



Designing a candidate vaccine structure for *Eimeria* pathogenic species of poultry using immunoinformatics methods

¹ Mehdi Arab Hasan Abadi , Zahra Asadollahi ² , Majid Mohammad Sadegh ³ 

1. Garmsar Azad University, Garmsar, Iran
2. Assistant professor of Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Lorestan University, Khorramabad, Iran
3. Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Garmsar Azad University, Garmsar, Iran

ABSTRACT

Background and Aim: Coccidiosis is caused by various species of *Eimeria*, a protozoan parasite belonging to the phylum *Epicomplexa*. This disease is one of the common diseases in poultry that causes major economic losses all over the world. Due to the experience of economic loss in production and prevention of the disease and occurrence of chemical resistance, researches have been shifted toward alternative approaches such as immunologic methods. Vaccine preparation is an alternative way in which choosing an appropriate protein with high immune induction potency is a prerequisite. In addition according to studies, using more than one protein could better enhance the immune induction and antibody production. Choosing immunogenic epitopes from selected proteins and adjoining them with a suitable linker is one of the novel approaches in vaccine design.

Materials and Methods: Based on the fact that both IMP-1 and AMA-1 proteins of *Eimeria* were previously recognized as potent immunogenic antigens, we predicted the immunogenic epitopes of these proteins by immunoinformatic methods. Among studied epitopes, those that were met by multiple bioinformatics tools were used.

Results: Finally, the polytopic construction was designed by assembling the selected epitopes and connecting those using suitable linkers.

Conclusion: Using immunoinformatic tools, we predicted the characteristics of two genes of *Eimeria* strains as fused potent vaccine candidates namely, AMA-1 and IMP-1.

Keywords: AMA-1, IMP-1, *Eimeria*, Poultry, vaccine design, Iran

Received: 2023.10.07;

Accepted: 2024.02.02;

Published Online: 2024.02.08

Corresponding Information:

Zahra Asadollahi, Assistant professor of Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Lorestan University, Khorramabad, Iran. Email: asadollahi.za@lu.ac.ir



Copyright © 2023, This is an original open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-noncommercial 4.0 International License which permits copy and redistribution of the material just in noncommercial usage with proper citation.

دو فصلنامه

بهداشت و بیماری های عفونی دام

سال ۱، شماره ۱

صفحه مجله: <https://jahid.lu.ac.ir/>

طراحی سازه کاندید واکسن برای گونه های بیماری زای /بیمریای طیور با استفاده از روش های ایمونوآنفورماتیک

^۱ مهدی عرب حسن آبادی ^{id}، زهرا اسدالهی ^{id}، مجید محمد صادق ^{id}

۱. دانشگاه آزاد واحد گرمسار، گرمسار، ایران

۲. استادیار گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه لرستان، خرم آباد، ایران

۳. گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد واحد گرمسار، گرمسار، ایران

چکیده

زمینه و هدف: کوکسیدبوز طیور را گونه های مختلف /بیمریا ایجاد می کنند، این انگل تک یاخته ای متعلق به شاخه ای کمپلکس است. این بیماری یکی از بیماری های رایج در طیور است که در سراسر جهان ضررهای اقتصادی عمده ای به بار می آورد. با توجه به ایجاد ضرر و زیان اقتصادی در صنعت طیور و پیشگیری از بروز مقاومت شیمیایی، تحقیقات به سمت رویکردهای جایگزین مانند روش های ایمونولوژیک سوق داده شده است. تهیه واکسن، روش جایگزینی است که در آن انتخاب یک پروتئین مناسب با قدرت القای ایمنی بالا یک پیش نیاز محسوب می شود. علاوه بر این، طبق مطالعات، استفاده از بیش از یک پروتئین می تواند القای ایمنی و تولید آنتی بادی را بهتر افزایش دهد. انتخاب اپی توپ های ایمونوژنیک از پروتئین های منتخب و چسباندن آن ها با یک پیوند دهنده مناسب، یکی از رویکردهای جدید در طراحی واکسن است.

مواد و روش ها: با توجه به اینکه هر دو پروتئین IMP-1 و AMA-1 /بیمریا قبلاً به عنوان آنتی ژن های ایمنی زای قوی شناخته شده اند، در این مطالعه اپی توپ های ایمونوژنیک این پروتئین ها با روش های ایمونو آنفورماتیک پیش بینی شده اند. در بین اپی توپ های پیشنهاد شده، اپی توپ هایی که با ابزارهای بیوانفورماتیک متعدد تأیید شدند، استفاده شد.

یافته ها: با اتصال اپی توپ های انتخابی و اتصال آن ها با لینکرهای مناسب، ساختار پلی توپیکی طراحی شد.

نتیجه گیری: با استفاده از ابزارهای ایمونو آنفورماتیک، اپی توپ های دو ژن AMA-1 و IMP-1 از سویه های انگل /بیمریا ترکیب شده و به عنوان کاندیدای واکسن قوی پیش بینی شد.

کلیدواژه ها: AMA-1، IMP-1، /بیمریا، طیور، طراحی واکسن، ایران

تاریخ انتشار: ۱۴۰۲/۱۱/۰۱

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۱/۱۳

دریافت: ۱۴۰۲/۰۷/۱۵

اطلاعات نویسنده مسئول: زهرا اسدالهی، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه لرستان، ایران، Email: asadolahi.za@lu.ac.ir

حق چاپ © ۲۰۲۳، این یک مقاله با دسترسی آزاد اصلی است که تحت شرایط



Creative Commons Attribution-noncommercial 4.0 International License توزیع شده است که اجازه کپی و توزیع مجدد

مطالب را فقط در استفاده غیرتجاری با استناد مناسب می دهد.

