



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

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

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

Accept: 2024.21.01

Final Edit: 2024.29.01

Online Publish: 08.02.2024

Corresponding Information:

Zahra Asadollahi, 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.



طراحی سازه کاندید واکسن برای گونه‌های بیماری‌زای *ایمریا طیور* با استفاده از روش‌های ایمونوآنفورماتیک

زهرا اسدالهی^۱ (id)، مهدی عرب حسنی آبادی^۲ (id)، مجید محمد صادق^۳ (id)

۱. استادیار گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران
۲. دانشگاه آزاد واحد گرمسار، گرمسار، ایران
۳. گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد واحد گرمسار، گرمسار، ایران

چکیده

زمینه و هدف: کوکسیدیوز طیور را گونه‌های مختلف *ایمریا* ایجاد می‌کنند، این انگل تک یاخته‌ای متعلق به شاخه‌ای کمپلکس است. این بیماری یکی از بیماری‌های رایج در طیور است که در سراسر جهان ضررهای اقتصادی عمده‌ای به بار می‌آورد. با توجه به ایجاد ضرر و زیان اقتصادی در صنعت طیور و پیشگیری از بروز مقاومت شیمیایی، تحقیقات به سمت رویکردهای جایگزین مانند روش‌های 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 می‌شود. علاوه بر این، طبق مطالعات، استفاده از بیش از یک پروتئین می‌تواند القای ایمنی و تولید آنتی بادی را بهتر افزایش دهد. انتخاب اپی‌توپ‌های ایمونوژنیک از پروتئین‌های منتخب و چسباندن آن‌ها با یک پیوند دهنده مناسب، یکی از رویکردهای جدید در طراحی واکسن است.

مواد و روش‌ها: با توجه به اینکه هر دو پروتئین IMP-1 و AMA-1 *ایمریا* قبلاً به عنوان آنتی‌ژن‌های ایمنی‌زای قوی شناخته شده‌اند، در این مطالعه اپی‌توپ‌های ایمونوژنیک این پروتئین‌ها با روش‌های ایمونو آنفورماتیک پیش بینی شده‌اند. در بین اپی‌توپ‌های پیشنهاد شده، اپی‌توپ‌هایی که با ابزارهای بیوانفورماتیک متعدد تأیید شدند، استفاده شد.

یافته‌ها: با اتصال اپی‌توپ‌های انتخابی و اتصال آن‌ها با لینکرهای مناسب، ساختار پلی توپیکی طراحی شد.

نتیجه گیری: با استفاده از ابزارهای ایمونو آنفورماتیک، اپی‌توپ‌های دو ژن AMA-1 و IMP-1 از سویه‌های انگل *ایمریا* ترکیب شده و به عنوان کاندیدای واکسن قوی پیش‌بینی شد.

کلیدواژه‌ها: AMA-1، IMP-1، *ایمریا*، طیور، طراحی واکسن، ایران

دریافت: ۱۴۰۲/۰۷/۱۵ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۱/۰۱ ویرایش نهایی: ۱۴۰۲/۱۱/۰۹ انتشار آنلاین: ۱۴۰۲/۱۱/۱۳

اطلاعات نویسنده مسئول: زهرا اسدالهی، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشک، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران.

Email: asadolahi.za@lu.ac.ir

حق چاپ © ۲۰۲۳، این 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 غیر تجاری با استناد مناسب می‌دهد.

مقدمه

می‌تواند علیه آلودگی به دیگر گونه‌های *آیمریا* مانند *آیمریا تنلا*، *آیمریا می‌تیس*، *آیمریا آسرولینا* و *آیمریا نکاتریکس* و دیگر انگل‌های شاخه‌ای کمپلکسا مانند *توکسوپلازما ایمنی* ایجاد کند. مطالعات مختلف نشان داده‌اند که واکسیناسیون با فرمولاسیون‌های بیان‌شده 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 به عنوان پروتئین ایمونوژن کاندید واکسن در بسیاری از انگل‌های اپی‌کمپلکس شناخته شده است. از میکروارگانیسم‌ها آزاد می‌شود و در بیشتر انگل‌های اپی‌کمپلکس 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)، *کلسیلا پنومونیه*، *توکسوپلازما گوندی* و *آدنووایروس* 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 اپی‌توپیک بالقوه و مقرون به صرفه علیه گونه‌های *آیمریا* با استفاده از شناسایی اپی‌توپ‌های سلول T و سلول B بررسی کرده است. در این بررسی از تکنیک‌های ایمونوفورماتیک جهت شناسایی اپی‌توپ‌های ایمونوژن و ارزیابی اثر بخشی این اپی‌توپ‌ها 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 *آیمریا تنلا* و CBL80637.1 برای *آیمریاماکسیما* به ترتیب به طول‌های ۳۸۷ و ۳۷۶ اسیدآمینه و توالی پروتئینی AMA-1 با شماره دسترسی XP-013234756.1 برای *آیمریا تنلا* 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.

