

مقاله پژوهشی

ساخت سازه ژنی pCDNA3.1-AopB به عنوان مدل واکسن DNA علیه
Aeromonas hydrophila در کپورماهیان

مرضیه واثقی^۱، مجتبی علیشاهی^{۲*}، محمدرضا تابنده^۴، مسعود قربانپور^۵، محمد خسروی^۶
تاریخ دریافت: آذر ۱۴۰۰ تاریخ پذیرش: بهمن ۱۴۰۰

چکیده

باکتری *Aeromonas hydrophila* یکی از مهم‌ترین باکتری‌های بیماری‌زای ماهی است که سبب سپتی‌سمی هموراژیک، آب آوردگی محوطه شکمی و مرگ و میر در سنبلین متفاوت و در گونه‌های مختلف ماهی به ویژه کپورماهیان می‌شود. ایمن‌سازی یکی از روش‌های مناسب برای پیشگیری از این بیماری است. استفاده از سازه‌های ژنی حاوی آنتی‌ژن‌های اختصاصی باکتری‌ها در سال‌های اخیر به منظور توسعه واکسن‌هایی با کارایی بالا و استفاده در روش‌های آسان‌تر مانند تجویز خوراکی در آبی‌پروری توسعه یافته است. در مطالعه حاضر، پروتئین aopB سیستم ترشحی تیپ III باکتری *A. hydrophila* جدا شده از کپورماهیان استان خوزستان به منظور طراحی یک سازه ژنی مدل واکسن DNA در پلاسمید یوکاریوتی بیانی pCDNA3.1 همسانه‌سازی شد. در این پژوهش از جدایه باکتری *A. hydrophila* که از ماهیان کپور مبتلا به سپتی‌سمی آئروموناسی در مزارع پرورشی استان خوزستان جداسازی و با روش مولکولی و فنوتیپی تایید شده بودند، استفاده شد. توالی ژن aopB از بانک ژن NCBI استخراج و ناحیه کد کننده ژن با استفاده از آغازگرهای حاوی نواحی برش آنزیم‌های EcoRI و NheI تکثیر شد. سپس محصول PCR در پلاسمید بیانی یوکاریوتی pCDNA3.1-HisA الحاق و با استفاده از شوک حرارتی به باکتری TOP10-F['] انتقال داده شد. پس از غربالگری کلون‌های مثبت با استفاده از کلونی PCR و تعیین توالی، سازه ژنی pCDNA3.1-AopB با استفاده از روش الکتروپوراسیون به سلول‌های CHO منتقل و بیان پروتئین نوترکیب با استفاده از روش وسترن بلات در لیز سلولی ارزیابی شد. نتایج PCR و تعیین توالی سازه ژنی نشان دهنده همسانه‌سازی ژن aopB به طول تقریبی ۱۰۰۰ جفت باز در پلاسمید pCDNA3.1-HisA بود. آزمون وسترن بلات با استفاده از آنتی‌بادی ضد HisTag وجود یک پروتئین با وزن مولکولی حدود ۳۶ کیلودالتون را نشان داد. در مجموع، سازه ژنی pCDNA3.1-AopB حاوی ژن aopB طراحی و مورد تایید قرار گرفت. از این سازه ژنی می‌توان در مطالعات بالینی به منظور بررسی ایمنی‌زایی در کپورماهیان در بیماری‌زایی تجربی با *A. hydrophila* استفاده کرد.

واژگان کلیدی: *Aeromonas hydrophila*، aopB سازه ژنی، واکسن DNA

- ۱- دکتری بهداشت آبریان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.
- ۲- استاد گروه بهداشت دام، طیور و آبریان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.
- ۳- استاد قطب بهداشت و بیماری‌های ماهیان گرمابی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.
- ۴- دانشیار گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.
- ۵- استاد گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.
- ۶- دانشیار گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.

* نویسنده مسئول: alishahim@scu.ac.ir

DOI: 10.22124/japb.2022.21342.1450

مقدمه

ژنی (Thirumalaikumar et al., 2021) هستند. کارایی، هزینه تولید و روش تجویز این واکسن‌ها باعث ایجاد محدودیت‌هایی برای استفاده از آنها در ماهی شده است (Han et al., 2019).

امروزه استفاده از واکسن‌های DNA که به نسل سوم واکسن‌ها معروف هستند به دلیل ایمنی بالا، سادگی و کم‌هزینه بودن تولید انبوه، ثبات آنتی‌ژنیک، امکان تولید علیه چند عامل (واکسن پلی‌والان)، عدم سمیت، عدم نیاز به زنجیره سرد در نگهداری واکسن (۸۰ درصد هزینه‌های واکسن)، تحریک وسیع ایمنی سلولی و هومورال، امکان نگهداری به صورت جامد (پودر) و مایع، امکان تجویز خوراکی و مخاطی طرفداران زیادی یافته است (Mzula et al., 2019; Li et al., 2020). تاکنون در باکتری *Aeromonas* ژن‌های مختلفی برای ایمن‌سازی مد نظر قرار گرفته است (Vilches et al., 2009; Mzula et al., 2019) ولی مشخص شده است که ژن‌های مرتبط با سیستم ترشحی تیپ III ویژگی‌های مناسب انتخاب شدن به منظور تولید واکسن DNA را دارند. (Koroleva et al., 2017; Fasciano et al., 2019).

عفونت‌های آئروموناسی یکی از شایع‌ترین عفونت‌های باکتریایی در ماهیان پرورشی جهان بوده و *Aeromonas hydrophila* از مهم‌ترین *Aeromonas* های متحرک ایجاد کننده عفونت آئروموناسی در ماهیان پرورشی است (Pessoa et al., 2019). عفونت‌های آئروموناسی در صنعت پرورش ماهیان گرمابی کشور از سال‌ها قبل صدمات بسیاری وارد کرده است (علیشاهی و همکاران، ۱۳۸۸). درمان آنتی‌بیوتیکی این بیماری باکتریایی با توجه به معضلات آن مثل هزینه‌های بالای درمان، ایجاد مقاومت‌های دارویی، مشکلات زیست‌محیطی و مشکلات اجرایی تجویز، کارایی چندانی نداشته است (Zellweger et al., 2017). از بین روش‌های مختلف مقابله با این بیماری، از پیشگیری به وسیله واکسیناسیون به عنوان یک راهکار مناسب و گاهی به عنوان بهترین روش مقابله با عفونت یاد شده است (Shefat, 2018; Mzula et al., 2019). واکسن‌های مختلفی در برابر عفونت با *Aeromonas hydrophila* معرفی شده‌اند که شامل واکسن‌های نسل اول شامل باکتری غیرفعال شده، واکسن‌های زنده تخفیف حدت یافته و پروتئین نو ترکیب نسل دوم (Abdelhamed et al., 2019) و واکسن‌های