مقدمه

کوکسیدیز به وسیله گونه‌های مختلف *آیمریا*، یک انگل تک‌یاخته‌ای متعلق به شاخه اپیکمپلکسا، ایجاد می‌شود. این بیماری یکی از بیماری‌های رایج در طیور است که در سراسر جهان خسارات اقتصادی کلانی به بار می‌آورد (۱ و ۲). اعضای این خانواده با کمپلکس راسی خود شناخته می‌شوند و همه آن‌ها انگل‌های داخل سلولی هستند. کوکسیدیز پس از بلع اوویست‌های اسپوردار در میزبان‌های حساس رخ می‌دهد. پرندگان آلوده و نیز پرندگان بهبود یافته، اوویست‌ها را از طریق مدفوع دفع می‌کنند که باعث آلودگی خوراک، گردوغبار، آب، بستر و خاک می‌شود. اوویست‌ها ممکن است به وسیله حامل‌های مکانیکی مانند تجهیزات، لباس، حشرات، کارگران مزرعه و سایر حیوانات نیز منتقل شوند (۳). کوکسیدیز سلول‌های اپیتلیال روده طیور را درگیر می‌کند (۳). *آیمریاتنلا* و *آیمریانکتاریکس* بیماری‌ها را در گونه‌های *آیمریای* طیورند و باعث ضایعات خونی و مرگومیر می‌شوند (۴ و ۵). بیشتر گونه‌های *آیمریا*، پرندگان ۳ تا ۱۸ هفته را تحت تأثیر قرار می‌دهند و می‌توانند باعث مرگومیر فراوان در جوجه‌های جوان شود. در شرایط مزرعه معمولاً آلودگی به صورت مختلط یافت می‌شود (۵ و ۶). از سال ۱۹۷۱ داروهای ترجیحی برای کنترل کوکسیدیز آنتی بیوتیک‌های یونوفور بوده‌اند. با این حال، استفاده طولانی مدت از کوکسیديواستات‌ها به ناچار منجر به تغییر شکل غیر منتظره *آیمریا* شده که باعث افزایش مقاومت به تمام داروهای یونوفور ضد کوکسیدیز می‌شود (۷). گسترش مقاومت دارویی در کوکسیدیز پرندگان، باقی ماندن دارو در محصولات طیور، فشار مصرف‌کننده برای اجتناب از مصرف داروهای شیمیایی و اعلام اتحادیه اروپا مبنی بر ممنوعیت استفاده از ترکیبات شیمیایی ضد کوکسیدیز باعث توجه به واکسیناسیون طیور در برابر کوکسیدیز شده است (۸). مطالعات اخیر نشان می‌دهد که واکسن‌های مبتنی بر DNA ممکن است بدون داشتن معایب ناشی از درمان‌های شیمیایی و واکسن‌های زنده، در ایجاد ایمنی کافی در برابر عفونت‌های کوکسیدیایی مؤثر باشند (۹). بنابراین یکی از روش‌های مؤثر در کنترل کوکسیدیز استفاده از واکسن است که در همین راستا محققان پروتئین‌های ایمونوژن بسیاری را معرفی کرده‌اند (۱۰). یکی از این پروتئین‌های ایمونوژن IMP-1 است. IMP-1 پروتئین غشایی‌ای است که به‌عنوان یک آنتی‌ژن ایمونوژنیک در *آیمریا ماکسیما* شناسایی شده است. این آنتی‌ژن می‌تواند علیه آلودگی به دیگر گونه‌های *آیمریا* مانند *آیمریا*

تنلا، *آیمریا می‌تیس*، *آیمریا آسرولینا* و *آیمریا نکاتریکس* و دیگر انگل‌های شاخه اپی کمپلکسا مانند توکسوپلازما ایمنی ایجاد کند. مطالعات مختلف نشان داده‌اند که واکسیناسیون با فرمولاسیون‌های بیان شده IMP-1 از گونه‌های *آیمریا* با استفاده از وکتورهای مختلف، پاسخ ایمنی چشمگیری علیه آلودگی به *آیمریا* ایجاد می‌کند (۱۰ و ۱۱). AMA1 نوعی پروتئین غشایی دیگر است که به‌عنوان پروتئین ایمونوژن کاندید واکسن در بسیاری از انگل‌های اپی کمپلکس شناخته شده است. از میکرونم‌ها آزاد می‌شود و در بیشتر انگل‌های اپی کمپلکس مشترک است. این پروتئین چندین نقش مهم در طول فرایند نفوذ انگل دارد (۱۲ و ۱۳).

تحقیقات بسیاری نشان داده‌اند که واکسن‌های مولتی اپی توپیک دارای کارایی و ایمنی بالایی در برابر عوامل بیماری‌زای متعدد مانند پلاسمودیوم فالسیپاروم (مالاریا)، ویروس بونیا (ویروس تب دره ریفت)، کلبسیلا پنومونیه، توکسوپلازما گوندی و آدنوویروس هستند. در واقع استفاده از چند پروتئین ایمونوژن اثر بخشی بالاتری نسبت به استفاده از واکسن‌های تک آنتی ژنی دارد (۱۴ و ۱۵). از این رو این مطالعه آنتی‌ژن‌های IMP-1 و AMA-1 *آیمریا* را با هدف ایجاد یک واکسن مولتی اپی توپیک بالقوه و مقرون به صرفه علیه گونه‌های *آیمریا* با استفاده از شناسایی اپی توپ‌های سلول T و سلول B بررسی کرده است. در این بررسی از تکنیک‌های ایمونوفورماتیک جهت شناسایی اپی توپ‌های ایمونوژن و ارزیابی اثر بخشی این اپی توپ‌ها در القای پاسخ ایمنی در میزبان استفاده شده است.

مواد و روش کار

دریافت توالی اسیدآمینه‌ای پروتئین‌ها

توالی هریک از پروتئین‌های IMP-1 با شماره دسترسی cb180638.2 برای *آیمریاتنلا* و CBL80637.1 برای *آیمریاماکسیما* به ترتیب به طول‌های ۳۸۷ و ۳۷۶ اسیدآمینه و توالی پروتئینی AMA-1 به شماره دسترسی XP-013234756.1 برای *آیمریاتنلا* و CEH27561.1 برای *آیمریاماکسیما* به ترتیب به طول‌های ۶۱۲ و ۴۲۳ اسیدآمینه از بخش مرجع سرور UniProtKB به آدرس <http://www.uniprot.org/> دریافت شد و در فرمت FASTA ذخیره شد.

