ پلاسمید بزرگ حمل می‌نمایند و ۱-NELoc و ۳-NELoc بر روی پلاسمیدهای مجزا با اندازه‌های به ترتیب ۸۵ و ۷۰ کیلوبایت حمل می‌گردد. در لوکوس ۱-NELoc پروتئینی شبیه اینترنالین بدون فاصله بالادست ژن توکسین *netB* (تکرار غنی از لوسین) قرار گرفته است. حوضه تکرار غنی از لوسین مسئول تشکیل ساختاری شبیه نعل اسب است که به طور معمول در تعامل پروتئین با پروتئین دخیل است. وجود بالادست VirR-box در ژن نشان می‌دهد که ممکن است با *netB* همزمان تنظیم شود، بنابراین در بیماری‌زائی انتریت نکروتیک نیز درگیر است. بلافاصله پایین دست ژن *netB*، پروتئین ۳۹۱ اسید آمینه است که حاوی یک حوضه سه برگه-بتا است که شبیه زیر واحد B ریسین کربوهیدرات متصل شونده است. این پروتئین‌ها حاوی یک ساختار ثانویه مشابه، متشکل از حوضه شبه ricin در C- ترمینال هستند که مسئول اتصال کربوهیدرات‌ها و یک حوضه N- ترمینال فعال هستند. شکل ۴ ساختار توکسین و شکل ۵ ساختار لوکوس‌ها را نشان می‌دهد (۲۰).

سازمان ژنتیکی (A۱-NELoc، B۲-NELoc و C۳-NELoc) نشان داده شده است. بزرگترین لوکوس، ۱-NELoc شامل *netB* است. بر اساس نقش فرضی ژن‌ها در توالی، رنگ‌های مختلفی در نظر گرفته می‌شود (۲۰).

تنظیم این توکسین توسط سیستم VirR / VirS است. این سیستم‌های ترشحی (IVSP) شامل زیر واحدهای متعددی multiple subunits بوده که در باکتری‌های گرم منفی دو غشاء را طی کرده و بین آنها پل زده و در باکتری‌های گرم مثبت تنها غشاء باکتری را طی می‌کنند. سیستم VirS / VirR از یک ژن تنظیم کننده پاسخ VirR و یک ژن برای حسگر هیستیدین کیناز VirS تشکیل شده است. VirS دارای N- ترمینال نسبتاً آبگریز با شش ناحیه ترانس ممبران است. سایت اتوفسفوریلاسیون در حلقه سیتوپلاسمی بین ترانس ممبران N ترمینال ۴ و ۵ قرار دارد. سه حوضه به منظور حسگرهای هیستیدین کیناز در حوضه C- ترمینال موجود است. N- ترمینال VirR دارای یک حوضه محافظت شده است که نیاز به دریافت گروه فسفات از حسگر هیستیدین کیناز دارد (۲۸).

مکانیسم عملکرد توکسین

گیرنده اختصاصی NetB هنوز مشخص نشده است (۴۹). مطالعات اخیر



شکل ۳- شماتیک اندوسیتوز وابسته به کلاترین و تغییرات داخل سلولی که در پی آن رخ می‌دهند (۲۶) .

www.SID.ir

Archive of SID

نشان داده است که NetB با واکنش با کلسترول عامل تقویت تشکیل منافذ است. براین اساس NetB منافذ آبدوست در غشای سلولی با قطر تقریباً ۱٫۸-۱٫۶ nm ایجاد می‌کند که به کاتیون‌ها اجازه ورود به سلول را می‌دهد و باعث تغییرات ریخت‌شناسی در سلول‌های LMH مانند گردشدن و لیزشدن سلول‌ها می‌شود (۲۱).

جهش در باقیمانده Y۱۹۱ *netB* به فنیل آلانین منجر به افزایش ۲٫۵ برابری LD۵۰ می‌شود. درحالی که جهش در باقیمانده D۱۵۶ *netB* منجر به از بین رفتن کامل بیان پروتئین عملکردی می‌شود، نتایج تحقیقات نشان داده که این ناحیه در واکنش پروموتور-پروموتور شرکت می‌کند و همچنین برای بازآرایی تشکیل مولتی‌مر در غشاء مهم است. برای تخمین سایز منافذ از دیگر توکسین‌های منفذساز شامل Xenorhabdus nematophila fimbrial shaft protein (MrxA) ، همولیزین *E.coli*، آلفا توکسین کلستریدیوم سپتیکوم و سایتولیزین ویبریو *metschnikovii* استفاده گردیده است (۱۵).