مواد و روش‌ها

ارزیابی بیوانفورماتیک و طراحی آغازگرها

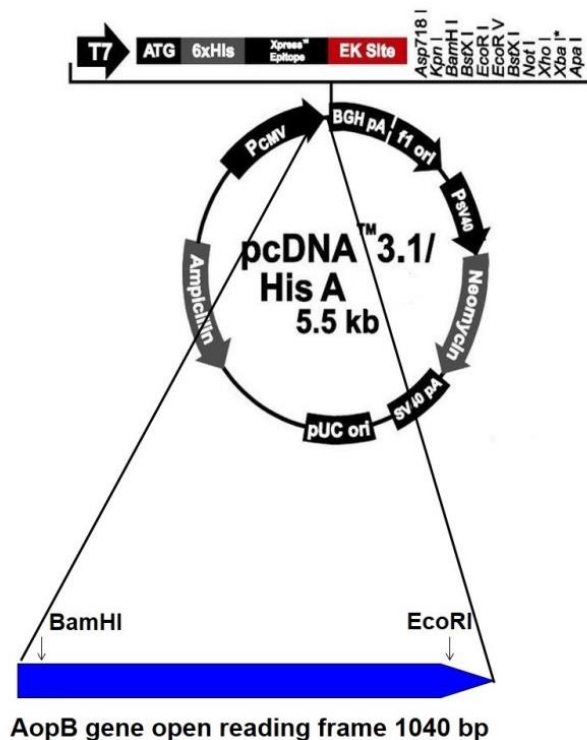
به منظور تکثیر ژن aopB، در این پژوهش از حادترین جدایه باکتری *Aeromonas hydrophila* که از ماهیان کپور مبتلا به سپتی‌سمی آئروموناسی در مزارع پرورشی استان خوزستان جداسازی و با روش مولکولی و فنوتیپی تایید شده بودند استفاده شد (آهنگرزاده و همکاران، ۱۳۹۴). به این منظور از بین ۶ جدایه که دارای این ژن بودند با استفاده از تست ارزیابی حدت و تعیین LD₅₀ حادترین جدایه دارای این ژن به عنوان باکتری مناسب انتخاب شد (نتایج ارزیابی حدت در این مقاله آورده نشده است). توالی ژن aopB با عدد دسترسی KP689330.1 از بانک ژن NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genba>) (nk/ به طول ۱۰۴۴ جفت باز استخراج شد. طراحی آغازگرها با استفاده از نرم‌افزار VectorNTI Advance v11.5.2 انجام شد. آغازگرها به منظور تکثیر توالی کامل ناحیه کد کننده ژن aopB و دارای نواحی برش آنزیم‌های EcoRI و NheI طراحی شدند.

سیستم ترش‌تیپ III از چندین پروتئین تشکیل شده است و یکی از پیچیده‌ترین سیستم‌های ترش‌تیپ باکتریایی را می‌سازد که در حدت باکتری نقش بسیار مهمی دارد. یکی از مهم‌ترین ژن‌های عملکردی سیستم ترش‌تیپ III ژن aopB است که پروتئین‌های مرتبط با تثبیت سیستم ترش‌تیپ در غشای داخلی باکتری و ایجاد سوراخ یا کانال در سلول میزبان را کد می‌کنند. این ژن یکی از مهم‌ترین ژن‌های حدت باکتری *Aeromonas hydrophila* است و در شناسایی سویه‌های پرحدت در ماهی کاربرد دارد (Rasmussen-Ivey et al., 2016a).

ایمن‌سازی با پلاسمید نو ترکیب حاوی ژن‌های کدکننده پروتئین aopB، راهکاری امیدبخش برای ساخت واکسن موثر در برابر *Aeromonas* های بیماری‌زا به شمار می‌رود. از این رو، در این مطالعه پروتئین aopB سیستم ترش‌تیپ III باکتری *Aeromonas hydrophila* جدا شده از کپورماهیان استان خوزستان به منظور طراحی یک سازه ژنی مدل واکسن DNA در پلاسمید یوکاریوتی بیانی pCDNA3.1 همسانه‌سازی شد.

TTAAATGGCTGTCGGTCTGCTG
 BamHI و EcoRI نواحی برش آنزیم‌های
 با زیر خط نشان داده شده است. در شکل ۱
 نقشه ژنتیکی پلاسمید و محل قرار گرفتن توالی
 aopB در محل آنزیم‌های برشی EcoRI و
 BamHI نشان داده شده است.

احتمال همپوشانی آغازگرهای طراحی شده
 با ژن‌های دیگر باکتری *A. hydrophila* با
 استفاده از نرم‌افزار nBLAST ([https://blast.](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)
 مورد بررسی قرار گرفت. توالی آغازگرهای مورد استفاده
 شامل CATGGGATCCATGCATTC
 و CCGGAATC GATAAGCAGTG



شکل ۱: نقشه ژنتیکی وکتور pCDNA3.1-HisA که ناحیه برش چندگانه دارای محل برش آنزیم‌های BamHI و EcoRI، پس از ناحیه پرموتوری CMV نشان داده شده است (<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/V38520>).

تکثیر ژن aopB با روش PCR

به منظور تکثیر ژن aopB، چند کلونی از باکتری *A. hydrophila* در ۵ میلی لیتر محیط کشت TSB (Tryptic Soy Broth) استریل کشت داده شدند و به مدت یک شب در انکوباتور شیکردار در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. سپس محیط کشت با سرعت ۵۰۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ (Behsan, HB320، ایران) شد و بر روی رسوب سلولی استخراج DNA انجام شد. استخراج DNA با استفاده از کیت تجاری (سینا کلون، ایران) مطابق دستور العمل شرکت سازنده انجام شد. کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از خواندن جذب ۲۸۰/۲۶۰ نانومتر با استفاده از دستگاه میکروبیوفتومتر (Eppendorf، آلمان) مورد بررسی قرار گرفت و نمونه‌های با نسبت جذب ۲۸۰/۲۶۰ بالای ۱/۸ برای مراحل بعدی استفاده شدند.

واکنش PCR با حجم ۲۰ میکرولیتر شامل مخلوط واکنش ۲X PCR (۱۰ میکرولیتر) (یکتا تجهیز، ایران) حاوی ۱ واحد در میکرولیتر آنزیم DNA پلیمراز pfu، ۰/۵ میکرولیتر از هر یک از آغازگرهای رفت و برگشت (۱۰ میکرومولار)، DNA الگو (۱۰۰ نانوگرم) و آب فاقد DNase بود. شرایط انجام واکنش PCR شامل

واسرشت‌سازی اولیه (۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه)، ۴۵ چرخه شامل واسرشت‌سازی (۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه)، اتصال آغازگر (۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه) و طویل‌سازی (۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه) و یک مرحله طویل‌سازی نهایی (۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه) بود. محصول PCR با استفاده از ژل آگارز ۱ درصد و بافر TAE (Tris-Acetic Acid-EDTA) با ولتاژ ۱۰۰ ولت به مدت ۲۰ دقیقه الکتروفورز شد.