کوکسیدیوز به وسیله گونه‌های مختلف *آیمریا*، یک انگل تک‌یاخته‌ای متعلق به شاخه‌ای کمپلکسا، 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. کوکسیدیوز پس از بلع اووسیست‌های اسپوردار در میزبان‌های حساس رخ می‌دهد. پرندگان آلوده و نیز پرندگان بهبود یافته، اووسیست‌ها را از طریق مدفوع دفع می‌کنند که باعث آلودگی خوراک، گردوغبار، آب، بستر و خاک می‌شود. اووسیست‌ها ممکن است به وسیله حامل‌های مکانیکی مانند تجهیزات، لباس، حشرات، کارگران مزرعه و سایر حیوانات نیز منتقل شوند (۳). کوکسیدیوز سلول‌های اپیتلیال روده طیور را درگیر می‌کند (۳). *آیمریا تنلا* و *آیمریانکاتریکس* بیماری‌زا ترین گونه‌های *آیمریا* 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 کوکسیدیوز آنتی بیوتیک‌های یونوفور بوده‌اند. با این حال، استفاده طولانی مدت از کوکسیدیواستات‌ها به ناچار منجر به تغییر شکل غیر منتظره *آیمریا* شده که باعث افزایش مقاومت به تمام داروهای یونوفور ضد کوکسیدیوز می‌شود (۷). گسترش مقاومت دارویی در کوکسیدیوز 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 کوکسیدیوز باعث توجه به واکسیناسیون طیور در برابر کوکسیدیوز 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 کوکسیدیوز 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

مدل سازی ساختار سه بعدی پروتئین‌ها

ویژگی‌های آب دوست یا آب‌گریز بودن با استفاده از الگوریتم Kyte & Doolittle بررسی شد. در دسترس بودن سطح و انعطاف‌پذیری به ترتیب با استفاده از الگوریتم های Emini و Karplus & Schulz بررسی شد. اپی‌توپ‌های پیش بینی شده با استفاده از نرم افزار Chimera به دقت بررسی شده و در نهایت اپی‌توپ‌هایی که در دسترس 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 بعدی سازه طراحی شد. سپس به منظور بررسی و اصلاح ایرادهای احتمالی ساختار سه بعدی مدل شده از آنالیز رامانچاندرا پلات استفاده شد.

آنالیز سازه طراحی شده

آلرنیسی سازه با استفاده از سرور AllerTOP V. 2.0 به آدرس (<https://www.ddg-pharmfac.net/AllerTOP/>) بررسی شد. همچنین میزان حلالیت و آنتی‌ژنیسی 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 می‌شود. در واقع، Z-Score در چنین مدل‌هایی شامل Z-Score همه زنجیره‌های پروتئینی است که در آزمایشگاه ساختارشان بررسی شده است. در این پلات، رنگ‌های مختلف جهت نشان دادن گروه‌های ساختاری از منابع مختلف (X-ray و NMR) استفاده شده است.

تأیید و آماده سازی سازه نهایی

پس از انجام بررسی‌های یاد شده و تأیید سازه از نظر ساختاری و فیزیکی شیمیایی، سازه نهایی از اسیدآمینه به DNA ترجمه شد و کدون‌های آن با استفاده از برنامه Jcat (<http://www.jcat.de/>) جهت قرارگیری در باکتری *E.coli* بهینه

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

پیش بینی اپی‌توپ‌های سلول‌های B

جهت پیش‌بینی اپی‌توپ‌های سلول‌های B ساختار سه بعدی هر یک از پروتئین‌ها در فرمت PDB در سرور IEDB به آدرس (<https://www.iedb.org/>) وارد شد. به منظور بالاترین میزان اطمینان، اپی‌توپ‌ها با چندین ابزار پیش بینی از قبیل Ellipro و Discotope موجود در این سرور بررسی شد و در نهایت اپی‌توپ‌هایی که مورد توافق چندین ابزار بود انتخاب شدند.

