مجله پلاسما و نشانگرهای زیستی
شماره پیاپی ۷۰، دوره ۱۸، شماره۲،بهار ۱۴۰۴، صفحه ۲۷ تا ۳۸
sanad.iau.ir/journal/qjaphd **ISSN: ۹۸۸۰-۱۷۳۵**

بررسی واکنش پذیری آنتی ژن نوترکیب OMP31 باکتری بروسلا با سرم بیماران مبتلا به بروسلوز جهت استفاده در تشخیص به روش الایزا

امیرحسین تارمچی[۱]، زهرا تقی پور[۲]، فائزه سبزه ای[۳]، سعید کابلی[۴]

۱-دانشیار گروه بیوتکنولوژی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان. نویسنده مسئول: taromhi@zums.ac.ir
۲-دانشجوی کارشناسی ارشد گروه بیوتکنولوژی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان
۳-دکترای تخصصی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان.
۴-استادیار گروه بیوتکنولوژی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۱۲/۲۷ **تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۲/۲۵**

چکیده

زمینه و هدف: بروسلوز یا تب مالت یک عفونت زئونوتیک باکتریایی با گسترش جهانی است که توسط گونه بروسلا ایجاد می‌شود. علائم بارز این بیماری شامل تب در انسان و سقط در حیوانات آلوده می‌باشد. گام اساسی در کنترل این بیماری ، شناسایی صحیح و به موقع است؛ بنابر این توسعه روش‌های تشخیصی کارآمد حائز اهمیت است. در این مطالعه از تست الایزا بر پایه پروتئین نوترکیب OMP 31 استفاده شده است که با استناد به تحقیقات پیشین ، یک پروتئین ایمونوژن با توانایی تحریک پاسخ ایمنی و تولید آنتی‌بادی مناسب می‌باشد. هدف از این تحقیق بررسی میزان واکنش پذیری این پروتئین با آنتی‌بادی‌های IgG و IgM موجود در سرم بیماران است.

مواد و روشها: کاست ژنی طراحی‌شده در وکتور *pET-28a* کلون شد و به باکتری E.coli BL21(DE3) انتقال داده شد. بعد از تایید حضور پروتئین به روش وسترن بلات ، تخلیص پروتئینی به روش کروماتوگرافی میل ترکیبی انجام شد. پس از تعیین غلظت، آنتی ژن بر روی پلیت الایزا کوت شده و واکنش پذیری آن با سرم بیماران و سرم گروه کنترل ، مورد بررسی قرار گرفت. حساسیت و دقت برای هر دو نوع آنتی‌بادی IgM و IgG توسط آنالیز ROC ارزیابی شد..

نتایج: پس از بیان پروتئین ، حضور پروتئین OMP31 نوترکیب توسط وسترن بلات تایید شده و غلظت آن به کمک آزمون بردفور۵۴/۳۷ میکروگرم بر میلی لیتر تخمین زده شد. حساسیت و اختصاصیت واکنش پروتئین نوترکیب با IgG و IgM موجود در سرم افراد بیمار و سالم به ترتیب ۵۶/۵۶ و ٪۷۲/۵ برای IgG ؛ و ٪۷۵/۷ و ۶۲/۷۹ برای IgM گزارش شد.

نتیجه گیری: به نظر می رسد پروتئین نوترکیب تولید شده ، قادر به واکنش مناسبی با سرم بیماران بوده و تفاوت معناداری در میزان واکنش پذیری آن با گروه بیمار و گروه کنترل مشاهده شد.