خالص‌سازی پلاسمید

در این مطالعه از پلاسمید بیانی یوکاریوتی pCDNA3.1-HisA (Invitrogen، آمریکا) که در باکتری '*Escherichia coli* Top10F' به صورت همراه با گلیسرول در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره شده بود، استفاده شد. به منظور خالص‌سازی پلاسمید، مقدار ۱۰ میکرولیتر از نمونه ذخیره باکتری به ۵ میلی لیتر محیط کشت TSB حاوی ۱۰۰ میلی‌گرم در میلی لیتر آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین اضافه و به مدت یک شب در انکوباتور در ۳۷ درجه سانتی‌گراد و در حال حرکت قرار داده شد. استخراج پلاسمید با استفاده از کیت استخراج

پلاسمید تجاری (سیناکلون، ایران) و بر اساس دستور العمل شرکت سازنده انجام شد. پس از استخراج پلاسمید، کیفیت آن با استفاده از ژل آگارز ۱ درصد مورد بررسی قرار گرفت. همچنین تعیین غلظت پلاسمید با استفاده از دستگاه میکروبیوفتومتر مورد ارزیابی قرار گرفت.

NEB Ligation Calculator محاسبه شد. الحاق با استفاده از آنزیم T4 لیگاز (Fermentase، آمریکا) و مطابق دستور العمل شرکت سازنده در دستگاه انکوباتور در دمای ۱۶ درجه سانتی‌گراد به مدت یک شبانه روز انجام گرفت. فرآیند ترانسفورماسیون پلاسمید حاوی ژن aopB به سلول مستعد 'Top10F' با روش کلرید کلسیم سرد شده، صورت گرفت. سپس سلول ترانسفورم شده به محیط LB تلقیح و ابتدا به مدت ۲ ساعت بدون آنتی‌بیوتیک و سپس به مدت ۴ ساعت در محیط حاوی ۱۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد در حال حرکت با دور ۱۵۰rpm قرار داده شد. سپس مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از باکتری ترانسفورم شده بر روی محیط کشت TSA حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین تلقیح و به مدت یک شب در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد.

تایید کلونینگ

به منظور غربالگری کلون‌های مثبت حاوی پلاسمید نو ترکیب pCDNA3.1-AopB از روش کلونی PCR با استفاده از آغازگرهای عمومی CMV-F و BGH-rev استفاده شد. نتایج PCR با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز ۱

پلاسمید تجاری (سیناکلون، ایران) و بر اساس دستور العمل شرکت سازنده انجام شد. پس از استخراج پلاسمید، کیفیت آن با استفاده از ژل آگارز ۱ درصد مورد بررسی قرار گرفت. همچنین تعیین غلظت پلاسمید با استفاده از دستگاه میکروبیوفتومتر مورد ارزیابی قرار گرفت.

هضم آنزیمی و خالص‌سازی محصول PCR و پلاسمید بیانی

محصول واکنش PCR و پلاسمید استخراج شده برای انجام واکنش الحاق با استفاده از آنزیم‌های برشی EcoRI و NheI (Fermentase، آمریکا) و مطابق دستور العمل شرکت سازنده مورد هضم قرار گرفت. واکنش به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انجام شد. هضم نمونه‌ها با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد بررسی شد. به منظور خالص‌سازی نمونه‌های هضم شده از کیت استخراج DNA از ژل (Vivantis، مالزی) و طبق دستور العمل شرکت سازنده انجام شد.

کلون‌سازی ژن aopB در پلاسمید بیانی

به منظور الحاق ژن aopB در پلاسمید بیانی pCDNA3.1-HisA، ابتدا نسبت‌های مناسب پلاسمید به DNA با استفاده از نرم‌افزار

(رده سلولی کلیه جنین انسان) که از بانک سلولی انستیتو پاستور تهیه شده بود، استفاده شد. تعداد $10^6 \times 5$ سلول در پلیت کشت ۶ خانه‌ای حاوی محیط کشت DMEM (کیازیت، ایران)، ۱۰ درصد سرم جنین گاو (Gibco، آمریکا) و ۱ درصد آنتی‌بیوتیک‌های استرپتومایسین و پنسیلین کشت داده شد.

پس از پوشش پلیت‌ها به میزان ۷۰ درصد، محیط کشت با محیط تازه بدون آنتی‌بیوتیک و FBS ۵ درصد تعویض شد. به منظور ترانسفکشن سلول‌های HEK293T از روش کلسیم فسفات استفاده شد (Jordan et al., 1996). بدین منظور مقدار ۵ میکروگرم پلاسمید نو ترکیب در ۱۰۰ میکرولیتر بافر ترانسفکشن حاوی HEPES (۰/۱۲ مولار)، کلرید سدیم (۰/۲۸ مولار)، Na_2HPO_4 (۱/۵ میلی‌مولار) و کلرید کلسیم (۲ مولار) مخلوط و به صورت قطره قطره به نواحی مختلف پلیت کشت سلول اضافه و به آرامی بر روی محیط کشت جایجا شد. سپس پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور CO_2 ۵۰ درصد و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده شدند. پس از ۲۴ ساعت محیط کشت پلیت‌ها با محیط کشت تعویض و با محیط کشت کامل حاوی FBS ۱۰ درصد کشت داده شدند. پس از ۴۸ ساعت

درصد بررسی و نمونه‌هایی که دارای باند مورد نظر بودند، انتخاب شدند. ۲ کلون مثبت انتخاب و به مدت یک شب در محیط TSB حاوی آمپی‌سیلین (۱۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده شد. استخراج پلاسمید بر روی نمونه‌های مثبت با استفاده از کیت استخراج پلاسمید (سیناکلون، ایران) و مطابق دستور العمل شرکت سازنده انجام شد. به منظور تایید کلونینگ، هضم آنزیمی دوگانه توسط آنزیم‌های EcoRI و NheI صورت گرفت. پس از تایید خالص‌سازی پلاسمیدها با استفاده از ژل آگارز ۱ درصد، نمونه‌ها برای تعیین توالی به شرکت پیشگام زیست‌فناوری ارسال و تعیین توالی دو طرفه انجام شد. نتایج تعیین توالی با استفاده از نرم‌افزار Bioedit 7.2 استحصال و میزان همپوشانی و صحت توالی با توالی موجود در بانک ژن با عدد دسترسی KP689330.1 با استفاده از نرم‌افزار ClustalW مورد بررسی قرار گرفت.

انتقال سازه ژنی به سلول CHO و بررسی بیان پروتئین

به منظور تعیین کارایی سازه ژنی aopB و بیان پروتئین pCDNA3.1-AopB در سلول یوکاریوتی از رده سلولی HEK293T

نهایت برای مشاهده باند پروتئینی از سوبسترای دی‌آمینو بنزیدین استفاده شد.