واکسیناسیون

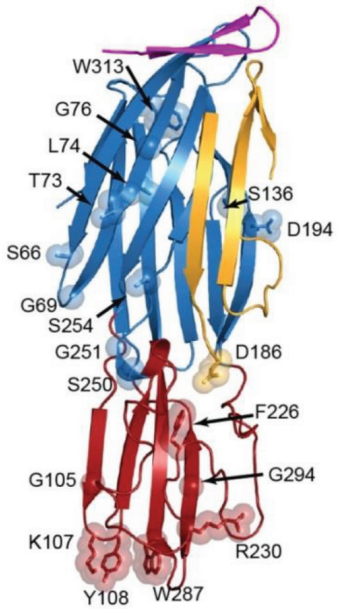
مطالعات متعددی در زمینه تولید واکسن بر علیه انتریت نکروتیک انجام شده است. سال‌هاست که واکسن‌های تجاری حاوی باکترین فرمالدئید تیمار شده (متشکل از سلول‌های باکتریایی سونیکه شده و سوسپانسیون کشت) و یا توکسوئید خام به صورت انبوه علیه توکسین‌های کلستریدیایی تهیه و برای ایمن نمودن تجویز می‌شوند. شکل ۶ به صورت شماتیک این مراحل را نشان می‌دهد (۴۹).

پس از شناسایی توکسین NetB به عنوان فاکتور ویرولانس عامل انتریت نکروتیک از این توکسین به صورت توکسوئید خام و یا باکترین تیمار شده جهت واکسیناسیون طیور استفاده گردید (۴۹). در سال‌های اخیر، تحقیقات بر روی واکسن‌های نوترکیب متمرکز شده که روشی جایگزین برای توکسین‌های غیرفعال ارائه می‌دهند. در ادامه به ارائه آن‌ها به صورت خلاصه اشاره می‌شود.

طراحی واکسن نوترکیب TpeL

پیش بینی اپی‌توپ‌ها به روش های بیوانفورماتیک برای طراحی واکسن‌های نسل جدید ضروری است. لذا در سال ۲۰۱۴ آنالیز ایمونوانفورماتیک بر روی توکسین TpeL کلستریدیوم پرفرینجنز انجام گردید. کل توالی‌های ژن *tpeL* مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفته شده و ساختار سوم طراحی گردید. سپس آرایش اپی‌توپ‌های B با استفاده از ابزارهای ایمونوانفورماتیک DiscoTope ، ElliPro ،۲٫۰ BCEP، CBTOPE، SEPPA و B-pred مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و اسیدهای آمینه منحصر به فرد ۸۰--۲۶۵ و ۱۱۳۰-۱۵۰۰ برای توکسین TpeL کلستریدیوم پرفرینجنز شناسایی گردید (۴۳).

در بررسی که در سال ۲۰۱۹ در ایران بر روی کلونینگ ژن *tpeL* کلستریدیوم پرفرینجنز تیپ B در *E. coli* صورت گرفت، پس از کشت باکتری استخراج DNA ژنومی و تکثیر این توکسین توسط پرایمرهای اختصاصی انجام پذیرفت. سپس الحاق محصول PCR در وکتور PTZ۵۷R/T و آماده سازی سلول‌های مستعد *E. coli* TOP۱۰ به روش شوک حرارتی انجام گرفت و



شکل ۴- ساختار توکسین NetB در حوضه های لولا و لبه و پیش ساقه.

حوضه آمین لولا به رنگ بنفش-قرمز و حوضه β- ساندویچ به رنگ آبی نشان داده شده است. حوضه لبه به رنگ قرمز و منطقه پیش ساقه به رنگ طلایی نشان داده شده است.

www.SID.ir

Archive of SID

در نهایت در سویه TOP۱۰ مستعد، کلون شد (۲۴).

واکسن NetB

واکسن موتانت

پس از آنالیز ساختار و عملکرد پروتئین توکسین NetB، موتانت‌هایی با فعالیت سایتوتوکسیک کمتر طراحی شد. جهش‌های ژن *netB* توسط کیت به صورت site-directed mutagenesis طراحی شده‌اند: ، KVVA Y۲۰۲A ، R۲۰۰A ، Y۱۹۱A ، H۱۸۸A ، Y۱۸۷A ، Y۷۹A ، Y۷۸A ، E۲۵۸A ، W۲۵۷A و W۲۶۲A و با توالی‌سازی تأیید شدند. موتاسیون در نتیجه جایگزینی آلانین بجای تریپتوفان در موقعیت ۲۶۲ منجر به کاهش سایتوتوکسیسیته در سلول‌های LMH و فعالیت همولیتیک گلبول‌های قرمز گردید و بنابراین به عنوان یک کاندید واکسن پیشنهاد گردید (۳۷).