کلمات کلیدی: omp31 ، الایزا، تشخیص سرمی، بروسلا، تب مالت

مقدمه

بروسلوز یک بیماری عفونی زئونوتیک جهانی شایع بین انسان و حیوان است ودر کشورهای مدیترانه‌ای، خاورمیانه، آمریکای لاتین و آسیایی به‌صورت اندمیک باقی مانده است . در اغلب نقاط ایران نیز این بیماری به صورت اندمیک وجود دارد(۱, ۲). این بیماری در اثر تماس نزدیک فرد با خون، لنف و ترشحات آلوده مخاط حیوان، مصرف فرآورده های حیوانی آلوده به باکتری به ویژه شیر خام و گوشت و به ندرت از طریق استنشاق آئروسل های آلوده ایجاد می شود(۳). با وجود اینکه روشکشت خون به عنوان روش طلایی در تشخیص انواع بروسلوز حاد به شمار می رود ولی در موارد مزمن حساسیت کافی نداشته و زمانبر می باشد(۴). تشخیص صحیح و به موقع بیماری در جلوگیری از مزمن شدن بیماری و انتخاب آنتی بیوتیک مناسب جهت بهبودی کامل بیماری و پیگیری آن بسیار موثر می باشد(۵). تست‌های سرولوژیک کلاسیک عمدتاً بر پایه‌ی شناسایی آنتی بادی‌های ضد لیپوپی ساکاریدی (LPS)می‌باشدکه نتایج مثبت کاذب را به دلیل واکنش متقاطع با LPS سایر باکتری‌های گرم منفی نظیر یرسینیا و اشرشیا کلی افزایش می‌دهد(۶, ۷). پروتئین‌های غشای خارجی (OMPs) در بروسلا ها به دلیل دارا بودن خاصیت آنتی ژنی بالا و ایجاد پاسخ ایمنی، به عنوان گزینه ای مناسبی از آنتی‌ژن‌های تشخیصی در نظر گرفته می‌شوند و می توانند جایگزین مناسبی به جای LPS برای تشخیص‌های سرولوژیکی به منظور کاهش نتایج مثبت کاذب باشند(۸). پروتئین غشایی کیلو دالتونی ۳۱ (OMP 31) در بروسلا ها، علاوه بر اینکه دارای پتانسیل بالایی به عنوان آنتی ژن کاندید واکسن است، همچنین جزو فاکتورهای بیماریزایی مهم گونه بروسلا با ایمونوژنیسیتی بالا نیز می باشد و با دارا بودن اپی توپ‌های B cell وT cell مناسب قادر است هم ایمنی هومورال و هم پاسخ ایمنی T cell ها را به طور قابل توجهی ایجاد کند و میزبان را در برابر عفونت *brucella melitensis* ایمن سازد(۹). بنابراین استفاده ازآنتی بادی-های ضد OMP 31 موجود در نمونه‌های سرم در تشخیص وجود بروسلوز حاد یا مزمن انسانی و حیوانی کاربردی خواهد بود. هدف از این پژوهش ، طراحی و ساخت پروتئین نوترکیب OMP 31 وسنجش میزان واکنش پذیری آنتی ژن OMP 31 با آنتی بادیهای موجود در نمونه های سرم افراد مبتلا به بیماری بروسلوز در مقایسه با افراد سالم جهت معرفی آن به عنوان یک روش تشخیصی بروسلوز در آینده بود.

مواد و روش ها

طراحی و ساخت سازه بیانی rOmp31

قطعه کد کننده ژن Omp31 با استفاده از پرایمرهای ذکرشده در جدول ۱ با استفاده از ژنوم استخراج شده از باکتری بروسلا ملیتنسیس سویه Rev1 تهیه شده از موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی مشهد شعبه شمال شرق تکثیرگردید. جایگاه‌های برشی آنزیم‌های محدودالاثر BamHI و EcoRI در پرایمرها جهت کلونینگ در وکتور بیانی pET-32a به‌گونه‌ای انتخاب شدند که هیچ جایگاه برشی بر روی توالی ژن مربوطه وجود نداشته باشد و همچنین چارچوب خوانش آزاد نیز در هنگام بیان تغییری نکند (شکل ۱ و۲).

