

پروتئین‌های ایمنی‌زای مشترک بین سروتیپ‌های پاستور لا مولتوسیدا: کاندیدهای 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 سلولی مولکول، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، کرج، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶-۰۹-۲۶ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷-۱۱-۱۴

Email: 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 شناسایی عوامل ایمنی‌زایی که بین این تیپ‌های مختلف مشترک باشند را الزام آور کرده است. به منظور شناسایی پروتئین‌های ایمنی‌زای مشترک بین سروتیپ‌های A1، A3، A4 پاستور لا مولتوسیدا، ایمونوبلاتینگ آنتی‌ژن خام سو نیکه در برابر آنتی‌سرم مورد بررسی قرار گرفت. ۳۵ قطعه جوجه ۲ ماهه در ۷ گروه ۵ تایی تقسیم و با سروتیپ‌های مذکور به صورت مونووالان و تری‌والان در چهار نوبت با فواصل زمانی ۱۴ روز بین نوبت اول و دوم و ۱۰ روز بین نوبت دوم و سوم و سوم و چهارم تزریق شدند. اولین تزریق آنتی‌ژن‌ها با آدجوان کامل فروند، تزریقات دوم و سوم با آدجوان ناقص فروند و تزریق چهارم بدون آدجوان انجام گرفت. از میان پروتئین‌هایی که قادر به ایجاد پاسخ هومورال قابل تعیین با ایمونوبلاتینگ 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 با سوسپانسیون پیکره باکتری قادر به واکنش با هر یک از هر سه سروتیپ می‌باشد. مولکول ۳۹ کیلو دالتونی که به شکل بارزتری واکنش داده بود، به عنوان کاندیدا جهت ادامه مطالعات و تولید واکسن معرفی می‌گردد.

کلمات کلیدی: پاستور لا مولتوسیدا، وبای مرغان، پروتئین‌های ایمنی‌زای مشترک، واکسن

- 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 immunoblot and introduced as candidate for molecular identification and future vaccine studies.

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

مقدمه

روی شناخت نقش میکروارگانیزم‌ها در ایجاد بیماری‌های عفونی بر روی این بیماری صورت گرفته است. استفاده از تکنیک کاهش حدت باکتری‌ها برای تهیه واکسن زنده به منظور ایمن‌سازی در برابر بیماری بیش از یکصد سال پیش توسط دانشمند فرانسوی لوئی پاستور بر روی عامل این بیماری یعنی پاستورلا مولتوسیدا انجام شد. پیشرفت‌ها و مطالعات زیادی از آن زمان تا کنون بر روی واکسن‌های پاستورلا مولتوسیدا صورت گرفته است. جیاثو و همکاران (۲۰۱۶) استفاده از موتانتی که در ژن *phoP* نقص دارد، در ایمنی‌زایی و به عنوان واکسن پیشنهاد کردند ایشان ایمنی‌زایی موتانت *phoPA* را در برابر چالش با سویه‌های حاد بررسی و ۵۴٪ حفاظت گزارش کردند (۱۳). گانگ و همکاران (۲۰۱۶) ایمنی‌زایی واکسن نوترکیب ژن فیمبریای پاستورلا مولتوسیدا (*rPtfA*) سروتیپ A1 در مقایسه با واکسن زنده تخفیف حدت یافته را بررسی و سطح ایمنی را به ترتیب ۴۵٪ و ۷۵٪ گزارش کردند. با این حال به دلیل تنوع در سروتیپ و عدم ایجاد ایمنی متقاطع ناشی از واکنش‌های مشترک با یک سروتیپ علیه سروتیپ دیگر شناسایی پروتئین‌های ایمنی‌زای مشترک برای استفاده در یک دوز واکسن مونوالان با هدف رسیدن به حداکثر ایمنی‌زایی از اهمیت بالایی برخوردار است (۹).