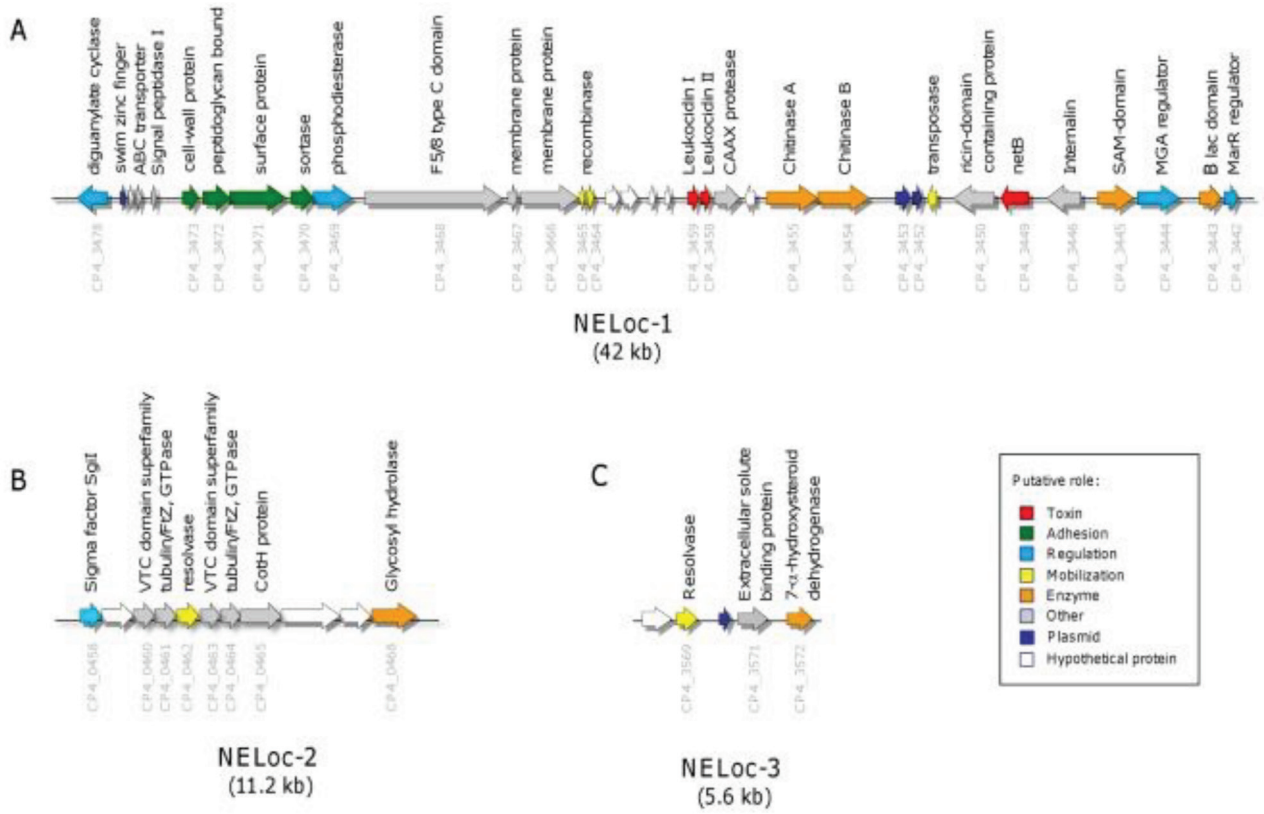
واکسن نوترکیب NetB

ژن *netB* با استفاده از آزمون PCR تکثیر شده و در وکتور pENTR/SD/D-TOPO کلون گردید. سپس در وکتور بیانی pDest41BA ترانسفورم شد. پروتئین فیوژن نوترکیب توسط ستون Ni-NTA متعاقب ژل فیلتراسیون تخلیص و بخش‌های His tags با استفاده از برش TEV برداشته شد. تولید آنتی‌بادی از پروتئین نوترکیب در خرگوش انجام پذیرفت. آنتی سرم توکسین NetB نوترکیب جهت آنالیز وسترن‌بلات و مطالعه نوترالیزاسیون مورد استفاده قرار گرفت (۱۵).