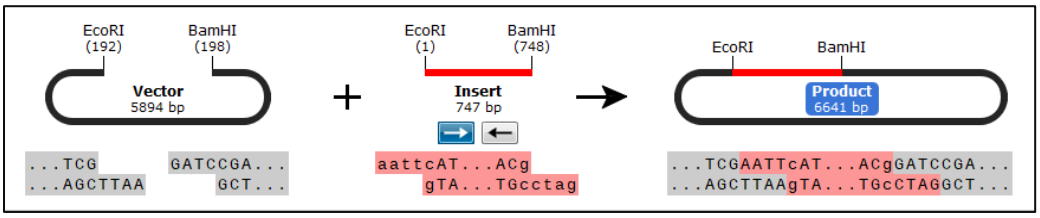
بیان و خالص سازی پروتئین نوترکیب rOmp31

پس از تایید صحت و ماهیت ژن کلون شده، وکتور نوترکیب pET32a-OMP31 به باکتری *E.coli* BL21(DE3) ترانسفرم شد. سویه BL21 حاوی پلازمید نوترکیب PET-OMP31 در ۱ میلی‌لیتر براث LB حاوی ۵۰ µg/ml آمپی‌سیلین با چرخش ۱۵۰ دور در دقیقه در دمای ۳۷° C کشت داده شد. پس از اینکه جذب نوری باکتری کشت داده شده در OD600 به ۰/۴ رسید، با کتریها با غلظت های متفاوتی از IPTG (۰/۲۵ ، ۰/۵، ۰/۷۵و ۱ میکرومولار) و هر غلظت در زمانهای مختلف (۲، ۴، ۶ و ۱۸ ساعت) درون

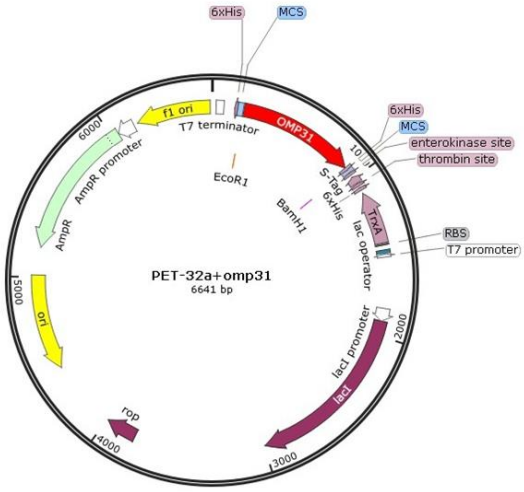
انکوباتور شیکردار القاء شد. بعد از گذشت زمانهای اشاره شده، ۱۰۰ میکرولیتر از هر کشت برداشته‌شده و به مدت ۵ دقیقه و rpm 8000 سانتریفیوژ شد.

میزان بیان پروتئین در غلظت‌های مختلف IPTG و زمان‌های مختلف توسط الکتروفورز بر روی ژل پلی آکریل آمید (SDS-PAGE) بررسی شد.

پروتئین نوترکیب توسط ستون Ni-NTA بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده خالص سازی و در حلال مناسب (گلیسرول ۱۰ درصد، SDS ۰/۱ درصدو تریس ۱ مولار با pH ۶/۸) حل شده و غلظت آن با استفاده از روش برادفورد تعیین شد.



شکل ۱ – کلون کردن قطعه کد کننده ژن omp31 به کمک ناحیه برشی آنزیم های محدودالاثر BamHI و EcoRI و ساخت وکتور بیانی pET32a/omp31



شکل ۲ – نقشه وکتور بیانی pET32a/omp31

تایید بیان پروتئین نوترکیب با استفاده از western blot

پس از الکتروفورزپروتئین روی ژل پلی آکریل آمید الکتروفورز، به غشا نیتروسلولز انتقال داده شد. مرحله بلاکینگ با شیر خشک (Skimmed milk) ۵ درصد شبانه در۴ºC انجام شد و پس از شستشو با TBST (تریس بافر سالین حاوی یک درصد tween 20) با آنتی پلی هیستیدین کونژوگه با HRP با رقت یک به دو هزار به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق اینکوبه شد. پس از شستشوی غشا با TBST ، رنگ آمیزی آن از طریق اینکوبه کردن با DAB (۳و ۳′ -دی آمینو بنزیدین) به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق انجام شد.