مدل سازی ساختار سه بعدی پروتئین‌ها

به ترتیب با استفاده از الگوریتم های Emini و Karplus & Schulz بررسی شد. اپی-توپ های پیش بینی شده با استفاده از نرم افزار Chimera به دقت بررسی شده و در نهایت اپی-توپ هایی که در دسترسی بیشتری داشته و در معرض بودند انتخاب شدند.

طراحی ساختار دو بعدی و سه بعدی سازه طراحی شده

ساختار دو بعدی مدل طراحی شده با استفاده از سرور PSIPRED (<https://bio.tools/psipred>) و GOR IV (https://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=NPSA/npsa_gor4.html) طراحی و آنالیز شد. همچنین با استفاده از سرور ITASSER سازه طراحی شده به منظور بررسی و اصلاح ایرادهای احتمالی ساختار سه بعدی مدل شده از آنالیز رامچاندرا پلات استفاده شد.

آنالیز سازه طراحی شده

آلرژنسیستی سازه با استفاده از سرور AllerTop V. 2.0 به آدرس (<https://www.ddg-pharmfac.net/AllerTOP/>) بررسی شد. همچنین میزان حلالیت و آنتی ژنیستی سازه با استفاده از سرور SOLpro به آدرس (<http://scratch.proteomics.ics.uci.edu/>) ارزیابی شد. در نهایت از PROsa (<https://prosa.services.came.sbg.ac.at/prosa.php>) جهت آنالیز نهایی سازه استفاده شد.

کیفیت کلی سازه با استفاده از Z-Score نشان داده می شود. در واقع، Z-Score در چنین مدلهایی شامل Z-Score همه زنجیره های پروتئینی است که در آزمایشگاه ساختارشان بررسی شده است. در این پلات، رنگ های مختلف جهت نشان دادن گروه های ساختاری از منابع مختلف (X-ray و NMR) استفاده شده است.

تأیید و آماده سازی سازه نهایی

پس از انجام بررسی های یاد شده و تأیید سازه از نظر ساختاری و فیزیکی شیمیایی، سازه نهایی از اسید آمینه به DNA ترجمه شد و کدون های آن با استفاده از برنامه Jcat (<http://www.jcat.de/>) جهت قرارگیری در باکتری *E.coli* بهینه سازی شد. سپس آنزیم های محدود کننده در دو انتهای 3' و 5' توالی

جهت استخراج ساختار سه بعدی پروتئین ها به سرور PDB (Protein Data Bank) به آدرس (<https://www.rcsb.org/>) مراجعه شد که به دلیل نبود ساختار سه بعدی پروتئین های یاد شده در این سرور، اقدام به مدل سازی ساختار سه بعدی آن ها از طریق سرور آنالیز ITASSER به آدرس (<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>) شد.

پیش بینی اپی توپ های سلول های B

جهت پیش بینی اپی توپ های سلول های B ساختار سه بعدی هر یک از پروتئین ها در فرمت PDB در سرور IEDB (<https://www.iedb.org/>) وارد شد. به منظور بالاترین میزان اطمینان، اپی توپ ها با چندین ابزار پیش بینی از قبیل Ellipro و Discotope موجود در این سرور بررسی شد و در نهایت اپی توپ هایی که مورد توافق چندین ابزار بود انتخاب شدند.

انتخاب اپی توپ های سلول های T

بدین منظور از سرور های NetMHCpan 4.1 به آدرس (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetMHCpan-4.1/>) و NETMHCIIpan3.2 به آدرس (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetMHCIIpan-3.2/>) استفاده شد.

انتخاب لینکر

جهت حفظ هرچه بیشتر ساختار سازه طراحی شده اپی توپ های انتخابی با استفاده از دو نوع لینکر سخت و انعطاف پذیر به هم متصل شدند.

پیش بینی ویژگی های فیزیکی- شیمیایی

ویژگی های فیزیکی - شیمیایی سازه طراحی شده با استفاده از سرورهای BcePred به آدرس (<https://bio.tools/bcepred>) و ExPasy-ProtScale و IEDB (<https://web.expasy.org/protscale/>) مورد ارزیابی قرار گرفت. فاکتورهای مورد توجه شامل هیدروپاتی، در دسترس بودن، انعطاف پذیری و در معرض قرارگیری توالی آمینه اسیدی بود. همچنین ویژگی های آب دوست یا آب گریز بودن با استفاده از الگوریتم Kyte & Doolittle بررسی شد. در دسترس بودن سطح و انعطاف پذیری

MIKLKFGVFFIVLLSSAYAHGTPQNITDLCAEDHN
TQIHTLNDKIFSYTESLAGKREMAITFKNGATFQ
VEVPGSQHIDSQKKAIERMKDTRLRIAYLTEAKVEK
LCVWNNKTPHAIAAISMANPAPAPALEIQQNGGIT
LAAYKKAADMEASLLLAAAYKKGNNNWAIAAAYKKA
EEALPDSAGSGSGSFLHTGPIEGSGSGSFYAAELN
EGSGSGSLLASFVPPKSGSGSLQQNGGITFGSGSGS
FAAVPSCFLGSGSGSFVYDAAAKSGSGSGSFVLHVS
MQKGSGSGSLAYVTSSGRKKSEREPANASDGKDTN
PTNKKQRTDFVQDEAATGRGKKRQSDLVQQPAPAP
AMIKLKFGVFFIVLLSSAYAHGTPQNITDLCAEDH
NTQIHTLNDKIFSYTESLAGKREMAITFKNGATF
QVEVPGSQHIDSQKKAIERMKDTRLRIAYLTEAKVE
KLCVWNNKTPHAIAAISMAN

شکل ۱: سازه مولتی اپی توپیک طراحی شده کاندید واکسن

خصوصیات فیزیکوشیمیایی: وزن مولکولی، تعداد اسیدهای آمینه و نقطه ایزوالکتریک این سازه به ترتیب ۵۱۱۸/۷۴، ۴۸۲ و ۸/۷۰ بود. اندکس آلفاتیک محاسبه شده و میانگین کل هیدروپاتیسیته (GRAVY) با استفاده از برنامه ProtParam به ترتیب ۷۵/۲۵ و ۰/۲۶۱- تعیین شد.