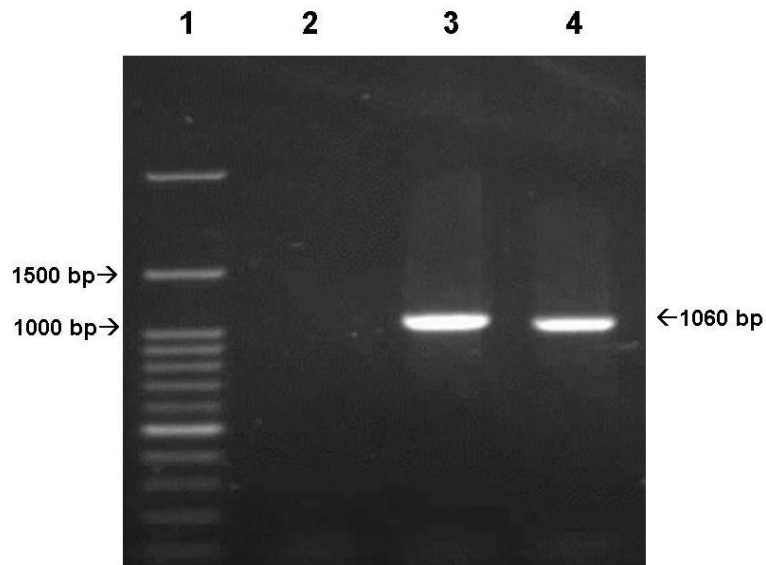
نتایج

شکل ۲ نتایج تکثیر ژن *aopB* با استفاده از آغازگرهای دارای نواحی برش *EcoRI* و *NheI* بر روی نمونه DNA خالص‌سازی شده از باکتری *Aeromonas hydrophila* جدا شده از مزارع پرورش کپورماهیان استان خوزستان را نشان می‌دهد. تجزیه و تحلیل نتایج PCR با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد نشان دهنده تکثیر یک باند اختصاصی به طول تقریبی ۱۰۶۰ جفت باز بود که با ناحیه کد کننده ژن *aopB* موجود در بانک ژن با کد دسترسی KP689330.1 مطابقت داشت.

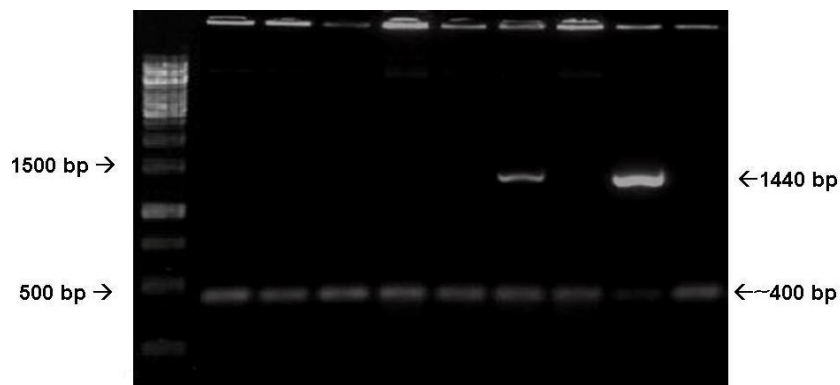
پس از ترانسفورماسیون پلاسمید نوترکیب همان طور که در شکل ۳ مشاهده می‌شود در روش کلونی PCR با استفاده از آغازگرهای عمومی *CMV-F* و *BGH-rev* وجود ژن *aopB* به طول ۱۰۴۰ جفت باز منجر به تکثیر باندی به طول تقریبی ۱۴۰۰ جفت باز شد. در حالی که PCR کلون‌های منفی منجر به تکثیر باندی به طول تقریبی ۴۰۰ جفت باز شد.

سلول‌ها با PBS استریل شسته و با استفاده از محلول تریپسین-EDTA ۰/۲۵ درصد تریپسینه و پس از سانتریفیوژ جداسازی شدند. رسوب سلولی با استفاده از بافر لیز کننده سرد حاوی ترکیبات Tris پایه (۵۰ میلی‌مولار)، کلرید سدیم (۱۵۰ میلی‌مولار)، تریتون x100 (۰/۱ درصد) و مهار کننده پروتئاز (Sigma، آمریکا)، لیز و پس از تعیین میزان پروتئین به روش برادفورد، برای انجام آزمون وسترن بلات استفاده شد.

ارزیابی وسترن بلاتینگ به منظور تایید محصول پروتئینی در رده سلولی HEK293T
برای تعیین بیان پروتئین نوترکیب *aopB* در رده سلولی HEK293T به روش وسترن بلات، نمونه لیز سلولی پس از الکتروفورز بر روی ژل ۱۲ درصد SDS-PAGE تفکیک شد و در تانک بلاتینگ به کاغذ نیتروسولوز (Sartorius، آمریکا) منتقل شد. غشا با BSA ۳ درصد مسدود شد و پس از شستشو به ترتیب با آنتی‌بادی پلی‌کلونال آنتی HisTag (سیگما، آمریکا) (رقعت ۱ در ۱۰۰۰) و آنتی‌بادی ثانویه کونژوگه با پروکسیداز HRP Conjugated Goat Anti Mouse Antibody (سیگما، آمریکا) (با رقت ۱ در ۱۰۰۰۰) انکوبه شد. در



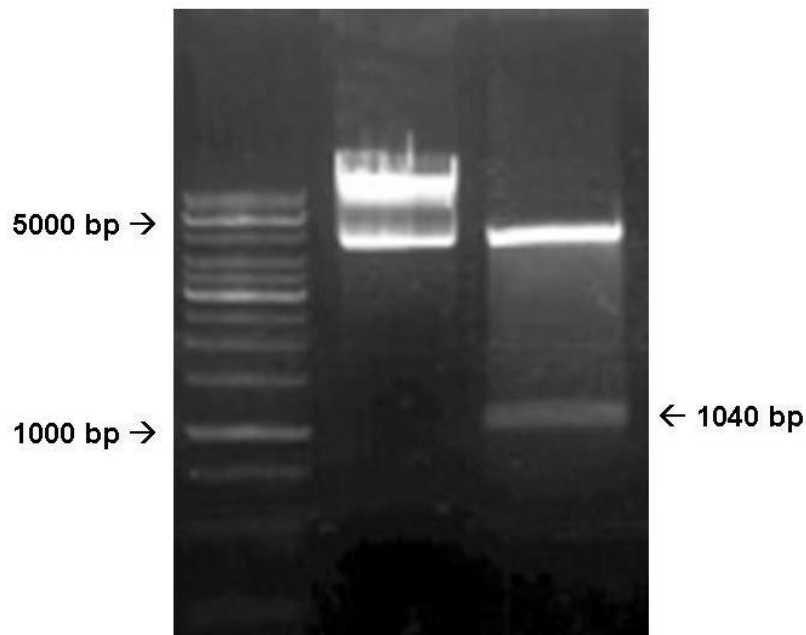
شکل ۲: الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد محصول PCR به دنبال تکثیر ژن *aopB* باکتری *Aeromonas hydrophila* جدا شده از کپورماهیان استان خوزستان. ۱: مارکر اندازه DNA؛ ۲: شاهد منفی؛ ۳ و ۴: محصول PCR ژن *aopB* به طول تقریبی ۱۰۶۰۰ جفت باز.