انتخاب اپی‌توپ‌های سلول‌های T

بدین منظور از سرورهای NetMHCpan 4.1 به آدرس (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetMHCpan-4.1/>) و NETMHCIPAN3.2 به آدرس (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetMHCIPAN3.2/>) استفاده شد.

انتخاب لینکر

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

پیش بینی ویژگی‌های فیزیکی - شیمیایی

ویژگی‌های فیزیکی - شیمیایی سازه طراحی شده با استفاده از سرورهای BcePred به آدرس (<https://bio.tools/bcepred>) 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

MIKLFKFGVFFIVLLSSAYAHGTPQNIITDLCAEDHN
 TQIHITLNDKIFSYTESLAGKREMAIITFKNGATFQ
 VEVPGSQHIDSQKKAIERMKDTRLRIAYLTEAKVEK
 LCVWNNKTPHAIAAISMANPAPAPALEIQQNGGIT
LAAAYKKAADEMEASLLLAAAYKKGENNNWAIAAAYKKA
EEALPDSAGSGSGSFLLLHTGPIEGSGSGSFYAAELN
EGSGSGSLLASFPVPPKSGSGSGLQQNGGITFGSGSGS
FAAVPSCFLGSGSGSFVYDAAAKSGSGSGSFVLHVS
MQKSGSGSLAYVTSSGRKKSEREPANASDGKDTN
PTNKKQRTDFVQDEAATGRGKKRQSDLVQQPAPAP
AMIKLFKFGVFFIVLLSSAYAHGTPQNIITDLCAEDH
NTQIHITLNDKIFSYTESLAGKREMAIITFKNGATF
QVEVPGSQHIDSQKKAIERMKDTRLRIAYLTEAKVE
KLCVWNNKTPHAIAAISMAN

شکل ۱: سازه مولتی اپی توپیک طراحی شده کاندید واکسن

خصوصیات فیزیکی و شیمیایی: وزن مولکولی، تعداد اسیدهای آمینه و نقطه ایزوالکتریک این سازه به ترتیب ۵۱۱۱۸/۷۴، ۴۸۲ و ۸/۷۰ بود. اندکس آلیفاتیک 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 بعدی و سه بعدی: ساختار دو بعدی پیش بینی شده با استفاده از سرور آنلاین 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 آنلاین ITASSER طراحی شده است را نشان می دهد. C.Score که 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 $1.1 \pm 1.3/4 \text{ \AA}$ است.

سازگی شد. سپس آنزیم های محدود کننده در دو انتهای 3' و 5' توالی قرار گرفت و جهت قرارگیری در پلاسمید بیانی مناسب آماده سازی شد.

نتایج

انتخاب اپی توپ ها: با استفاده از سرورهای NetMHCpan 4.1، NETMHCIIIPAN3.2 و JEDB، 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 ایمونوفورماتیک بوده و همه اپی توپ های انتخابی در هر کدام از سرورها دارای بالاترین امتیاز بوده اند

| توالی اپی توپ | نوع اپی توپ | پروتئین |
|--|--|---------|
| QRTDFVQDEAATGRGKKRQSDLVQQ LAYVTSSGR FVLHVS FVYDAAAKS FAAVPSCFL AEEALPDSA GENNNWAIA | B Cell MHC Class 2 MHC Class 2 MHC Class 2 MHC Class 2 MHC Class 1 MHC Class 1 | AMA1 |
| SEREPANASDGKTNPTN LQQNGGIT LLASFPVPPK FYAAELNEG FLLHTGPIE AADEMEASLLL LEIQQNGGITL | B Cell MHC Class 2 MHC Class 2 MHC Class 2 MHC Class 2 MHC Class 1 MHC Class 1 | IMP-1 |