جدول ۱: پرایمرهای تکثیر ناحیه کد کننده ژن omp31

توضیح	ریورس	فوروارد	پرایمر
تکثیر ژن **omp31** از ژنوم ***Brucella melitensis***	GGATCCTTAGAACTTGTAGTTCAGACCG	GAATTCATGAAATCCGTAATTTTGGC	Omp31

بررسی واکنش پذیری پروتئین با سرم بیماران

نمونه های سرم انسانی با همکاری بخش عفونی بیمارستان ولیعصر(عج) دانشگاه علوم پزشکی زنجان جمع آوری شد. علائم تب و لرز، تعریق، ضعف، خستگی، سردرد، کسالت، بی اشتهایی، درد در عضلات، مفاصل و/یا پشت و تیتراسیون آنتی بادی برای تست های رایت و 2ME به ترتیب بالای ۱:۸۰ و ۱:۴۰ به عنوان معیار ورود بیماران به مطالعه در نظر گرفته شد. نمونه های سرم سالم از افرادی که سابقه هیچ گونه بیماری تب دار مشابه علائم تب مالت بیماری نداشتند و تیتراسیون آنتی بادی آنها با آزمون رایت و 2ME به ترتیب کمتر از ۱:۸۰ و ۱:۴۰ بود جمع آوری شد.

وسترن بلات با نمونه های سرم افرادسالم و مبتلایان به تب مالت به صورت pooled (از هر گروه ده سرم به شکل مخلوط) انجام شد. پروتئین نوترکیب بر روی ژل ۱۲٪ SDS-PAGE الکتروفورز شد و روی غشای نیتروسلولز منتقل شد. پس ازبلاکینگ غشاء در شیر بدون چربی ۵٪ به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق و شستشو با TBST، غشاها با نمونه های سرم تلفیقی در رقت ۱:۵۰ یک شب در دمای ۱۰ درجه سانتیگراد انکوبه شدند. غشاء با TBST شسته شد، سپس با Rabbit Anti-Human IgG-HRP در رقت ۱:۵۰۰۰ به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق انکوبه شد. پس از شستشو با TBST، غشاء با DAB به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق جهت رنگ آمیزی باندها انکوبه شد.

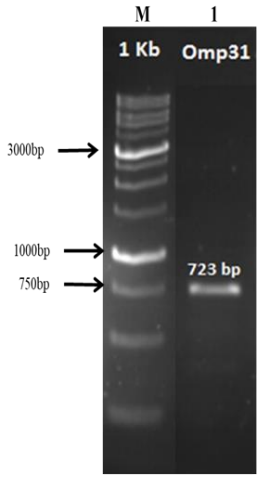
برای آزمایش الایزا، میکروپلیت ۹۶ چاهکی الایزا با ۰/۶ میکروگرم از پروتئین نوترکیب در بافر پوشش (۱۰۰ میکرولیتر کربنات pH= ۹/۶) در هر چاهک یک شبانه در دمای۴ºC اینکوبه شد. سپس چاهک ها سه بار با ۲۰۰ میکرولیتربافر PBST (PBS, pH= 7.2+ Tween 20, 0.05 %) شستشو داده شد. سپس چاه ها با۲۰۰ میکرولیتر بافربلاکینگ (PBS, pH= 7.2+ BSA 1%) به مدت یک ساعت در دمای اتاق اینکوبه شد. پس از شستشو با PBST، چاهک ها با نمونه های سرم رقیق شده به نسبت ۱:۴۰۰ با ۱۰۰ میکرولیتر بافر اینکوباسیون(PBST حاوی نیم درصد BSA) به مدت یک ساعت در دمای اتاق اینکوبه شدند. پس از شستشو با PBST ۱۰۰ میکرولیتر از آنتی IgG و آنتی IgM انسانی کونژوگه با HRP با منشا خرگوش به چاهک ها اضافه شد و به مدت یک ساعت در دمای اتاق اینکوبه شد. پس از شستشوی چاهک ها با PBST رنگ زایی با افزودن ۱۰۰ میکرولیتر از سوبسترای ABST (2, 2′-Azino-bis (3-ethyl benzothiazoline-6-sulfonic acid)) انجام شد.