شکل ۳: نتایج الکتروفورز محصول کلونی PCR بر روی کلون‌های باکتری *TOP10F'* ترانسفورم شده با پلاسمید نو ترکیب pCDNA3.1-*aopB* با استفاده از آغازگرهای عمومی BGH و CMV-F. کلون‌های مثبت باند تقریبی ۱۴۴۰ جفت باز و کلون‌های منفی باند تقریبی ۴۵۰ جفت باز را بر روی ژل آگارز نشان دادند.

برش پلاسمید استخراج شده از نمونه کلون‌های مثبت نیز منجر به ایجاد باندهای به طول تقریبی ۱۰۴۰ جفت باز شد که نشان دهنده الحاق ژن *aopB* در وکتور pCDNA3.1- His A بود (شکل ۴). نتایج تعیین توالی پلاسمید pCDNA3.1-*aopB* و ارزیابی میزان همپوشانی توالی

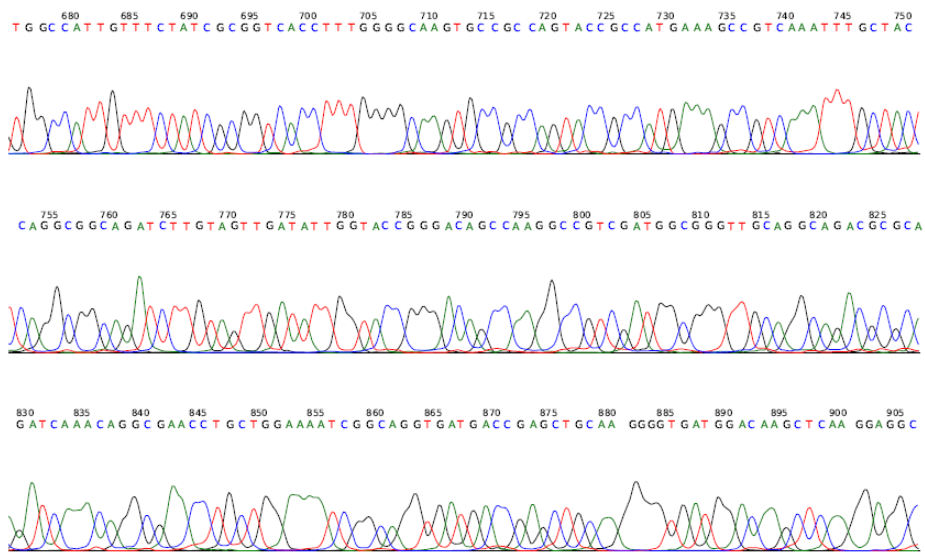
استحصال شده با استفاده از نرم‌افزار nBLAST بانک ژن نشان دهنده شباهت ۱۰۰ درصدی توالی تکثیر شده با توالی ژن *aopB* موجود در بانک ژن با کد دسترسی KP689330.1 بود (شکل‌های ۵ و ۶).



شکل ۴: هضم آنزیمی دوگانه پلاسمید نو ترکیب pCDNA3.1-*aopB* توسط آنزیم‌های *NheI* و *EcoRI* منجر به ایجاد قطعه DNA مربوط به ژن *aopB* با طول ۱۰۴۰ جفت باز شد.

select all 15 sequences selected		GenBank	Graphics	Distance tree of results	MSA Viewer			
Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Aeromonas hydrophila strain AH04 AopB (aopB) gene complete cds	<i>Aeromonas hydrophila</i>	1929	1929	100%	0.0	100.00%	1044	KP689330.1
<input checked="" type="checkbox"/> Aeromonas hydrophila strain AH-1 type III secretion system gene locus complete sequence	<i>Aeromonas hydrophila</i>	1823	1823	100%	0.0	98.18%	26160	AY394563.2
<input checked="" type="checkbox"/> Aeromonas hydrophila strain 3924 chromosome complete genome	<i>Aeromonas hydrophila</i>	1746	1746	100%	0.0	96.84%	4762881	CP053884.1
<input checked="" type="checkbox"/> Aeromonas sp. 1805 chromosome complete genome	<i>Aeromonas sp. 1805</i>	1707	1707	100%	0.0	96.17%	4834781	CP038515.1
<input checked="" type="checkbox"/> Aeromonas hydrophila strain AL06-06 complete genome	<i>Aeromonas hydrophila</i>	1591	1591	100%	0.0	94.16%	4884823	CP010947.1
<input checked="" type="checkbox"/> Aeromonas hydrophila strain 3019 chromosome complete genome	<i>Aeromonas hydrophila</i>	1585	1585	100%	0.0	94.06%	5130685	CP053885.1
<input checked="" type="checkbox"/> Aeromonas sp. ASNH4 chromosome complete genome	<i>Aeromonas sp. ASNH4</i>	1580	1580	100%	0.0	93.97%	5216518	CP026217.1

شکل ۵: نتایج همپوشانی توالی استحصال شده از تعیین توالی پلاسمید نوترکیب pCDNA3.1-aopB با استفاده از آغازگرهای عمومی CMV و BGH که نشان دهنده شباهت ۱۰۰ درصدی توالی تکثیر شده با توالی ژن *Aeromonas hydrophila aopB* جدا شده از کپورماهیان استان خوزستان است.

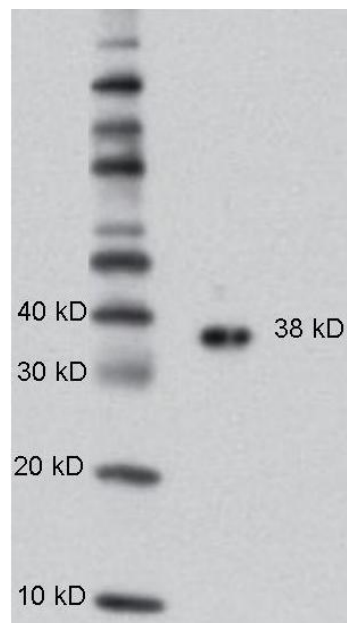


شکل ۶: بخشی از کروماتوگرام مربوط به تعیین توالی پلاسمید نوترکیب pCDNA3.1-aopB با استفاده از آغازگرهای عمومی CMV و BGH که با توالی ناحیه ۷۰۰ تا ۹۰۰ بخش کد کننده ژن *aopB* همپوشانی دارد.