تعداد کل اسیدهای آمینه با شارژ منفی (Asp+Glu) برابر با ۴۴ و اسیدهای آمینه با شارژ مثبت (Arg + Lys) ۴۹ عدد بودند.

پیش بینی ساختار دو بُعدی و سه بُعدی: ساختار دو بُعدی پیش بینی شده با استفاده از سرور آنالین PSIPRED در شکل ۲ نشان داده شده است. همان طور که نتایج به دست آمده از سرور GOR IV در شکل ۳ نشان می دهد پروتئین طراحی شده از ۳۰٪ آلفا هلیکس (H)، ۱۹٪ رشته (Extended Strand) و ۵۰/۴٪ کوئل (C) تشکیل شده است. همچنین شکل ۴ ساختار سوم این سازه که به وسیله سرور آنالین ITASSER طراحی شده است را نشان می دهد. C.Score در واقع درجه اطمینان تخمین زده شده برای کیفیت مدل های پیش بینی شده با ITASSER است. محدوده نرمال C-Score بین ۲ تا -۵ است که در مدل طراحی شده حاضر ۲/۴۳- است که نشان دهنده درجه اطمینان قابل قبولی است.

امتیاز مدل طراحی شده توسط این سرور با T-Score نشان داده می شود که TM کمتر از ۰/۵ نمایانگر یک توپولوژی صحیح برای یک مدل است و امتیاز TM کمتر از ۰/۱۷ به این معناست که مدل طراحی شده تصادفی است. TM-Score در مدل حاضر ۰/۴ بود. علاوه بر این، RMSD (Root-Mean-Square Deviation) برای این مدل $A^0 1.1 \pm 1.3$ است.

قرار گرفت و جهت قرارگیری در پلاسمید بیانی مناسب آماده سازی شد.

نتایج

انتخاب اپی توپ ها: با استفاده از سرورهای NetMHCpan 4.1، IEDB و NETMHCIPAN3.2، اپی توپ های با قابلیت ایمنی زایی بالا برای هریک از پروتئین های IMP-1 و AMA-1 انتخاب شد که در جدول ۱ نشان داده شده اند. انتخاب اپی توپ ها بر طبق آنالیزهای متعدد ایمونو انفورماتیک بوده و همه اپی توپ های انتخابی در هر کدام از سرورها دارای بالاترین امتیاز بوده اند

پروتئین	نوع اپی توپ	توالی اپی توپ
AMA1	B Cell MHC Class 2 MHC Class 2 MHC Class 2 MHC Class 2 MHC Class 1 MHC Class 1	QRTDFVQDEAATGRGKKRQSDLVQQ LAYVTSSGR FVLHVSQK FVYDAAAKS FAAVPSCFL AEEALPDSA GENNWAIA
IMP-1	B Cell MHC Class 2 MHC Class 2 MHC Class 2 MHC Class 2 MHC Class 1 MHC Class 1	SEREPANASDGKTNPTN LQNGGITF LLASFVPPK FYAAELNEG FLLHTGPIE AADEMEASLLL LEIQQNGITL

جدول ۱: اپی توپ های انتخاب شده از پروتئین های AMA1 و IMP1

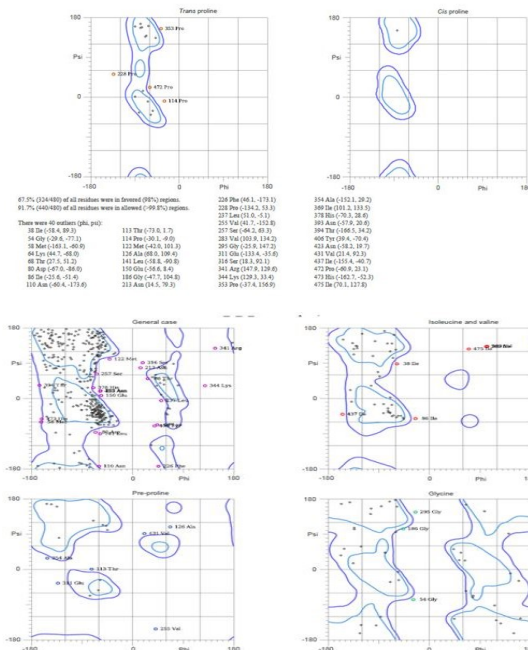
طراحی سازه و اتصال با لینک های مناسب: از هر دو نوع لینک های انعطاف پذیر (GSGSGS و KK) و لینک های سخت (PAPAPA و AAYKK) استفاده شد. به ترتیب اپی توپ های MHC CLASS 1 ژن IMP-1، MHC CLASS 1 ژن AMA1 با لینک AAYKK به هم متصل شد، سپس اپی توپ های مربوط به MHC CLASS 2 ژن IMP-1 و MHC CLASS 2 ژن AMA1 با استفاده از لینک GSGSGS و اپی توپ های مربوط به B CELL های ژن IMP-1 و سپس AMA1 با لینک KK به هم متصل شدند. سازه نهایی در شکل ۱ نشان داده شده است.

شکل ۳: ساختار دوم سازه موتنی اپی توپیک کاندید واکسن با استفاده از سرور GOR IV (آلفا هلیکس، صفحات بتا، کویل‌ها و رشته‌ها به ترتیب با رنگ‌های آبی، سبز، نارنجی و قرمز نشان داده شده‌اند).