نتایج

PCR* ژن Omp31 از باکتری *بروسلا ملیتنسیس* و *ساخت سازه بیانی rOmp31

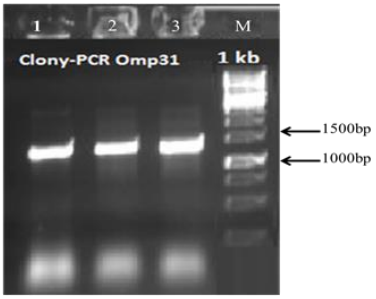
واکنش PCR بر روی ژنوم باکتری بروسلا ملیتنسیس با استفاده از پرایمرهای طراحی‌شده *Omp31 R* و *Omp31 F* انجام شد. و باند ۷۲۳ bp بر روی ژل آگارز مشاهد شد (شکل ۳).

بعد از اتصال قطعه Omp31 به وکتور pET32a مراحل ترانسفورماسیون انجام گرفت و از کلونی‌های رشد کرده بر روی پلیت حاوی آمپی‌سیلین جهت تأیید نهایی استفاده شد. واکنش کلنی PCR با پرایمرهای T7 promoter و T7 terminator انجام گرفت. محصول PCR تکثیر قطعه‌ای به طول ۱۴۷۵ جفت باز را تایید کرد(شکل۴) .



شکل ۱

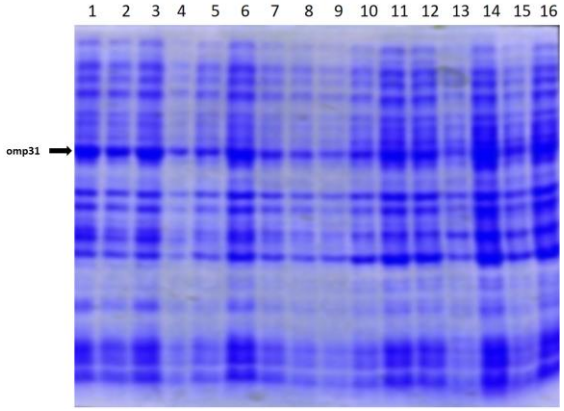
شکل ۳ - تصویر الکتروفورز جهت بررسی تکثیر قطعه Omp31 حاصل از واکنش PCRبا استفاده از پرایمرها Omp31 R/F. چاهکM :مارکر ۱۰Kb، چاهک شماره ۱: قطعه ژن Omp31 به طول ۷۲۳ جفت باز.



شکل ۴ - الکتروفورز محصول Colony PCR جهت تائید ترانسفورم شدن سازه مورد نظر دربـاکتری *E.coli* سویه BL21. چاهک شماره ۱، ۲ و ۳: محصول PCR به طول ۱۴۷۵ جفت باز در کلنی‌های که وکتور نوترکیب pET32a-Omp31 را دریافت کرده‌اند، چاهک M: مارکر۱۰Kb

نتایج بیان و خالص سازی پروتئین نوترکیب rOmp31

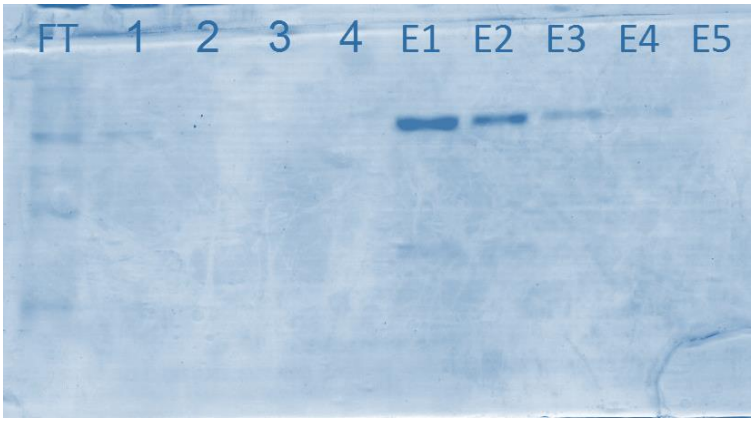
بیان بهینه پروتئین نوترکیب OMP 31 حاوی 6His-Tag در حضور IPTG با غلظت ۰/۲۵ میکرو مولار و ۲ ساعت پس از القاء بود. داده های های الکتروفورز حاصل از رسوب های جمع آوری شده از هر مرحله از القا پس از انجام SDS PAGE در (شکل ۵) دیده می شود.