بحث

بیماری عفونت با *Aeromonas* های متحرک بویژه *Aeromonas hydrophila* از مهم ترین بیماری های ماهیان آب شیرین بویژه کپورماهیان است (Rasmussen-Ivey et al., 2016b). بیشتر سویه های این باکتری فرصت طلب هستند و حدت چندانی برای ماهی ندارند و به صورت همزیست در آب و حتی در بدن ماهی زندگی می کنند، برای تشخیص گونه های بیماری زای این باکتری استفاده از شاخص های حدت بسیار اهمیت دارد. این شاخص ها شامل آیرولایزین (*aerA*)، انتروتوکسین سایتوتوکسیک (*act*)، همولایزین (*hlyA*)، انتروتوکسین تحریک کننده سلول (*alt*)، انتروتوکسین تجزیه کننده سلول (*ast*)، فلاژلین (*fla*)، سرین پروتئاز (*ahpA*) و پروتئین غشای خارجی (*omp*) هستند. در این میان، یکی از مهم ترین ژن های حدت به منظور شناسایی سویه های بیماری زای *Aeromonas* ژن های مربوط به سیستم ترشحی تیپ III هستند (Carvalho-Castro et al., 2010) باکتری *A. hydrophila* از سیستم ترشحی تیپ III برای وارد کردن توکسین های باکتریایی به سلول میزبان استفاده می کند (El-Bahar et al., 2019). ژن *aopB* در این سیستم

نتایج وسترن بلات بر روی لیز رده سلولی HEK293T به دنبال ترانسفکشن با پلاسمید نوترکیب pCDNA3.1-aopB با استفاده از آنتی بادی ضد Histag نشان دهنده وجود ۱ باند تقریبی ۴۰ کیلودالتون بود که با توجه به تطابق با طول ژن *aopB* (۱۰۴۴ جفت باز) با وزن مولکولی پروتئین *aopB* مطابقت داشت (شکل ۷).



شکل ۷: نتایج وسترن بلات بر روی لیز رده سلولی HEK293T به دنبال ترانسفکشن با پلاسمید نوترکیب pCDNA3.1-aopB با استفاده از آنتی بادی ضد Histag نشان دهنده حضور پروتئین با وزن مولکولی تقریبی ۴۰ کیلودالتون بود.

برای تولید واکسن نو ترکیب آدنوو پروسی در برابر *Chlamydia* در موش استفاده کرده و محافظت بالایی را در برابر این باکتری گزارش کردند. آنها استفاده از ژن های سیستم ترشحی تیپ III را به عنوان یکی از بهترین انتخاب های آنتی ژن نو ترکیب واکسنی در واکسن های ژنی گزارش کردند (Koroleva et al., 2017). همچنین Bulir و همکاران (۲۰۱۶) نیز از سه آنتی ژن پروتئینی سیستم ترشحی تیپ III را برای واکسیناسیون مخاطی در برابر *Chlamydia* در جانور آزمایشگاهی موش سوری استفاده کرده و عیار بالای آنتی بادی را در برابر این بیماری که محافظت کاملی را باعث شده بود، گزارش کردند.

در یک مطالعه جالب افزایش مقاومت در برابر چالش با باکتری *Vibrio* بعد از واکسیناسیون با آنتی ژن های سیستم ترشحی تیپ III باکتری *Shigella* گزارش شده است (Martinez-Becerra et al., 2012).

با توجه به جایگاه سیستم ترشحی تیپ III در بیماری زایی باکتری *A. hydrophila* و نقش ژن *aopB* در این سیستم، طراحی سازه ژنی واکسن DNA بر پایه آنتی ژن یاد شده در مطالعه حاضر انجام شد.

مهم ترین نقش عملکردی را دارد و در بسیاری از مطالعات مربوط به *Aeromonas* های بیماری زا ارزیابی این ژن هدف قرار گرفته است (Van Sang and Uyen, 2021).

با توجه به محدودیت ها و تبعات زیست محیطی و بهداشتی آنتی بیوتیک تراپی در برابر عفونت آئروموناسی، ایمنی سازی و واکسیناسیون بهترین روش مبارزه با این عفونت باکتریایی است (Xiong et al., 2017). استفاده از واکسن های DNA به دلیل ثبات در دمای محیط بدون نیاز به زنجیره سرد، توانایی تقلید از عفونت های طبیعی، سادگی همسانه سازی آنتی ژن ها در وکتور های باکتریایی و ایجاد پاسخ ایمنی مناسب در آبی پرووری، در حال توسعه است. واکسن های DNA به دلیل مزیت های فراوان در تولید واکسن در برابر *A. hydrophila* نیز کاربرد دارند، برای تولید این نوع واکسن ها انتخاب ژن مناسب اهمیت ویژه ای دارد (Song et al., 2018). در چند سال اخیر استفاده از ژن های سیستم ترشحی تیپ برای ایمن سازی با توجه به نقش ویژه آنها در بیماری زایی بسیاری از باکتری ها بیشتر مورد توجه واقع شده است (Fasciano et al., 2019). به عنوان مثال Koroleva و همکاران (۲۰۱۷) از ژن های سیستم ترشحی تیپ III

نو ترکیب aopB در سیستم بیانی بود. با توجه به این که His-Tag در انتهای کربوکسیلی پروتئین نو ترکیب قرار دارد، نتیجه وسترن بلا تینگ نشان دهنده بیان کامل پروتئین بود. انتخاب پروموتور مناسب در طراحی سازه های ژنی واکسن DNA به منظور دستیابی به بیان بالای آنتی ژن پس از تزریق به ماهی اهمیت بالایی دارد. وکتور بیانی pCDNA3.1-HisA دارای توالی پروموتوری یوکاریوتی سیتومگالو ویروس (Cytomegalovirus) است که بیان بالایی در سلول های پستانداران دارد. نتایج مطالعات پیشین نشان داده است که واکسن های DNA طراحی شده بر پایه آنتی ژن های ماهی با استفاده از پروموتور CMV در بسیاری از رده های سلولی انواع ماهیان تکثیر می شوند (Thirumalaikumar et al., 2021).

در مطالعه ای مشابه مطالعه جاری در ماهی باس دریایی آسیایی (Li et al., 2013) نیز بعد از انتخاب و توالی یابی ژن OMP38 باکتری *Vibrio parahaemolyticus*، از وکتور یوکاریوتی pCDNA3.1 برای کلون کردن ژن استفاده کردند. سازه ژنی تولیدی VAOMP38 نامگذاری شد و با کیت EndoFree Plasmid Mega Purification Kit خالص سازی پلاسمید صورت گرفت. آنها از این محصول بعد

در مطالعه حاضر ژن aopB باکتری *A. hydrophila* جداسازی شده از کپور ماهیان بیمار استان خوزستان با طول تقریبی ۱۰۰۰ جفت باز با استفاده از آغازگرهای دارای نواحی برش آنزیم های EcoRI و NheI در وکتور بیانی pCDNA3.1-HisA همسانه سازی و توانایی ورود وکتور و تولید شکل نو ترکیب پروتئین aopB با استفاده از رده سلولی HEK293T انجام شد. در بسیاری از مطالعات تولید واکسن DNA در برابر بیماری های باکتریایی آبزیان از وکتور بیانی pCDNA3.1 استفاده شده است. از ویژگی های این سیستم بیانی می توان به آسانی تکثیر در شرایط آزمایشگاهی، قابلیت بیان مناسب آنتی ژن ناشی از داشتن پروموتورهای قوی، ورود و تکثیر مناسب در سلول های میزبان و توزیع مناسب در بافت های میزبان نام برد.