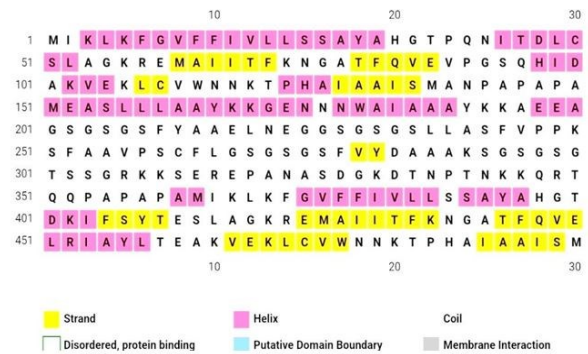
شکل ۴: ساختار سه بعدی طراحی شده به وسیله سرور ITASSER

اعتبار سنجی ساختار سه بعدی و پیش بینی آلرژن‌سیتی: آنالیز نتایج به دست آمده از رامچاندرا پلات نشان داد که ۹۱٪ از اسیدهای آمینه در منطقه مجازند (شکل ۵). همچنین کیفیت ساختار به وسیله سرور Prosa نیز تأیید شد. سازه طراحی شده با استفاده از سرور آنالیز AllerTOP v.2.0 به عنوان غیر آلرژن تعیین شد.



شکل ۵: نتایج حاصل از آنالیز سازه طراحی شده توسط رامچاندرا پلات

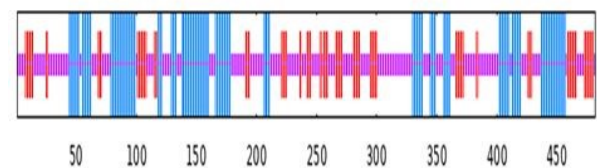
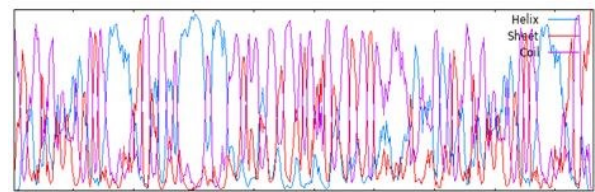
حلالیت و آنتی ژنیسیته پروتئین: نتایج به دست آمده از سرور SOLpro نشان دادند که این پروتئین با احتمال ۰/۸۷ حلالیت و با احتمال ۰/۹۱ دارای خاصیت آنتی ژنیسیته است.



شکل ۲: ساختار دو بعدی پیش بینی شده با استفاده از سرور آنالیز PSIPRED

GOR4 :

Alpha helix (Hh) :	147 is	30.50%
3 ₁₀ helix (Gg) :	0 is	0.00%
Pi helix (Ii) :	0 is	0.00%
Beta bridge (Bb) :	0 is	0.00%
Extended strand (Ee) :	92 is	19.09%
Beta turn (Tt) :	0 is	0.00%
Bend region (Ss) :	0 is	0.00%
Random coil (Cc) :	243 is	50.41%
Ambiguous states (?) :	0 is	0.00%
Other states :	0 is	0.00%



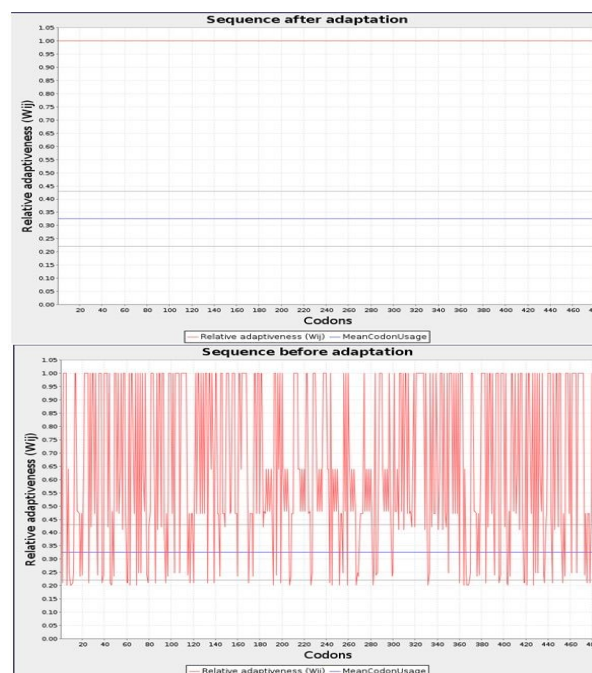
کاهش بهره وری، خسارات اقتصادی چشمگیری را در سطح جهانی در صنعت پرورش مرغ ایجاد می‌کند. امروزه واکسیناسیون طیور در سنین پایین برای مهار اثرات اقتصادی منفی کوکسیدیوز بسیار مهم است. با توجه به چرخه زندگی سریع این انگل، داشتن مراحل متعدد در میزبان و پیچیدگی آلودگی به این عفونت‌های آیمیریایی، به رویکرد های جدیدی در طراحی واکسن برای بهبود کارایی آن‌ها نیاز است (۱۶، ۱۷ و ۱۸). این پژوهش با هدف استفاده از روش‌های ایمونوفورماتیک برای تولید یک سازه چند اپی توپی کاندید واکسن که قادر به القای پاسخ ایمنی مؤثر علیه آیمیریا باشد، انجام گرفته است.