بیماری پاستورلوز طیور (*Pasteurellosis*) یا وبای مرغان (*Fowl Cholera*) از بیماری‌های باکتریایی طیور و پرندگان وحشی است. بیماری توسط سروتیپ‌های مختلف باکتری گرم منفی پاستورلا مولتوسیدا (*Pasteurella multocida*) ایجاد می‌شود. وبای مرغان یک بیماری اولیه محسوب و شکل حاد آن منجر به سپتی سمی و مرگ پرنده می‌شود. اشکال مزمن بیماری نوع غالب آن در پرورش صنعتی ماکیان می‌باشد. بیماری وبای مرغان عامل خسارت اقتصادی قابل توجهی در مزارع صنعتی پرورش طیور و نیز در مزارع سنتی پرورش طیور است. سروتیپ‌های کپسولی E, D, A, B, F و به عنوان عامل بیماری در پرندگان گزارش شده است، هر چند به جز سروتیپ E سایر سروتیپ‌ها از میزبان‌های پرنده جدا شده است. طیف وسیعی از پرندگان به این بیماری حساس می‌باشند. سروتیپ‌های A:1 و A:3 و A:4 از معمول‌ترین عوامل ایجادکننده وبای مرغان در بیشتر کشورها می‌باشند، هر چند تمامی ۱۶ سروتیپ سوماتیک پاستورلا مولتوسیدا، و حتی برخی تیپ‌های کپسولی D نیز به عنوان عامل بیماری گزارش شده‌اند (۸ و ۱۷). اولین موارد شناسایی این بیماری به گذشته بسیار دور یعنی سال ۱۶۰۰ میلادی بر می‌گردد. بسیاری از مطالعات ابتدایی بر

برای بیماری وباي مرغان شناخته شد (۱۱). باور عمومي بر این است که بسیاری از عوامل حدت باکتریها بر روی سطح آنها قرار دارند و تعدادي از آنها در اتصال به سلولهاي ميزبان و تهاجم به آن نقشهاي کلیدی بازی می کنند. علاوه بر این پروتئین های غشای خارجی (OMPs) از آن جایی که طی فرآیند عفونت در تماس مستقیم با سیستم ایمنی ميزبان هستند می توانند به شکل اجزای ایمنی زای باکتریهاي گرم منفي عمل کنند (۱۰). از این روی، OMPs بیشترین توجه را در مطالعات مربوط به بررسی تعامل ميزبان و عوامل بیماریزا به خود اختصاص داده اند. بیش از ۷۰ پروتئین غشای خارجی یا پروتئین وابسته به غشای خارجی در پاستورلا مولتوسیدا شناسائی شده است (۱۲).

در سروتیپ های A:۱ و A:۳ پاستورلا مولتوسیدا عامل وباي مرغان پروتئینی ۳۹kDa شناسائی شده است که قادر به ایجاد مقاومت در برابر عفونت می باشد. این مولکول ۳۹kDa لیپو پروتئین بوده و به نام پروتئین *Plp B (Pasteurella lipoprotein B)* نام گذاری شده است (۲۴). پروتئین ۳۹kDa که با ساخت کپسول در ارتباط است به عنوان عامل چسبندگی معرفی شده است (۱ و ۳).

در ایران بیماری پاستورلوز طیور شایع بوده و از سالها پیش به منظور پیشگیری واکسن کشته باکترین همراه آدجوان هیدروکسید آلومینیوم مصرف می شود. این واکسن که در موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی تولید می شود حاوی سروتیپ A:۱، سروتیپ غالب در کشور، می باشد. در ایران گزارش هائی حاکی از وجود سایر سروتیپها از جمله ۳A و ۴A وجود دارد. از جمله علل ضعف واکسن های کشته پاستورلوز طیور محافظت هومولوگ می باشد در نتیجه واکسیناسیون با هر سروتیپ فقط قادر به ایجاد ایمنی در برابر همان سروتیپ است و در مقابل سایر سروتیپها مقاومت ایجاد نمی کند به همین دلیل در برخی کشورها در تهیه واکسن پاستورلوز طیور از سه سروتیپ مختلف استفاده می گردد (واکسن تري والان). شناسائی عوامل ایمنی زای مشترک بین سروتیپ های مختلف امکان افزایش ایمنی زائی واکسن با به کارگیری آنها در واکسن