در بررسی دیگری توسط سوا DNA ژنومی باکتری کلستریدیوم پرفرینجنز با استفاده از کیت تخلیص جداسازی و به عنوان الگو برای تکثیر ژن netB قرار گرفت که متعاقباً در وکتور بیانی pBAD برای تولید نوترکیب pBAD-NetB مورد استفاده قرار گرفت. به این ترتیب، NetB یک پروتئین ۳۳۱ آمینواسید بدون سیگنال پپتید دارای His tag در N- ترمینال برای تسهیل تخلیص و اپی‌توپ XpressTM برای تشخیص بیان می‌نماید (۳۷).

لوباتو در سال ۲۰۱۰ واکسن آزمایشی نوترکیب حاوی CPB ، CPA ، ETX و NetB و همچنین واکسن‌های چند گانه حاوی مخلوط دو یا تعداد بیشتری از این سموم را تهیه و مورد مطالعه قرار داد (۴۹).

کی بم (۲۰۱۳) از واکسن نوترکیب NetB تخلیص شده و باکترین فرمالدئید تیمار شده (متشکل از سلول‌های باکتریایی سونیکه شده و



شکل ۵- سازمان ژنتیکی مکان‌های خاص NE.

www.SID.ir

Archive of SID

سوسپانسیون کشت) و توکسوئید خام همراه با یا بدون NetB نوترکیب برای واکسیناسیون استفاده نمود. نتایج بررسی نشان داد NetB پتانسیل قابل توجهی از ایمنی را بر علیه انتریت نکروتیک ایجاد می‌نماید. البته NetB به تنهایی قادر به ایجاد حفاظت کامل نیست (۱۶).

ایمنی بیشتر توسط ترکیب موثر ایمونوژن‌های مختلف باکتریایی تعیین می‌گردد (۱۹). چندین پروتئین تخلیص شده کلستریدیوم پرفرینجنز به عنوان کاندید مناسب واکسن ارزیابی شده است که شامل پروتئین‌های HP، پیروات، feridoxin oxidoreductase، الونگیشن فاکتور G، perfringolysin O، glyceraldehyde-3-fosphate dehydrogenase و فروکتوز -۱-۶-بیس فسفات آلدولاز (FBA) هستند(۱۷).

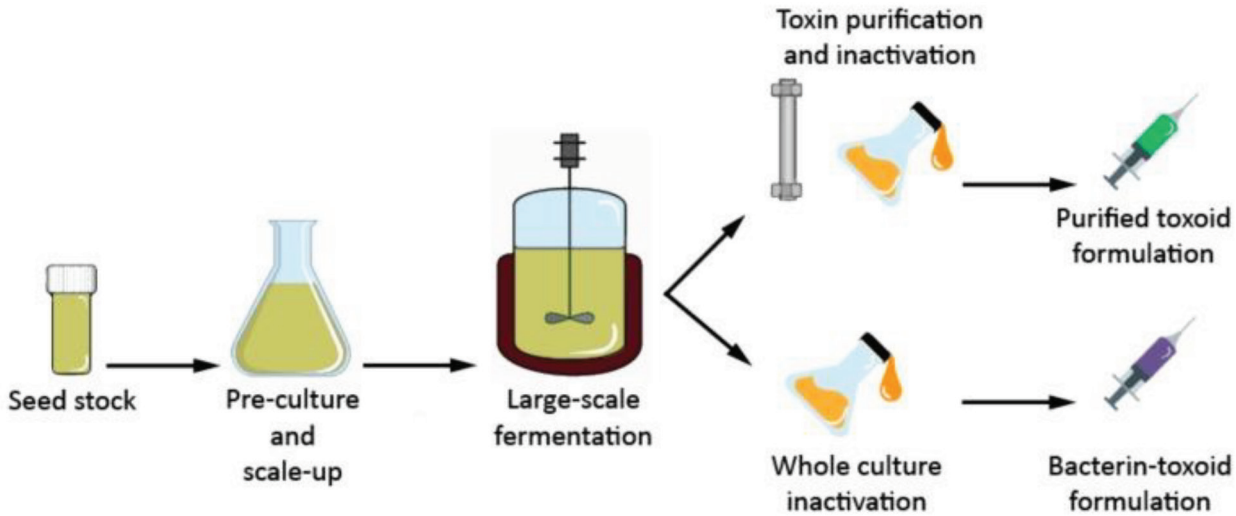
بیان پروتئین‌های کلستریدیوم پرفرینجنز در وکتورهای زنده تخفیف حدت‌یافته

باکتری‌های تخفیف حدت‌یافته یا غیرویرولانت می‌توانند به عنوان کاندید حامل موثر مناسب استفاده گردند (۳۴). سویه‌های سالمونلای تخفیف حدت یافته که اغلب در صنعت طیور استفاده می‌گردند حاملین بی‌ضرر و موثر خوراکی واکسن هستند (۱۱) بدلیل این که تخفیف حدت‌سازی معمولا به وسیله حذف ژن القاء شده که برای متابولیسم باکتری ضروریست لذا حاملین واکسن نمی‌توانند در سیستم ایمنی پرندگان سالم رشد نمایند. زاکاریز میزان کارایی وکتور زنده نوترکیب سالمونلا تیفی‌موریوم تخفیف حدت یافته که حوضه کربن-ترمینال آلفا توکسین را بیان می‌نماید را در پرندگان بررسی نمود. نتایج مطالعه ایشان کاهش چشمگیر زخم‌های نکروتیک در پرندگان را نشان داد (۵۰).