پیشرفت در رویکردهای ایمونوفورماتیک، پیش‌بینی و انتخاب ماشین‌های ایمونونژنیک خاص عامل بیماری، به جای گنجاندن کل سلول، از ایجاد پاسخ ایمنی نامطلوب که ممکن است منجر به افزایش آلرژی‌سیستی انگل نسبت به میزبان شود، جلوگیری می‌کند. همچنین تا میزان زیادی نسبت به سایر روش‌ها، باعث صرفه جویی در زمان جهت تولید واکسن کارآمد می‌شود (۱۹، ۲۰ و ۲۱). ابزارهای دخیل در پیش‌بینی اپی توپ بر اساس دقت آن‌ها انتخاب می‌شوند تا از طراحی واکسن های ایمنی‌زا با کارایی بالا مطمئن شوند. پیش‌بینی اپی توپ های سلول های B و T با استفاده از سرورهای IEDB و NetMHCpan انجام می‌شود. چندین پژوهش این ابزارها را برای پیش‌بینی اپی توپ ها و توسعه واکسن‌های چند اپی توپی اجرا کرده‌اند (۲۲، ۲۳ و ۲۴). با وجود اینکه دقت این ابزارها ۶۵ تا ۸۸ درصد و بالاتر از حد متوسط است، اما برای اطمینان از منحصر به فرد بودن و کارایی اپی توپ های شناسایی شده با ابزارهای نام برده، تجزیه و تحلیل بیشتر اپی توپ های پیش‌بینی شده مورد نیاز است. گنجاندن اپی توپ های مختلف در طراحی واکسن ممکن است بالقوه بیشترین محافظت را در برابر گونه‌های مختلف آیمیریا ایجاد کند. سونگ و همکاران ۲۰۱۵، بیان کردند که ادغام اپی توپ های سلول های T می‌تواند بر پیچیدگی آنتی‌ژنی انگل آیمیریا غلبه کند (۲۵). در این پژوهش پس از پیش‌بینی اپی توپ به وسیله ابزارهای مختلف، در نهایت اپی توپ هایی انتخاب شد که مورد توافق چندین ابزار بود. (۲۶). یک واکسن مؤثر باید سلول های B و T که قادر به القای پاسخ‌های ایمنی جهت از بین بردن هر گونه آنتی‌ژن بیماری‌زا در میزبان هستند را تحریک کند. برای دستیابی به این هدف، توالی های حفظ شده IMP-1 و AMA-1 انتخاب شدند و در مجموع ۱۴ اپی توپ از بین اپی توپ های پیشنهادی که دارای بالاترین امتیاز از نظر ایمنی زایی بودند، انتخاب شد. واکسن

ترجمه معکوس توالی سازه و بهینه سازی کدون: سازه طراحی شده با استفاده از سرور JCat از اسید آمینه به DNA و نوکلئوتید تبدیل گردید که در شکل ۶ نشان داده شده است. سپس توالی نوکلئوتیدی با ساختار باکتری *E. coli* با استفاده از سرور آنلاین مذکور تطبیق داده شد (شکل ۷). آنزیم های محدود کننده ExcoRI/XhoI به دو انتهای توالی اضافه شد تا DNA سنتز شده متعاقباً به درون پلاسמיד بیانی pet32a قرار گیرد.

```
>reverse translation of sample sequence to a 1446 base sequence of consensus codons.
atgathaarytnaarttgygngntnttytthgtnytnytnswngntayngcay
ggnaconcncaayathacngaytntgygngargaycayaaconcarathcayacn
ytnaaygayaarathtttwtatayacngarwentyngcngngnaarmgaratgcnath
athacttayaarayggngnathcaytngargtngcngngnancarathcayathgay
wncaraaraargonathgarmnatgaargaycnytnmgathgontaytncngar
gonaarngtngaraarytntgygntgtggaayaaaraconcnaycngnathgcnath
wsnatgcnaycngcnconcnconcnngntngaratthcarcargnaaygmnathacn
ytngcngontayaaaraargcngcngaygaratggargcnwentytnytnyngcngntay
aaraarggngaraayaaaytgggcnathgcnngcngontayaaaraargcngargcn
ytncngaywngcngngwngngwngngwnttytntncaaycngcngcnathgar
ggngwngngwngngwnttytntncaaycngcngarytnaaygargngngwngngwngng
wngntytngcngwnttytntnconcnaragngwngngwngngwntncaaraay
ggngnathactnttygngwngngwngngwnttygngcngcngcnconcnwnttytntn
ggngwngngwngngwnttytntncaaycngcngcngcngwngngwngngwngng
wnttytntncaaycngcngwngngwngngwngngwngngwngngwntncaaycng
acnswngngngngnaaraarvengarmngarconcnaycngwngngwngngnaargy
acnaaycnacnaayaaaraarcmngnagaytntncaargaycngcngcngcnagng
mgngnaaraarmngnarcngaytntncaarconcnconcnconcnatgath
aarytnaarttgygngnttytthgtnytnytnswngntayngcaygngnancn
conaraayathacngaytntgygngargaycayaaconcarathcaycnytnaay
gayaarathtttwtatayacngarwentyngcngngnaarmgaratgcnathacn
ttayaarayggngnathcaytngargtngcngngnancarathgaywncar
aaraargcngnathgarmnatgaargaycnytnmgathgontaytncngargcngar
gtngaraarytntgygntgtggaayaaaraconcnaycngnathgcnathwsnatg
cnaay
```

شکل ۶: ترجمه معکوس توالی پروتئینی سازه طراحی شده به نوکلئوتید



شکل ۷: نتایج ایتیمایز کدون ها با استفاده از سرور JCat. CAI-value قبل از ایتیمایز ۰/۵۷ بود که بعد از کدون ایتیمایز به ۱ رسیده است.

بحث

کوکسیدیوز یک بیماری فراگیر است که توسط گونه‌های آیمیریا در دام‌ها ایجاد می‌شود. این بیماری به دلیل مرگ‌ومیر زیاد جوجه‌ها و

مذکور در گونه های *ایمریانکاتریکس* و *ایمریا تنلا* طیور طراحی کردیم. سازه طراحی شده تمام پارامترهای حیاتی جهت کاندید شدن به عنوان یک واکسن را داشت. همچنین، ترکیب سلول های T ممکن است به طور مؤثر محافظت ایدئالی در برابر گونه های بیماری زای *ایمریا* ایجاد کند، اگر چه این هنوز به بررسی های تجربی نیاز دارد. علاوه بر این، استفاده از واکسن های اپی توپیک هر گونه اثرات منفی احتمالی استفاده از کل ژنوم انگل را به حداقل می رساند و خطر عفونت مجدد را کاهش می دهد. می توان نتیجه گرفت که رویکرد های ایمونو انفورماتیک در پیش بینی سازه های کاندید واکسن طراحی شده نتایج امیدوار کننده ای به همراه دارد. مطالعات بیشتر و اعتبار سنجی تجربی بر روی نتایج به دست آمده در مطالعه حاضر به منظور تأیید ایمنی و اثر بخشی سازه توصیه می شود.