شکل ۵ : تصویر ژل جهت بررسی میزان القاء بیان ژن در غلظت های مختلفIPTG
چاهک ۱-۴: دو ساعت پس از القا در غلظتهای ۰/۲۵، ۰/۵، ۰/۷۵، ۱ میکرومولار IPTG
چاهک۵-۸: چهار ساعت پس از القا در غلظتهای ۰/۲۵، ۰/۵، ۰/۷۵، ۱ میکرومولار IPTG
چاهک ۹-۱۲: شش ساعت پس از القا در غلظتهای ۰/۲۵، ۰/۵، ۰/۷۵، ۱ میکرومولار IPTG
چاهک۱۳-۱۶: القای Overnight در غلظتهای ۰/۲۵، ۰/۵، ۰/۷۵، ۱ میکرومولار IPTG

نتایج حاصل از تخلیص پروتئین:

پس از اطمینان از بیان پروتئین هدف، به منظور جداسازی و خالص سازی آن از سایر پروتئین های نا خواسته از روش کروماتوگرافی میل ترکیبی استفاده شد.که شکل ۶ مجموع پروتئین های جمع آوری شده از مراحل مختلف تخلیص را نشان می دهد و بیانگر حضور پروتئین خالص شده OMP 31 و عدم حضور سایر پروتئین‌های میزبان است.



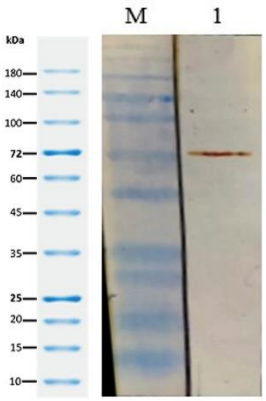
شکل۶ – تصویر ژل SDS-PAGE مربوط به تخلیص پروتئین OMP31 به روش کروماتوگرافی میل ترکیبی: چاهک FT: Flow through . چاهک های ۱-۴ : برداشت های شستشوی ستون. چاهک های E1-E5: محلولهای حاوی پروتئین نوترکیب تخلیص شده.

نتایج تعیین غلظت و تایید پروتئین هدف توسط WESTERN BLOTING:

غلظت پروتئین تخلیص شده با استفاده ازروش بردفورد و توسط دستگاه نانو دراپ محاسبه شد. بر اساس نتایج عددی به دست آمده غلظت پروتئین OMP 31 معادل ۵۴/۳۷ میکرو گرم بر میلی لیتر محاسبه شد.

پس از انتخاب شرایط بهینه بیان پروتئین، وسترن بلات با هدف تایید ماهیت پروتئین بیان شده انجام شد. با توجه به اینکه پروتئین نوترکیب دارای برچسب پلی هیستیدینی بود شناسایی و تشخیص آن با استفاده از آنتی بادی آنتی پلی هیستیدین صورت گرفت و نتایج در شکل ۷ نشان داده شده است.