همچنین ایمن‌سازی خوراکی با وکتور سالمونلا تیفی‌موریوم تخفیف حدت یافته با بیان آنزیم فروکتوز ۱ و ۶ بیس فسفات آلدولاز حوضه کربن-ترمینال توکسین آلفا یا پروتئین القاء کننده پاسخ‌های حفاظتی بر علیه انتریت نکروتیک در جوجه‌ها صورت گرفت (۱۸) . نتایج بررسی وایلد در سال ۲۰۱۹ نشان داد واکسیناسیون خوراکی با سویه سالمونلای تخفیف‌حدت‌یافته مولد FBA و توکسوئید NetB به تنهایی یا مخلوط آنتی ژن‌ها، ایمنوژنیک است و باعث واکنش‌های ایمنی برعلیه سالمونلا و آنتی‌ژن‌های کلستریدیوم پرفرینجنز می‌شود (۴۶). باکتری‌های اسیدلاکتیک می‌توانند به عنوان حاملین واکسن برای آنتی ژن‌های کلستریدیوم استفاده گردند (۳۵). باسیلوس سوبتیلیس و باکتری‌های اسیدلاکتیک این مزیت را دارند که به طور کلی بی خطر شناخته می‌شوند. استفاده از وکتورهای زنده برای بیان پروتئین های کلستریدیوم پرفرینجنز در روده جوجه‌های گوشتی، یک رویکرد امیدوارکننده است و باید بیشتر مورد توجه قرار گیرد، اما به دلیل نیاز به ارائه آنتی‌ژن‌ها به سیستم ایمنی بسیار پیچیده خواهد بود. انتخاب پروتئین‌هایی که باید بیان شود نیز موضوع مهم دیگریست.

واکسن آزمایشی نوترکیب NetB و TpeL

در بررسی توالی‌های *netB* آلفا توکسین و *tpeL* با استفاده از نرم افزارهای بیوانفورماتیک جهت تهیه پروتئین با ایمونوژنیسیته بالا مورد آنالیز قرار گرفتند. چندین پروتئین سه گانه کایمریک حاوی نواحی از سه توکسین طراحی و ارزیابی گردید. در نهایت از نتایج آن برای بیان مناسب در میزبان *E. coli* BL۲۱ (DE۳) استفاده گردید و پس از تخلیص توسط NI-NTA جهت تائید از وسترن‌بلات استفاده گردید. سپس جهت ارزیابی ایمنی زایی تست خنثی‌سازی سرم بر روی آن انجام گردید. نتایج



شکل ۶- مراحل فرآیند تولید واکسن معمول کلستریدیایی (۴۹).

www.SID.ir

Archive of SID

این بررسی نشان داد این ساختار می تواند به عنوان یک واکسن مناسب بر علیه کلستریدیوم پرفرینجنز مورد استفاده قرار گیرد (۳۶).

نتیجه‌گیری کلی

این توکسین‌ها از عوامل مهم ویرولانس کلستریدیوم پرفرینجنز هستند که در ایجاد بیماری‌های متنوع از جمله انتریت نکروتیک نقش دارد. عفونت با سویه‌های کلستریدیوم پرفرینجنز *tpeL* و *netB* مثبت سیر بیماری را سریع تر و میزان مرگ و میر را در جوجه‌های گوشتی بیشتر می نماید. قبل از شناسایی توکسین NetB و پروتئین‌های ایمنوژنیک، سوپرناتانت‌های خام غیرفعال شده با فرمالین مورد استفاده قرار می‌گرفتند. مطالعات چند ساله اخیر بیشتر با استفاده از ایمن سازی از طریق تزریق پروتئین‌های تک یا ترکیبی از پروتئین‌های نوترکیب انجام گردیده است. همچنین مشخص شده که ترکیب پروتئین‌های ایمنوژنیک در مقایسه با ایمن‌سازی با تک پروتئین از محافظت بهتری برخوردار است. از سویی دیگر پروتئین‌های ایمنوژن با استفاده از یک دوز، وکتورهای باکتریایی (یا ویروسی یا انگلی) زنده ضعیف شده که برای مدت زمان طولانی تری آن را به سیستم ایمنی ارائه می‌نمایند نیز مد نظر قرار می‌گیرند. در این مقاله توالی *tpeL* و *netB* مورد آنالیز و بررسی قرار گرفت. همچنین واکسن نوترکیب آزمایشی و موتانت‌هایی با فعالیت سایتوتوکسیک کمتر طراحی شد. نتایج این مطالعه حاکی از آن است که واکسن‌های نسل جدید می توانند به عنوان واکسن مناسب علیه انتریت نکروتیک طیور مورد استفاده قرار گیرند.