تقدیر و تشکر

از معاونت محترم پژوهشی و تولید که تصویب و پشتیبانی مالی این پروژه را عهده دار بوده اند تشکر می شود.

تضاد منافع

نویسندگان تصریح می کنند که هیچگونه تضاد منافی در مطالعه حاضر وجود ندارد.

منابع

1. G. R. Razmi and G. A. Kalideri, "Prevalence of subclinical coccidiosis in broiler-chicken farms in the municipality of Mashhad, Khorasan, Iran," *Preventive Veterinary Medicine*, vol. 44, no. 3-4, pp. 247-253, 2000.
2. A. Nematollahi, G. Moghaddam, and R. Farshbaf-Pourabad, "Prevalence of *Eimeria* species among broiler chicks in Tabriz, Northwest of Iran," *Munis Entomology Zoology*, vol. 4, no. 1, pp. 53-58, 2009.
3. M. M. Hadipour, A. Olyaie, M. Naderi, F. Azad, and O. Nekouie, "Prevalence of *Eimeria* species in scavenging native chickens of Shiraz, Iran," *African Journal of Microbiology Research*, vol. 5, no. 20, pp. 3296-3299, 2011.
4. G. Gari, G. Tilahun, and P. Dorchie, "Study on poultry coccidiosis in Tiyo District, Arsi Zone,

ساخته شده ایمونوژن با امتیاز ۹۱٪ دارای خاصیت آنتی ژنتیک بوده و غیر آلرژی زا است که آن را کاندید خوبی برای ساخت واکسن می کند. سازه کاندید واکسن متشکل از ۴۸۲ اسید آمینه با وزن مولکولی ۵۱/۱۱ کیلو دالتون با شاخص ناپایداری ۳۶ است که با معیارهای استاندارد مطابقت دارد طبق این معیارها، پروتئین های واکسن که وزن مولکولی ۱۱۰< کیلو دالتون و شاخص ناپایداری ۴۰< دارند کاندیدهای نسبتاً پایدار و خوبی برای واکسن هستند (۱۹). واکسن طراحی شده با استفاده از نمودار Ramachandran با نمره ۹۱٪ تأیید ساختاری شد. این نمره نشان داد که ساختار واکسن از کیفیت خوبی برخوردار است؛ زیرا مدل در مجاورت ساختارهای حل شده با اشعه ایکس در PDB قرار داده شده است. همچنین جهت بهبود سطح بیان واکسن تولید شده در سیستم بیان پروتئینی، توالی پروتئینی به نوکلئوتید تبدیل و کدون اپتیمایز انجام شد. مقدار CAI مطلوب سازی کدون به معنای سازگاری کدون است که هرچه مقدار آن به ۱ نزدیک تر باشد نشان می دهد پروتئین نو ترکیب می تواند با موفقیت بیان شود که در سازه طراحی شده در این مطالعه همان گونه که در شکل ۷ نشان داده شده است برابر با ۱ است. تاکنون محققان زیادی از روش های ایمونو انفورماتیک جهت معرفی پپتیدهای ایمونوژن علیه برخی از انگل ها بهره برده اند، از جمله آن ها می توان به TSOL18 در *تنیاسولوم* (۲۷)، پروتئین غشای اپیکال (AMA1) در *پلاسمودیوم میو/کس* (۲۸)، کاتپسین D در *شیستوزوما مانسونی* (۲۹)، پروتئین EG95 انکوسفر در *اکینوкокوسگرانولوزوس* (۳۰) و *اکینوкокوسمولتیوکولاریس* (۳۱) و اپی توپ های سلول های B و T پروتئین های GRA2، GRA7، SAG1 و ROP16 در *توکسوپلاسما گوندی* (۳۲) اشاره کرد. مطالعات قبلی نشان می دهد که مدل سازی ایمنی می تواند با پاسخ ایمنی واقعی نشان داده شده به وسیله میزبان در برابر پاتوژن ها سازگار باشد. نتیجه به دست آمده از مدل سازی سازه کاندید واکسن در این پژوهش، می تواند گام مفیدی در جهت توسعه واکسن طراحی شده علیه *ایمریا* از طریق القای پاسخ ایمنی محافظتی ارائه دهد. با این حال، یافته های حاصل از این مطالعه هنوز به آزمون های آزمایشگاهی بیشتری برای اعتبار سنجی نیاز دارد.

نتیجه گیری

از آنجایی که مطالعات قبلی نشان داد که AMA-1 و IMP-1 پروتئین های ایمونوژنیک مناسبی به عنوان کاندید واکسن هستند (۱۲-۱۰)، در این مطالعه، یک واکسن چند اپی توپی ایمونوژن برای پروتئین های

immunoinformatics approach. *Infect. Genet. Evol.* 2017;56:75–91.

15. Pandey RK, Bhatt TK, Prajapati VK. Novel immunoinformatics approaches to design multi-epitope subunit vaccine for malaria by investigating anopheles salivary protein. *Sci. Rep.* 2018;8:1–11.

16. Soutter, F., Werling, D., Tomley, F. M. & Blake, D. P. Poultry coccidiosis: Design and interpretation of vaccine studies. *Front. Vet. Sci.* 7, 1–12 (2020).

17. Jenkins, M. C. Progress on developing a recombinant coccidiosis vaccine. *Int. J. Parasitol.* 28, 1111–1119 (1998).

18. Turk, D. E. The anatomy of the avian digestive tract as related to feed utilization. *Poult. Sci.* 61, 1225–1244 (1982).

19. Dar, H. A. et al. Immunoinformatics-aided design and evaluation of a potential multi-epitope vaccine against *Klebsiella pneumoniae*. *Vaccines* 7, 1–17 (2019).

20. Pandey, R. K., Bhatt, T. K. & Prajapati, V. K. Novel immunoinformatics approaches to design multi-epitope subunit vaccine for malaria by investigating anopheles salivary protein. *Sci. Rep.* 8, 1–11 (2018).