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

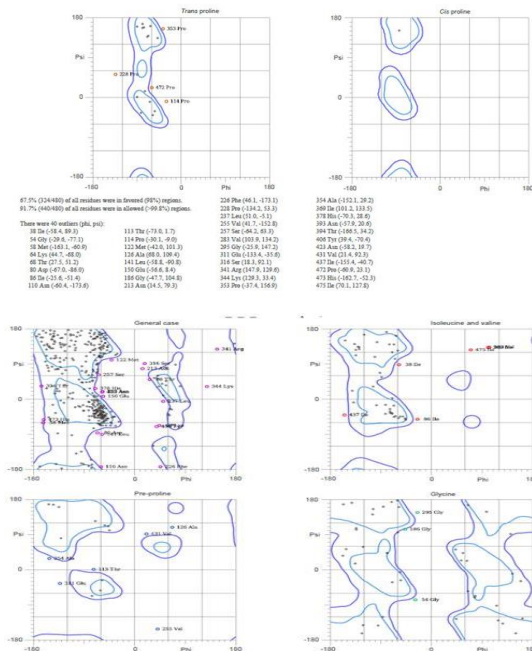
طراحی سازه و اتصال با لینکرهای مناسب: از هر دو نوع لینکرهای انعطاف پذیر (GSGSGS و KK) و لینکرهای سخت (PAPAPA و AAYKK) استفاده شد. به ترتیب اپی توپ های AMA1 MHC CLASS 1، IMP-1 MHC CLASS 1، با لینکر AAYKK به هم متصل شد، سپس اپی توپ های مربوط به AMA1 MHC CLASS 2 و IMP-1 MHC CLASS 2 با لینکر GSGSGS و اپی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

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



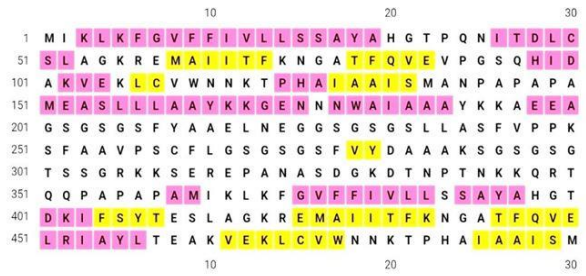
شکل ۴: ساختار سه بعدی طراحی شده به وسیله سرور ITASSER

اعتبار سنجی ساختار سه بعدی و پیش بینی آلرژن‌سنجی: آنالیز نتایج به دست آمده از رامچاندوران 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 رامچاندوران پلات

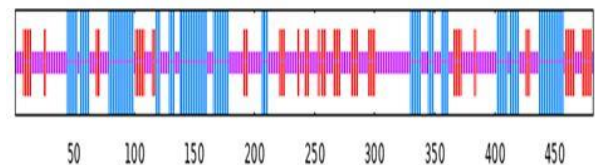
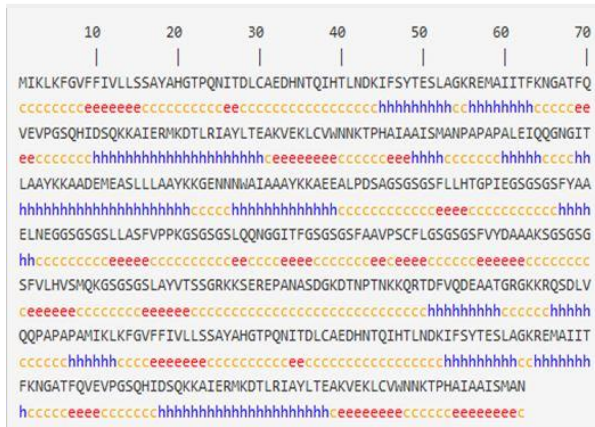
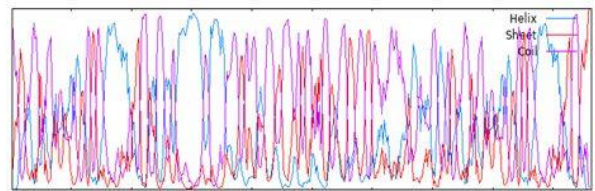
حلالیت و آنتی ژنیسیته پروتئین: نتایج به دست آمده از سرور SOLpro نشان دادند که این پروتئین با احتمال ۰/۸۷ حلالیت و با احتمال ۰/۹۱ دارای خاصیت آنتی ژنیسیته است.