منابع مورد استفاده

1- Alvin, J. W. and D. B. Lacy. 2018. Structure Function Studies of Large Clostridial Cytotoxins. pp.135-152. In: Gopalakrishnakone, P. Stiles, B. Alape-Girón, A. Dubreuil, J. D. and M. Mandal (ed.). *Microbial Toxins*. Springer, Dordrecht.

2 - Amimoto, K., T. Noro, E. Oishi and M. Shimizu. 2007. A novel toxin homologous to large clostridial cytotoxins found in culture supernatant of *Clostridium perfringens* type C. *Microbiology* 153: 1198-1206.

3- Carter, G. P., J. K. Cheung, S. Larcombe and D. Lyras. 2014. Regulation of toxin production in the pathogenic clostridia. *Molecular microbiology* 91(2): 221-231.

4- Chen, J. and B. A. McClane. 2015. Characterization of *Clostridium perfringens* TpeL toxin gene carriage, production, cytotoxic contributions, and trypsin sensitivity. *Infection and immunity* 83(6): 2369-2381.

5- Coursodon, C., R. Glock, K. Moore, K. Cooper and J. Songer. 2012. TpeL-producing strains of *Clostridium perfringens* type A are highly virulent for broiler chicks. *Anaerobe* 18(1): 117-121.

6- Egerer, M., T. Giesemann, T. Jank, K. J. F. Satchell and K. Aktories. 2007. Auto-catalytic cleavage of *Clostridium difficile* toxins A and B depends on cysteine protease activity. *Journal of Biological Chemistry* 282(35): 25314-25321.

7- Freedman, J. C., J. R. Theoret, J. A. Wisniewski, F. A. Uzal, J. I. Rood and B. A. McClane. 2015. *Clostridium perfringens* type A–E toxin plasmids. *Research in microbiology* 166(4): 264-279.

8- Genisyuerek, S., P. Papatheodorou, G. Guttenberg, R. Schubert, R. Benz and K. Aktories. 2011. Structural determinants for membrane insertion, pore formation and translocation of *Clostridium difficile* toxin B. *Molecular microbiology* 79(6): 1643-1654.

9- Gibert, M., C. Jolivet-Renaud and M. R. Popoff. 1997. Beta2 toxin, a novel toxin produced by *Clostridium perfringens*. *Gene* 203(1,5): 65-73.

10- Greco, A., J. G. Ho, S.-J. Lin, M. M. Palcic, M. Rupnik and K. K. Ng. 2006. Carbohydrate recognition by *Clostridium difficile* toxin A. *Nature structural & molecular biology* 13(5): 460-461.

11- Hegazy, W. A. H. and M. Hensel. 2012. *Salmonella enterica* as a vaccine carrier. *Future microbiology* 7(1): 111-127.

12- Hofmann, F., C. Busch, U. Prepens, I. Just and K. Aktories. 1997. Localization of the glucosyltransferase activity of *Clostridium difficile* toxin B to the N-terminal part of the holotoxin. *Journal of Biological Chemistry* 272(17): 11074-11078.

13- Jank, T. and K. Aktories. 2008. Structure and mode of action of clostridial glucosylating toxins: the ABCD model. *Trends in microbiology* 16(5): 222-229.

14- Kamalirousta, M. and L. R. Pilehchian. 2017. In silico fusion of epsilon and alpha toxin genes of *Clostridium perfringens* type and *Clostridium septicum*. *Veterinary researches biological products* 29: 128-135.

15- Keyburn, A. L., J. D. Boyce, P. Vaz, T. L. Bannam, M. E. Ford, D. Parker, A. Di Rubbo, J. I. Rood and R. J. Moore. 2008. NetB, a new toxin that is associated with avian necrotic enteritis caused by *Clostridium perfringens*. *PLoS pathogens* 4(2): 0001-0011.