21. Jacob, C. O., Leitner, M., Zamir, A., Salomon, D. & Arnon, R. Priming immunization against cholera toxin and *E. coli* heat-labile toxin by a cholera toxin short peptide-beta-galactosidase hybrid synthesized in *E. coli*. *EMBO J.* 4, 3339–3343 (1985).

22. Pastor-Fernández, I. et al. Vaccination with transgenic *Eimeria tenella* expressing *Eimeria maxima* AMA1 and IMP1 confers partial protection against high-level *E. maxima* challenge in a broiler model of coccidiosis. *Parasites Vectors* 13 (2020).

23. Valdivia-Olarte, H. et al. Design of a predicted MHC restricted short peptide immunodiagnostic and vaccine candidate for Fowl adenovirus C in chicken infection. *Bioinformation* 11, 460–465 (2015).

24. Samad, A. et al. Designing a multi-epitope vaccine against SARS-CoV-2: An immunoinformatics approach. *J. Biomol. Struct. Dyn.* <https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1792347> (2020).

25. Song, X., Xu, L., Yan, R., Huang, X. & Li, X. Construction of *Eimeria tenella* multi-epitope DNA

Ethiopia,” *International Journal of Poultry Science*, vol. 7, no. 3, pp. 251–256, 2008.

5. A. Györke, L. Pop, and V. Cozma, “Prevalence and distribution of *Eimeria* species in broiler chicken farms of different capacities,” *Parasite*, vol. 20, no. 1, article 52, 2013.

6. M. Q. Al-Natour, M. M. Suleiman, and M. N. Abo-Shehadeh, “Flock-level prevalence of *Eimeria* species among broiler chicks in northern Jordan,” *Preventive Veterinary Medicine*, vol. 53, no. 4, pp. 305–310, 2002.

7. Allen, PC and Fetterer, RH (2002). Recent advances in biology and immunobiology of *Eimeria* species and in diagnosis and control of infection with these coccidian parasites of poultry. *Clin. Microbiol. Rev.*, 15: 58–65.

8. Williams, RB (2002). Anticoccidial vaccines for broiler chickens: pathways to success. *Avian Pathol.*, 31: 317–353.

9. Alarcon JB, Waine GW, McManus DP (1999) DNA vaccines: technology and application as anti-parasite and anti-microbial agents. *Adv Parasitol* 42:343–410.

10. Kundu K, Garg R, Kumar S, Mandal M, Tomley FM, Blake DP, Banerjee PS (2017) Humoral and cytokine response elicited during immunisation with recombinant immune mapped protein-1 (EtIMP-1) and oocysts of *Eimeria tenella*. *Vet Parasitol* 244:44–53.

11. Ma C, Li G, Chen W, Jia Z, Yang X, Pan X, Ma D. *Eimeria tenella*: IMP1 protein delivered by *Lactococcus lactis* induces immune responses against homologous challenge in chickens. *Vet Parasitol.* 2021 Jan;289:109320. doi: 10.1016/j.vetpar.2020.109320. Epub 2020 Nov 16. PMID: 33248421.

12. Bargieri DY, Andenmatten N, Lagal V, Thiberge S, Whitelaw JA, Tardieux I, et al. Apical membrane antigen 1 mediates apicomplexan parasite attachment but is dispensable for host cell invasion. *Nat Commun.* 2013;4:255.

13. Tyler JS, Treeck M, Boothroyd JC. Focus on the ringleader: the role of AMA1 in apicomplexan invasion and replication. *Trends Parasitol.* 2011;27:410–20.

14. Adhikari UK, Rahman MM. Overlapping CD8 + and CD4 + T-cell epitopes identification for the progression of epitope-based peptide vaccine from nucleocapsid and glycoprotein of emerging Rift Valley fever virus using

vaccines and their protective efficacies against experimental infection. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 166, 79–87 (2015).

26. Ojha, R. et al. High throughput and comprehensive approach to develop multiepitope vaccine against minacious COVID-19. *Eur.J. Pharm. Sci.* 151, 105375 (2020).

27. Zimic M, Gutiérrez AH, Gilman RH, López C, Quiliano M, Evangelista W, et al. Immunoinformatics prediction of linear epitopes from *Taenia solium* TSOL18. *Bioinformation.* 2011; 6(7):271-4. doi:10.6026/97320630006271.

28. Bueno LL, Lobo FP, Morais CG, Mourão LC, de Ávila RAM, Soares IS, et al. Identification of a highly antigenic linear B cell epitope within *Plasmodium vivax* apical membrane antigen 1 (AMA-1). *PLoS One.* 2011;6(6):e21289. doi: 10.1371/journal.pone.0021289.

29. Fuaad AAH, Roubille R, Pearson MS, Pickering DA, Loukas AC, Skwarczynski M, et al. The use of a conformational cathepsin D-derived epitope for vaccine development against *Schistosoma mansoni*. *Bioorg Med Chem.* 2015 Mar 15;23(6):1307- 12. doi: 10.1016/j.bmc.2015.01.033.

30. Woollard DJ, Gauci CG, Heath DD, Lightowers MW. Protection against hydatid disease induced with the EG95 vaccine is associated with conformational epitopes. *Vaccine.* 2000; 19(4):498-507.

31. Gomase VS, Chitlange NR. Prediction of MHC class antigen peptides from *Echinococcus multilocularis*: Application of computer intelligence. *Scientific Reports.* 2012; 1(3):191. doi.org/10.4172/scientificreports.191.

32. Cao A, Liua Y, Wangb J, Lic X, Wanga S, Zhaoa Q, et al. *Toxoplasma gondii*: Vaccination with a DNA vaccine encoding T- and B-cell epitopes of SAG1, GRA2, GRA7 and ROP16 elicits protection against acute toxoplasmosis in mice. *Vaccine.* 2015; 27; 33(48):6757-62. doi: 10.1016/j.vaccine.2015.10.077.