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% |



نتیجه گیری

از آنجایی که مطالعات قبلی نشان داد که AMA-1 و IMP-1 پروتئین‌های ایمونوژنیک مناسبی به عنوان کاندید واکسن هستند (۱۰-۱۲)، در این مطالعه، یک واکسن چند اپی‌توپی ایمونوژن برای پروتئین‌های مذکور در گونه‌های آیمیریانکتاتریکس و آیمیریا تنلا طيور طراحی کردیم. سازه طراحی شده تمام پارامترهای حیاتی جهت کاندید شدن به عنوان یک واکسن را داشت. همچنین، ترکیب سلول‌های T ممکن است به طور مؤثر محافظت ایدئالی در برابر گونه‌های بیماری‌زای آیمیریا ایجاد کند، اگر چه این هنوز به بررسی‌های تجربی نیاز دارد. علاوه بر این، استفاده از واکسن‌های اپی‌توپیک هر گونه اثرات منفی احتمالی استفاده از کل ژنوم انگل را به حداقل می‌رساند و خطر عفونت مجدد را کاهش می‌دهد. می‌توان نتیجه گرفت که رویکردهای ایمونو انفورماتیک در پیش‌بینی سازه‌های کاندید واکسن طراحی شده نتایج امیدوار کننده‌ای 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 می‌شود.

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 Entamology 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, Ethiopia," International Journal of Poultry Science, vol. 7, no. 3, pp. 251-256, 2008.

نظر ایمنی‌زایی بودند، انتخاب شد. واکسن ساخته شده ایمونوژن با امتیاز ۹۱٪ دارای خاصیت آنتی ژنتیک بوده و غیر آلرژی‌زا است که آن را کاندید خوبی برای ساخت واکسن می‌کند. 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، پروتئین‌های واکسن که وزن مولکولی <110 کیلو دالتون و شاخص ناپایداری <40 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 اپتیماز انجام شد. مقدار CAI مطلوب سازی کدون به معنای سازگاری کدون است که هرچه مقدار آن به ۱ نزدیک تر باشد نشان می‌دهد پروتئین نوترکیب می‌تواند 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 روش‌های ایمونو انفورماتیک جهت معرفی پپتیدهای ایمونوژن علیه برخی از انگل‌ها بهره برده‌اند، از جمله آن‌ها می‌توان به TSOL18 در تنیاسولیوم (۲۷)، پروتئین غشای اپیکال (AMA1) در پلاسمودیومویواکس (۲۸)، کاتپسین D در شیسیتوزوما مانسونی (۲۹)، پروتئین EG95 انکوسفر در اکینو کوسگرانو لوزوس (۳۰) و اکینو کوسموتیلوکولاریس (۳۱) و اپی‌توپ‌های سلول‌های B و T پروتئین‌های GRA7، GRA2، SAG1 و ROP16 در توکسوپلاسما گوندی (۳۲) اشاره کرد. مطالعات قبلی نشان می‌دهد که مدل سازی ایمنی می‌تواند با پاسخ ایمنی واقعی نشان داده شده به وسیله میزبان در برابر پاتوژن‌ها سازگار باشد. نتیجه به دست آمده از مدل سازی سازه کاندید واکسن در این پژوهش، می‌تواند گام مفیدی در جهت توسعه واکسن طراحی شده علیه آیمیریا از طریق القای پاسخ ایمنی محافظتی ارائه دهد. پیشنهاد می‌شود در مطالعات بعدی سازه کلون و بیان شده و مورد آزمون آزمایشگاهی و متعاقباً بررسی بالینی قرار گیرد. با این حال، یافته‌های حال از این مطالعه هنوز به آزمون‌های آزمایشگاهی بیشتری برای اعتبار سنجی نیاز دارد.

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. *Bioinformatics* 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 vaccines and their protective efficacies against
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-Shehada, “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, Waite 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 immunoinformatics approach. *Infect. Genet. Evol.* 2017;56:75–91.

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. *Bioinformatics.* 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, Wangs 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.