بیشتر سویه های پاستورلا دارای کپسولي پلی ساکاریدي بر روی سطح خود هستند که از نظر سولوژیک می توان آنها را به سروتیپهاي A, B, D, E و تقسیم بندی کرد. کپسول از پلی ساکاریدها، لیپوپلي ساکاریدها (LPS) و برخی انواع پروتئینها تشکیل شده است. آنتی ژنی در کپسول پاستورلا مولتوسیدا که عامل ویژگی و اختصاصیت سروتیپها است جزء مواد لیپوپلي ساکاریدي است. در آزمایش همآگلوتیناسیون پاسیو که به عنوان روشی آزمایشی برای سروتایپینگ کپسولي به کار می رود، هر دو مواد لیپوپلي ساکاریدي و پلی ساکاریدي بر روی گلبولهاي قرمز جذب می شوند و در آزمایش نقش کلیدی دارند (۱۹). در مورد پاستورلاهاي ایجادکننده وباي مرغان سویه های کپسولدار و بدون کپسول سروتیپ A (strain X-37) دارای قدرت ایمنی زائی یکسانی در ایمن سازی پرندگان در برابر بیماری وباي مرغان هستند. در سروتیپ A کپسول دارای هیالورونیک اسید می باشد، باور بر این است که این ماده در بیماری زائی این سویه نقش مهمی بازی می کند (۲۴). البته در مورد سروتیپهاي کپسولي B:۲ نشان داده شده است که موتانتهاي بدون کپسول بیماری زائی خود را از دست داده و حتی از آنها به عنوان واکسن زنده استفاده شده است (۴). به طور کلی باور بر این است که LPS دارای نقش مهمی در بیماری زائی سویه های مختلف پاستورلا می باشد. LPS قادر به ایجاد شوک در ميزبان مبتلا به عفونت می باشد. در بین گونه های مختلف پرندگان، بوقلمون نسبتاً در برابر آثار کشنده LPS جدا شده از سویه های عامل وباي مرغان دارای مقاومت بیشتری است. LPS ناخالص جدا شده از باکتری می تواند مقاومت در برابر بیماری ایجاد کند ولي LPS خالص به تنهایی از ایمنی زائی برخوردار نیست (۱۶). از پاستورلا مولتوسیداي سروتیپ A عامل ایجادکننده وباي مرغان موتانتی تهیه شده است که توانائی سنتز آنزیم هپتوزیل ترانسفراز (Heptosyltransferase) را از دست داده بود. این آنزیم در سنتز LPS لازم است که در حضور آن قند هپتوز به LPS افزوده می شود. بیماری زائی این موتانت برای مرغ بسیار کمتر بوده و از این روی به عنوان کاندیداي مناسب واکسن زنده

جدول ۱- برنامه ایمن سازی جوجه ها

شماره گروه	مشخصات گروه	تعداد جوجه
۱	سویه A1 + Adj	۵
۲	سویه A3 + Adj	۵
۳	سویه A4 + Adj	۵
۴	A4 , A3, A1 + Adj	۵
۵	سویه A4 , A3, A1	۵
۶	سویه A1 + ژل آلوم (واکسن تولیدی موسسه)	۵
۷	کنترل	۹

نوری، پیکره باکتری با استفاده از بافر فسفات (PBS) سه مرتبه شستشو و جدا شد. سوپانسیون غلیظ باکتریایی از اجرام شسته شده تهیه و با استفاده از سونیکاتور سونیکه شد تا پیکره باکتریها شکسته شوند. سوپانسیون برای سه بار هر بار ۶۰ ثانیه سونیکه شد و در هر بار بین سونیکه کردن بر روی ظرف یخ خنک گردید. سلولهای شکسته شده طی سونیکاسیون به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد با شتاب ۳۰۰۰xg سانتریفیوژ شدند. در مرحله بعد مایعروئی جدا و با فیلتر ۰٫۲ μm فیلتر شد. این سوپانسیون به دست آمده حاوی تقریباً تمامی مولکولها و مواد تشکیل دهنده باکتری است که در شرایط کشت in-vitro ساخته می شود. این عصاره به دست آمده به نام عصاره تام (cell lysate extract) و به اختصار CE نام گذاری می شود. 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 مولکولی باندهای مورد نظر با روش مقایسه مکان باندهای مارکر تخمین زده شد.