16- Keyburn, A. L., R. W. Portela, K. Sproat, M. E. Ford, T. L. Bannam, X. Yan, J. I. Rood and R. J. Moore. 2013. Vaccination with recombinant NetB toxin partially protects broiler chickens from necrotic enteritis. *Veterinary research* 44(1): 1-8.

17- Kulkarni, R., V. Parreira, S. Sharif and J. Prescott. 2006. *Clostridium perfringens* antigens recognized by broiler chickens immune to necrotic enteritis. *Clinical and Vaccine Immunology* 13(12): 1358-1362.

18- Kulkarni, R., V. Parreira, S. Sharif and J. Prescott. 2008. Oral immunization of broiler chickens against necrotic enteritis with an attenuated *Salmonella* vaccine vector expressing *Clostridium perfringens* antigens. *Vaccine* 26(33): 4194-4203.

19- Lanckriet, A., L. Timbermont, V. Eeckhaut, F. Haesebrouck, R. Ducatelle and F. Van Immerseel. 2010. Variable protection after vaccination of broiler chickens against necrotic enteritis using

www.SID.ir

Archive of SID

supernatants of different *Clostridium perfringens* strains. *Vaccine* 28(36): 5920-5923.

20- Lepp, D., B. Roxas, V. R. Parreira, P. R. Marri, E. L. Rosey, J. Gong, J. G. Songer, G. Vedantam and J. F. Prescott. 2010. Identification of novel pathogenicity loci in *Clostridium perfringens* strains that cause avian necrotic enteritis. *PLoS One* 5(5): 1-18.

21- Li, J., V. Adams, T. L. Bannam, K. Miyamoto, J. P. Garcia, F. A. Uzal, J. I. Rood and B. A. McClane. 2013. Toxin plasmids of *Clostridium perfringens*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 77(2): 208-233.

22- Li, J., F. A. Uzal and B. A. McClane. 2016. *Clostridium perfringens* sialidases: potential contributors to intestinal pathogenesis and therapeutic targets. *Toxins* 8(11): 1-15.

23- MacLennan, J. D. 1962. The histotoxic clostridial infections of man. *Bacteriological reviews* 26: 177-274.

24- Mamandi, H., B. Golestani Eimani and R. Pilehchian Langroudi. 2019. Cloning of Tpel Gene of *Clostridium perfringens* in *E. coli*. *Modares Journal of Biotechnology* 10(1): 103-107.

25- Moore, R. J. 2016. Necrotic enteritis predisposing factors in broiler chickens. *Avian Pathology* 45(3): 275-281.

26- Nagahama, M., M. Oda and K. Kobayashi. Section. 2012. Glycosylating Toxin of *Clostridium perfringens*. pp. 153-172. In: Petrescu. S (ed.).Glycosylation. In Tech. Croatia.

27- Nagahama, M., A. Ohkubo, M. Oda, K. Kobayashi, K. Amimoto, K. Miyamoto and J. Sakurai. 2011. *Clostridium perfringens* TpeL glycosylates the Rac and Ras subfamily proteins. *Infection and immunity* 79(2): 905-910.

28- Ohtani, K. and T. Shimizu. 2016. Regulation of toxin production in *Clostridium perfringens*. *Toxins* 8(7): 1-14.

29- Papatheodorou, P., C. Zamboglou, S. Genisyuerek, G. Guttenberg and K. Aktories. 2010. Clostridial glucosylating toxins enter cells via clathrin-mediated endocytosis. *PloS one* 5(5): 1-8.

30- Paredes-Sabja, D., N. Sarker and M. R. Sarker. 2011. *Clostridium perfringens* tpeL is expressed during sporulation. *Microbial pathogenesis* 51(5): 384-388.

31- Pauillac, S., J. D'allayer, P. Lenormand, J. C. Rousselle, P. Bouvet and M. R. Popoff. 2013. Characterization of the enzymatic activity of *Clostridium perfringens* TpeL. *Toxicon* 75: 136-143.

32- Pilehchian Langroudi, R. 2013. Molecular biology of Clostridium perfringens focusing on epsilon and beta toxin genes. *Journal of Veterinary Laboratory Research* 5: 5-19.

33- Pilehchian Langroudi, R. 2015. Isolation, specification, molecular biology assessment and vaccine development of *Clostridium* in Iran: a review. *International Journal of Enteric Pathogens* 3: 1-7.

34- Rappuoli, R., S. Black and P. H. Lambert. 2011. Vaccine discovery and translation of new vaccine technology. *The Lancet* 378(9788): 360-368.