نتیجه PCR و تعیین توالی وکتور نو ترکیب با استفاده از آغازگرهای عمومی نشان دهنده درستی کلونینگ ژن aopB با طول تقریبی ۱۰۰۰ جفت باز در وکتور pCDNA3.1-HisA بود. نتیجه وسترن بلا تینگ بر روی پروتئین های استخراج شده از سلول های HEK293T با استفاده از آنتی بادی ضد His-Tag یک باند پروتئینی اختصاصی در محدوده ۳۵ کیلودالتون را نشان داد که تایید کننده بیان پروتئین

مطالعه جاری از سیستم بیانی یوکاریوتی pcDNA3.1 برای کلون کردن ژن s11 رتوویروس استفاده کردند و سازه ژنی pcDNA3.1-s11 را در باکتری *E. coli* ترانسفرم کرده و نهایتاً بعد از ریزپوشانی پلاسمید تولیدی با نانوذرات آن را به صورت خوراکی به ماهی کپور علفخوار تجویز کردند (Gao et al., 2018).

در برخی مطالعات برای تولید واکسن DNA در برابر *Aeromonas* های متحرک از وکتورهای بیانی دیگر نیز استفاده شده است، مثلاً Han و همکاران (۲۰۱۹) با استفاده از وکتور بیانی بر پایه مخمر و ژن OMP اقدام به ساختن واکسن DNA در ماهی کاراس (*Carassius auratus*) کردند.

در مجموع، نتایج مطالعه حاضر نشان دهنده طراحی موفق سازه ژنی واکسن DNA حاوی ژن aopB باکتری *A. hydrophila* بر پایه وکتور بیانی pCDNA3.1-HisA با قابلیت ورود به سلول میزبان و بیان آنتی ژن در سلولهای یوکاریوتی بود. ضروری است در مطالعات آینده پاسخهای ایمنی به واکسن یادشده به دنبال واکسیناسیون به روشهای مختلف در ماهیان میزبان مورد بررسی قرار گیرد.

از آزمایشهای سنجش کیفیت برای تهیه واکسن خوراکی ریزپوشانی شده استفاده کردند (Li et al., 2013). همچنین Inthasaeng و همکاران (۲۰۱۸) برای تولید واکسن DNA در برابر *Streptococcus agalactiae* در تیلاپیای نیل (*Oreochromis niloticus*) از ژن آلفا لایک پروتئین (alp-1) استفاده کردند و همانند مطالعه جاری از سیستم بیانی یوکاریوتی pcDNA-3.1 با استفاده از T4 DNA Ligase برای کلون کردن ژن هدف استفاده کردند. آنها بعد از تولید سازه ژنی pcDNA-Alp1 آن را به باکتری *E. coli* استرین DH5α (*Escherichia coli* DH5α) ترانسفرم کرده و بیان پروتئین alp-1 را با استفاده از کشت در محیط CHO و استفاده از تکنیک وسترن بلات تایید کردند. سپس از پلاسمید حاوی ژن هدف برای تولید واکسن ضد استرپتوکوکوزیس در ماهی تیلاپیا استفاده کردند (Inthasaeng et al., 2018).

Gao و همکاران (۲۰۱۸) نیز در ماهی کپور علفخوار (*Ctenopharyngodon idella*) با بالاترین تولید سالانه در بین آبزیان در جهان اقدام به تولید واکسن DNA در برابر رتوویروس (Reovirus) بیماری زای این گونه که مهم ترین بیماری این گونه است، کردند. آنها نیز مشابه

تشکر و قدردانی

پژوهش حاضر با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز و صندوق

حمایت از پژوهشگران معاونت علمی ریاست جمهوری انجام شد.

منابع

- آهنگرزاده م.، قربانیور نجف آبادی م.، پیغان ر.، شریف روحانی م. و سلطانی م. ۱۳۹۴. نقش آئروموناس هیدروفیلا در سپتیسمی‌های باکتریایی کپورماهیان پرورشی استان خوزستان. مجله دامپزشکی ایران، ۱۱(۳): ۱۶-۵.
- علیشاهی م.، سلطانی م. دو زرگر ا. ۱۳۸۸. بررسی باکتریایی تلفات ماهی آمور (*Ctenopharyngodon idella*) در استان خوزستان. مجله دامپزشکی ایران، ۲۲(۵): ۲۵-۳۴.
- Abdelhamed H., Banes M., Karsi A. and Lawrence M.L. 2019.** Recombinant ATPase of virulent *Aeromonas hydrophila* protects channel catfish against motile *Aeromonas* septicemia. *Frontiers in Immunology*, 10: 1–7 (1641).
- Bulir D.C., Liang S., Lee A., Chong S., Simms E., Stone C., Kaushic C., Ashkar A. and Mahony J.B. 2016.** Immunization with chlamydial type III secretion antigens reduces vaginal shedding and prevents fallopian tube pathology following live *C. muridarum* challenge. *Vaccine*, 34(34): 3979–3985.
- Carvalho-Castro G.A., Lopes C.O., Leal C.A.G., Cardoso P.G., Leite R.C. and Figueiredo H.C.P. 2010.** Detection of type III secretion system genes in *Aeromonas hydrophila* and their relationship with virulence in Nile tilapia. *Veterinary Microbiology*, 144(3-4): 371–376.
- El-Bahar H.M., Ali N.G., Aboyadak I.M., Khalil S.A.E.S. and Ibrahim M.S. 2019.** Virulence genes contributing to *Aeromonas hydrophila* pathogenicity in *Oreochromis niloticus*. *International Microbiology*, 22(4), 479–490.
- Ellis A.E. 1988.** Fish Vaccination. Academic Press, USA. 255P.
- Fasciano A.C., Shaban L. and Mecsas J. 2019.** Promises and challenges of the type three secretion system injectisome as an antivirulence target. *EcoSal Plus*, 8(2): 1–18.
- Gao Y., Pei C., Sun X., Zhang C., Li L. and Kong X. 2018.** Plasmid pCDNA3. 1-s11 constructed based on the S11 segment of grass carp reovirus as DNA vaccine provides immune protection. *Vaccine*, 36(25): 3613–3621.
- Han B., Xu K., Liu Z., Ge W., Shao S., Li P., Yan N., Li X. and Zhang Z. 2019.** Oral yeast-based DNA vaccine confers effective protection from *Aeromonas hydrophila* infection on *Carassius auratus*. *Fish and Shellfish Immunology*, 84: 948–954.