ایمونوبلات (Immunoblotting)

به منظور شناسایی باندهای آنتیژنی بر روی ژل، این باندهای پلی پپتیدی به روی ممبران منتقل شدند. ممبرانها به مدت یک شب با رقت ۱/۲۵۰ آنتی سرمهای جوجهها در دمای ۴ درجه سانتیگراد شیکر شدند. پس از سه بار شستشو ممبران با آنتی سرم اختصاصی جوجه (Anti-Chicken IgY (IgG)–Peroxidase antibody produced in rabbit) (Sigma)) با رقت ۱/۱۰۰۰ به مدت ۱ ساعت بر روی شیکر انکوبه شد. در مرحله بعد پس از سه مرتبه شستشو با بافر ممبران در محلول حاوی سوبسترا (3-diaminobenzidine tetrahydrochloride) در Tris بافر حاوی پراکسید هیدروژن قرار گرفت. پس از ظهور باندها با افزودن آب فراوان واکنش متوقف و ممبران خشک و مطالعه شد.

نتایج

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

و همچنین امکان تولید واکسن مونووالان با توانایی ایجاد ایمنی در برابر سروتیپهای مختلف را ایجاد می کند. در این مطالعه سه سروتیپ شایع پاستورلا در ایران مورد بررسی قرار گرفت تا در حد امکان مقدمه شناسایی برخی از پروتئینهای ایمنی زا 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 تایی تقسیم و در قفسهای مجزای شماره گذاری شده نگهداری شدند. به منظور تهیه آنتی سرم، ایمن سازی جوجههای گروه ۱ و ۲ و ۳ به ترتیب با سویه های ۱:A و ۳:A و ۴:A به همراه آدجوان انجام شد. به گروه ۴ هر سه سویه باهم به همراه آدجوان و به جوجههای گروه ۵ هر سه سویه بدون آدجوان تزریق شد. یکی از بچه های واکسن کشته پاستورلوز سروتیپ ۱:A موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی انتخاب و در گروه ۶ استفاده شد. تزریقات به روش داخل عضلانی (IM) داخل عضله سینه در چهار نوبت با فواصل زمانی 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) و تزریقات دوم و سوم با آدجوان ناقص فروند و تزریق چهارم بدون آدجوان انجام گردید (جدول ۱ و ۲). در گروه کنترل تزریقات مطابق جدول زمان بندی انجام گردید ولی ماده تزریقی فقط شامل نرمال سالین بود.

خون گیری

یک هفته پس از آخرین تزریق برای تهیه سرم هایپر ایمنیون خونگیری از جوجه های واکسینه و کنترل (غیر واکسینه) از ورید بال صورت گرفت. سرم خونهای گرفته شده جدا و تا زمان انجام آزمایشهای مربوطه در فریزر ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد.

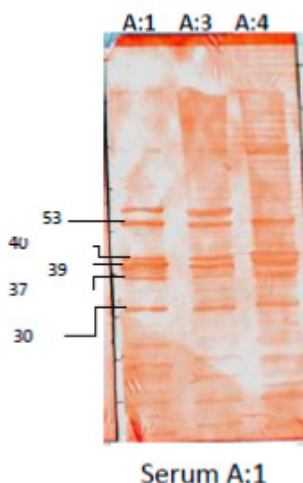
تهیه عصاره سلولی (cell lysate extract) CE

سویه های ۱:A و ۳:A و ۴:A پاستورلا مولتوسیدا بر روی محیط آبگوشت تریپتوز فسفات (TPB) کشت داده شدند. از کشت های ۱۸ ساعته پس از اطمینان از خلوص با رنگ آمیزی گرم و مشاهده مستقیم با میکروسکوپ