35- Robinson, K., L. Chamberlain, M. Lopez, C. Rush, H. Marcotte, R. Le Page and J. Wells. 2004. Mucosal and cellular immune responses elicited by recombinant *Lactococcus lactis* strains expressing tetanus toxin fragment C. *Infection and immunity* 72(5): 2753-2761.

36- Rostami, A., F. Goshadrou, R. P. Langroudi, S. Z. Bathaie, A. Riazi, J. Amani and G. Ahmadian. 2016. Design and expression of a chimeric vaccine candidate for avian necrotic enteritis. *Protein Engineering, Design and Selection* 30(1): 39-45.

37- Savva, C. G., S. P. F. da Costa, M. Bokori-Brown, C. E. Naylor, A. R. Cole, D. S. Moss, R. W. Titball and A. K. Basak. 2013. Molecular architecture and functional analysis of NetB, a pore-forming toxin from *Clostridium perfringens*. *Journal of Biological Chemistry* 288(5): 3512-3522.

38- Sayeed, S., J. Li and B. A. McClane. 2010. Characterization of virulence plasmid diversity among *Clostridium perfringens* type B isolates. *Infection and immunity* 78(1): 495-504.

39- Schorch, B., S. Song, F. R. van Diemen, H. H. Bock, P. May, J. Herz, T. R. Brummelkamp, P. Papatheodorou and K. Aktories. 2014. LRP1 is a receptor for *Clostridium perfringens* TpeL toxin indicating a two-receptor model of clostridial glycosylating toxins. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111(17): 6431-6436.

40- Shimizu, T., K. Ohtani, H. Hirakawa, K. Ohshima, A. Yamashita, T. Shiba, N. Ogasawara, M. Hattori, S. Kuhara and H. Hayashi. 2002. Complete genome sequence of *Clostridium perfringens*, an anaerobic flesh-eater. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99(2): 996-1001.

41- Stevens, D. L., M. J. Aldape and A. E. Bryant. 2012. Life-threatening clostridial infections. *Anaerobe* 18(2): 254-259.

42- To, H., T. Suzuki, F. Kawahara, K. Uetsuka, S. Nagai and T. Nunoya. 2016. Experimental induction of necrotic enteritis in chickens by a netB-positive Japanese isolate of *Clostridium perfringens*. *Journal of Veterinary Medical Science* 79(2): 350-358.

43- Tolooe, A., M. Ranjbar, Y. Tamadon and S. Seyedmousavi. 2014. Immunoinformatic Analysis of Alpha and TpeL Toxin of *Clostridium perfringens*. The 12th Biennial Congress of the Anaerobe Society of the Americas and The 37th Congress of the Society for Microbial Ecology and Disease. Chicago, USA. pp. 171.

44- Uzal, F. A. and J. G. Songer. 2008. Diagnosis of Clostridium perfringens intestinal infections in sheep and goats. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 20(3): 253-265.

45-Wang, H., X. Ni, X. Qing, L. Liu, J. Lai, A. Khalique, G. Li, K. Pan, B.

www.SID.ir

Archive of SID

Jing and D. Zeng. 2017. Probiotic enhanced intestinal immunity in broilers against subclinical necrotic enteritis. *Frontiers in immunology* 8: 1-14.
46- Wilde, S., Y. Jiang, A. M. Tafoya, J. Horsman, M. Yousif, L. A. Vazquez and K. L. Roland. 2019. Salmonella-vectored vaccine delivering three *Clostridium perfringens* antigens protects poultry against necrotic enteritis. *PloS one* 14(2): 1-18.
47- Yan, X.-X., C. J. Porter, S. P. Hardy, D. Steer, A. I. Smith, N. S. Quinsey, V. Hughes, J. K. Cheung, A. L. Keyburn and M. Kaldhusdal. 2013. Structural and functional analysis of the pore-forming toxin NetB from *Clostridium perfringens*. *MBIO* 4(1): 1-9.
48- Zahoor, I., A. Ghayas and A. Basheer. 2018. Genetics and genomics of susceptibility and immune response to necrotic enteritis in chicken: a review. *Molecular biology reports* 45(1): 31-37.
49- Zaragoza, N. E., C. A. Orellana, G. A. Moonen, G. Moutafis and E. Marcellin. 2019. Vaccine production to protect animals against pathogenic clostridia. *Toxins* 11(9): 525.
50- Zekarias, B., H. Mo and R. Curtiss. 2008. Recombinant attenuated *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* expressing the carboxy-terminal domain of alpha toxin from *Clostridium perfringens* induces protective responses against necrotic enteritis in chickens. *Clinical and Vaccine Immunology* 15(5): 805-816.

www.SID.ir