- Inthasaeng P., Unajak S., Areechon N., Hirono I. and Surachetpong W. 2018.** Efficacy of pcDNA-Alp1 DNA vaccine against *Streptococcus agalactiae* in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). The Thai Journal of Veterinary Medicine, 48(2): 279–288.
- Jordan M., Schallhorn A. and Wurm F.M. 1996.** Transfecting mammalian cells: Optimization of critical parameters affecting calcium-phosphate precipitate formation. Nucleic Acids Research, 24(4): 596–601.
- Koroleva E.A., Kobets N.V., Shcherbinin D.N., Zigangirova N.A., Shmarov M.M., Tukhvatulin A.I. and Gintsburg A.L. 2017.** Chlamydial type III secretion system needle protein induces protective immunity against *Chlamydia muridarum* intravaginal infection. BioMed Research International, 2017: 1–14 (3865802).
- Li J.N., Zhao Y.T., Cao S.L., Wang H. and Zhang J.J. 2020.** Integrated transcriptomic and proteomic analyses of grass carp intestines after vaccination with a double-targeted DNA vaccine of *Vibrio mimicus*. Fish and Shellfish Immunology, 98: 641–652.
- Li L., Lin S.L., Deng L. and Liu Z.G. 2013.** Potential use of chitosan nanoparticles for oral delivery of DNA vaccine in black seabream *Acanthopagrus schlegelii* Bleeker to protect from *Vibrio parahaemolyticus*. Journal of Fish Diseases, 36(12): 987–995.
- Martinez-Becerra F. J., Kissmann J.M., Diaz-McNair J., Choudhari S.P., Quick A.M., Mellado-Sanchez G., Clements J.D., Pasetti M.F., and Picking W.L. 2012.** Broadly protective *Shigella* vaccine based on type III secretion apparatus proteins. Infection and Immunity, 80(3): 1222–1231.
- Mzula A., Wambura P.N., Mdegela R.H. and Shirima G.M. 2019.** Current state of modern biotechnological-based *Aeromonas hydrophila* vaccines for aquaculture: A systematic review. BioMed Research International, 2019: 1–11 (3768948).
- Pessoa R.B.G., De Oliveira W.F., Marques D.S.C., Dos Santos Correia M.T., De Carvalho E.V.M.M. and Coelho L.C.B.B. 2019.** The genus *Aeromonas*: A general approach. Microbial Pathogenesis, 130: 81–94.
- Rasmussen-Ivey C.R., Figueras M.J., McGarey D. and Liles M.R. 2016a.** Virulence factors of *Aeromonas hydrophila*. Frontiers in Microbiology, 7: 1337–1351.
- Rasmussen-Ivey C.R., Hossain M.J., Odom S.E., Terhune J.S., Hemstreet W.G., Shoemaker C.A., Zhang D., Xu D.H., Griffin M.J., Liu Y.J., Figueras M.J., Santos S.R., Newton J.C. and**

- Liles M.R. 2016b.** Classification of a hypervirulent *Aeromonas hydrophila* pathotype responsible for epidemic outbreaks in warm-water fishes. *Frontiers in Microbiology*, 7: 1–16 (1615).
- Shefat S.H.T. 2018.** Vaccines for use in finfish aquaculture. *Acta Scientifica Pharmaceutical Sciences*, 2(11): 15–19.
- Song M.F., Kang Y.H., Zhang D.X., Chen L., Bi J.F., Zhang H.P. and Shan X.F. 2018.** Immunogenicity of extracellular products from inactivated vaccine against *Aeromonas veronii* TH0426 in koi, *Cyprinus carpio*. *Fish and Shellfish Immunology*, 81: 176–181.
- Thirumalaikumar E., Lelin C., Sathishkumar R., Vimal S., Anand S.B., Babu M.M. and Citarasu T. 2021.** Oral delivery of pVAX-OMP and pVAX-hly DNA vaccine using chitosan-tripolyphosphate (Cs-TPP) nanoparticles in rohu (*Labeo rohita*) for protection against *Aeromonas hydrophila* infection. *Fish and Shellfish Immunology*, 115: 189–197.
- Van Sang N. and Uyen N.T. 2021.** Cloning, expression, purification, and oligomeric characterization of the AopB-C-terminus domain in T3SS major translocator protein of *Aeromonas hydrophila*. *VNU Journal of Science: Natural Sciences and Technology*, 37(3): 12–17.
- Vilches S., Jimenez N., Tomas J.M. and Merino S. 2009.** *Aeromonas hydrophila* AH-3 type III secretion system expression and regulatory network. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(19): 6382–6392.
- Xiong X.M., Chen Y.L., Liu L.F., Wang W.M., Robinson N.A. and Gao Z.X. 2017.** Estimation of genetic parameters for resistance to *Aeromonas hydrophila* in blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*). *Aquaculture*, 479: 768–773.
- Zellweger R.M., Carrique-Mas J., Limmathurotsakul D., Day N.P.J., Thwaites G.E. and Baker S. 2017.** A current perspective on antimicrobial resistance in Southeast Asia. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 72: 2963–2972.



Research Paper

Construction of pCDNA3.1-AopB gene construct as a DNA vaccine model against *Aeromonas hydrophila* in carp

Marzie Vaseghi¹, Mojtaba Alishahi^{2,3*}, Mohammad Reza Tabande⁴,
Masoud Ghorbanpour⁵, Mohammad Khosravi⁶

Received: December 2021

Accepted: February 2022

Abstract

Aeromonas hydrophila is one of the most important pathogenic bacteria in fish that causes hemorrhagic septicemia, ascites and mortality in different ages and in different fish species including carp. Immunization is one of the best ways to prevent this disease. The use of gene constructs containing bacterial-specific antigens has been developed in recent years to develop high-performance vaccines and to use them in easier methods such as oral administration in aquaculture. In this study, aopB protein of type III secretory system of *A. hydrophila* isolated from carp in Khuzestan province was used to design a gene construct for DNA vaccine which cloned into the expression eukaryotic plasmid pCDNA3.1. In this study, *A. hydrophila* isolated from carp with *Aeromonas* septicemia in carp farms of Khuzestan province which species confirmed by molecular and phenotypic methods. The aopB gene sequence was extracted from the NCBI gene bank and the gene encoding region was amplified using primers containing EcoRI and NheI enzyme cleavage regions. The PCR product was then inserted into the eukaryotic expression plasmid pCDNA3.1-HisA and was transfected to TOP10-F['] bacteria using heat shock. After screening for positive clones using colony PCR and sequencing, the pCDNA3.1-AopB gene construct was transferred to CHO cells using electroporation method and recombinant protein expression was assessed by Western blotting on cell lysis. PCR results and sequencing of gene constructs indicated the cloning of the aopB gene approximately 1000bp in plasmid pCDNA3.1-HisA. Western blot using anti-HisTag antibody showed the presence of a protein with a molecular weight of about 36kD. Conclusively, the pCDNA3.1-AopB gene construct containing the aopB gene was designed and validated. This gene construct can be used in clinical studies to evaluate the immunogenicity of carp in experimental pathogenicity with *A. hydrophila*.

Key words: *Aeromonas hydrophila*, aop-B, Gene Structure, DNA Vaccine.

1- Ph.D. in Aquatic Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.

2- Professor in Department of Livestock, Avian and Aquatic Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.

3- Professor in Excellence Center of Warm Water Fish Health and Disease, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.

4- Associate Professor in Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.

5- Professor in Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.

6- Associate Professor in Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.

*Corresponding Author: alishahim@scu.ac.ir

DOI: [10.22124/japh.2022.21342.1450](https://doi.org/10.22124/japh.2022.21342.1450)