جدول ۲- زمان بندی تزریقات

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

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



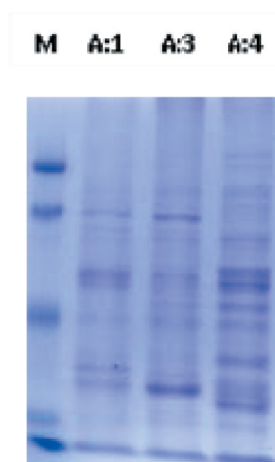
شکل ۲- ایمونوبلات عصاره سلولی CE پاستورلا مولتوسیدا سروتیپ های A:۱ و A:۳ و A:۴ با استفاده از سرم جوجه واکسینه با سروتیپ A:۱

تلقی شدند.

شکل ۲ ایمونوبلات 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 باندهای قوی با وزن مولکولی تقریبی ۵۳ کیلو دالتون مشاهده می‌شود که در هر سه سروتیپ واکنش نسبتاً 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

مولتوسیدا عامل بیماری ویای مرغان بر روی ژل پلی آکرلامید (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.

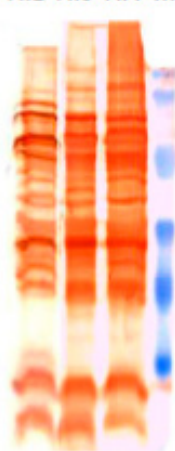


شکل ۱- پروفایل عصاره سلولی پاستورلا مولتوسیدا سروتیپ های A:۱ و A:۳ و A:۴ بر روی ژل ۱۰٪ SDS-PAGE رنگ آمیزی شده با آبی کوماسی

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 آنتی‌بادی‌هایی 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

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 ۴A 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

A:1 A:3 A:4 M



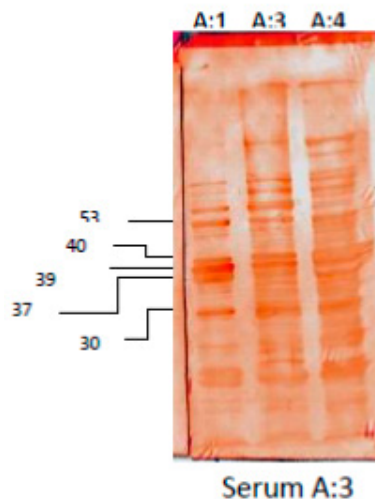
Serum A:1, A:3, A:4

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.

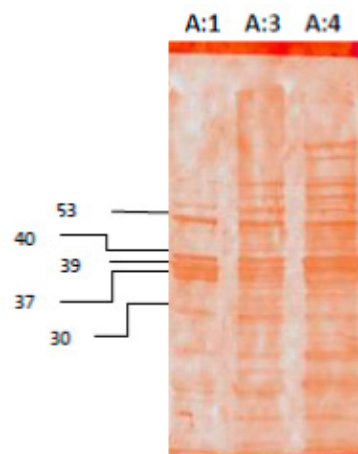
شکل ۵ ایمونوبلات باندهای سه سروتیپ مورد مطالعه را در برابر سرم جوجه ایمن شده با سوسپانسیون تریوالان حاوی سروتیپ های A:۱ و A:۳ و A:۴ نشان می‌دهد. همان‌گونه که در تصویر مشاهده می‌شود تعداد باندها در مقایسه با ایمونوبلات‌های با استفاده از سرم‌های مونوالان بیشتر است. در این آزمایش باندی با واکنشی بسیار قوی 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 کیلو دالتون دو باند پهن غیر واضح مشاهده می‌شود که احتمالاً 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

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 بالایی 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 نسبتاً قوی در محدوده وزن مولکولی ۵۳ کیلو دالتون در هر سه سروتیپ



Serum A:3

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



Serum A:4

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

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 سکناس 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 محافظت‌کننده 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 پروتئین‌هایی که قادر به ایجاد پاسخ هومورال قابل تعیین با ایمونوبلاتینگ 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 پروتئین‌هایی یا مولکول‌هایی که در بخش دارای دست کم ساختار پروتئینی با وزن مولکولی ۴۰، ۳۷، ۵۳ و ۳۰ کیلو دالتونی است قرار می‌گرفتند. از بین این پنج مولکول، مولکول ۳۹ کیلو دالتونی به شکل بارزتری در آزمایش‌های ایمونوبات مشاهده شد.

در مورد باکتری‌های گرم منفی غشاء خارجی وظایف حیاتی بر عهده دارد که تقریباً 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 تعیین‌کننده در مکانیسم‌های ورود و بیماری‌زائی می‌باشند. علاوه بر این از آنجائی‌که این مولکول‌ها در دسترس و تماس مستقیم با سیستم ایمنی میزبان هستند عمدتاً 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 پروتئین‌های OMP با وزن مولکولی ۵۰ و ۳۷ 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 واکنشی 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 شناسائی شده دو باند ۳۹ و ۵۲ کیلو دالتون آن با مطالعه ما مشابهت داشت. این مطالعه مهم‌ترین باند شناسائی شده را با روش مس اسپکترومتری OMP PlpB شناسائی و به عنوان پروتئین با خواص ایمنی متقاطع معرفی 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 محافظت‌کننده 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 کیلو دالتونی که از سروتیپ A:۱ تهیه شده بود قادر به ایجاد ایمنی در برابر چالنج با سروتیپ هتولوگ 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 قبلی *PlpE* را در جوجه و موش به آنتی‌ژن محافظت‌کننده شناسائی کرده بود (۳۴). در مورد *Mannheimia haemolytica* نیز *PlpE* به عنوان مولکولی بسیار محافظت‌کننده در گاو شناسائی شده است و جالب اینکه بین این دو مولکول *PlpE* قرابت سکناس آمینو اسیدی به میزان ۲۲٪ وجود دارد (۷). *PlpE* مولکولی OMP است که دارای قطعه لپیدی است و در مانهمیا همولیتیکا در سطح خارجی باکتری قرار دارد و در فرآیند کشته شدن باکتری توسط سیستم کمپلمان نقش دارد (۱۸). در واکسن تجاری مانهمیا همولیتیکا که در گوساله‌ها استفاده می‌شود اضافه کردن *PlpE* نوترکیب به واکسن باعث مقاومت کوساله در برابر چالنج با دو سروتیپ ۱ و ۶ شده است (۶ و ۲۱). از سوی دیگر نشان داده

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-

شده است که PIPE در بین تمامی سویه‌های شناخته شده پاستورلا از قرابت و مشابهت بسیار بالایی (۹۰-۹۱٪) برخوردار است (۲۲). با توجه به وجود این پروتئین ایمنی‌زا در هر سه سروتیپ تحت مطالعه ما ممکن است بتوان مانند روشی که برای بهبود ایمنی‌زایی واکسن مانهمیا مرسوم شد، بتوان در مورد واکسن باکترین پاستورلوز طیور مؤسسه رازی نیز بتوان با افزودن *PlpE* ایمنی‌زایی واکسن را افزایش داد و همچنین ایمنی در برابر سروتیپ‌های A:۳ و A:۴ که در واکسن موجود نیستند نیز ایمنی ایجاد نمود. البته این موضوع نیاز به مطالعات بیشتر و انجام آزمایش‌های مربوط دارد.

این عوامل ایمنی‌زای مشترک مولکول‌های پروتئینی هستند (با مولکول‌هایی که در بخشی دارای ساختاری پروتئینی هستند) با وزن‌های مولکولی ۳۹، ۴۰، ۳۷، ۵۳ و ۳۰ کیلو دالتون. این مطالعات شامل شناسایی مولکولی این جزء ۳۹ کیلو دالتونی و همچنین بررسی امکان افزودن این جزء به واکسن فعلی تولید مؤسسه رازی به منظور افزایش دامنه ایمنی‌زایی آن برای ایجاد مقاومت در برابر عفونت با سایر سروتیپ‌ها می‌باشد.

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-Borathybay, 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*.

- 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 haemolytica* outer 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*. *Infection 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.