شکل ۲

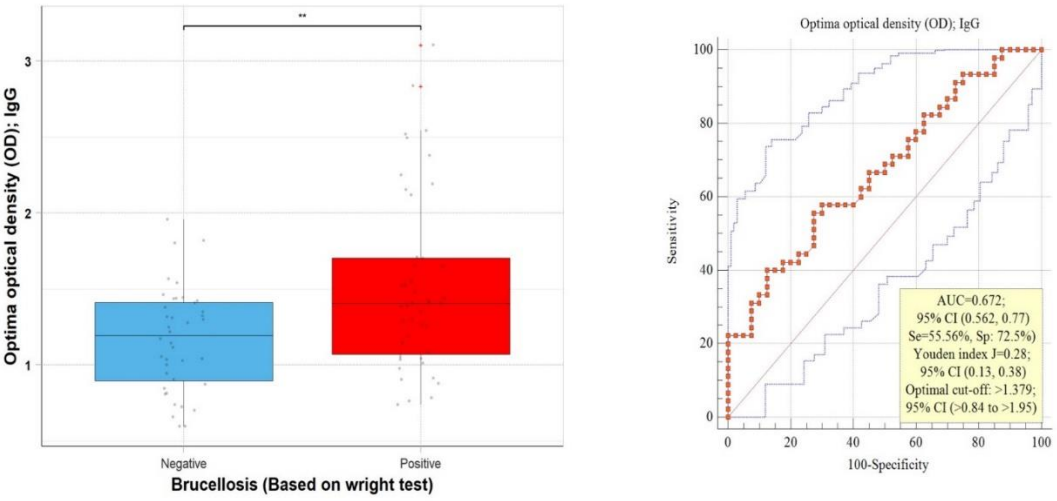


شکل۷ -تأیید بیان پروتئین نوترکیب Omp31 با روش وسترن بلات با رقت 1:2000آنتی بادی Anti His-Tag: چاهک M:مارکر پروتئین ، چاهک ۱ : پروتئین Omp31 تخلیص شده.

نتایج حاصل از الایزا

بررسی واکنش پذیری پروتئین نوترکیب با آنتی بادیهای سرم بیماران و سرم گروه کنترل(IgG و IgM) با استفاده ازدو نوع آنتی بادی Anti human IgG و Anti human IgM صورت گرفت . پس از آزمون الایزا و اندازه گیری جذب نوری نمونه ها داده های حاصل پس از محاسبه میانگین و انحراف معیار در نرم افزارGraphPad Prism مورد بررسی قرار گرفت . با توجه به نتایج بدست آمده که در شکل نشان داده شده است ، در هر دو گروه انتی بادی استفاده شده برای واکنش الایزا، تفاوت معناداری در میزان واکنش پذیری پروتئین نو ترکیب با سرم بیماران در مقایسه با سرم گروه کنترل گزارش شد.

با توجه به داده های حاصل از تفسیر تست الایزا میزان اختصاصیت و حساسیت آزمون صورت گرفته با پروتئین نوترکیب برای آنتی بادیIgG بترتیب ٪ ۷۲/۵ و ٪ ۵۵/۵۶ و برای آنتی بادی IgM ، ٪ ۶۲/۷۹ و ٪۷۲/۷ گزارش شد(نمودار های ۸ و ۹).

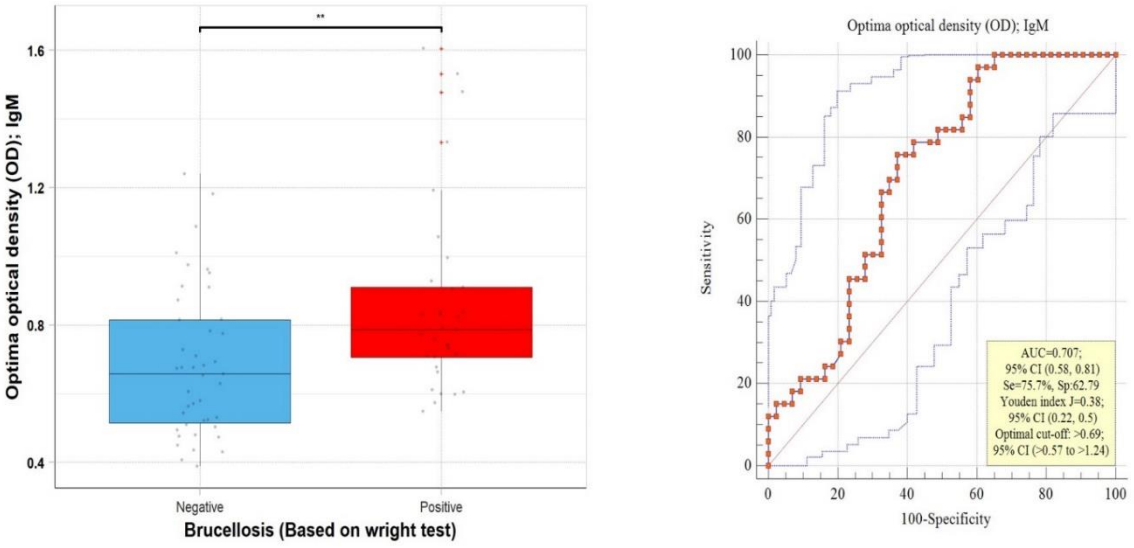


شکل ۸ – آنالیز تست الایزای نمونه های سرمی بیماران بروسلوز و نمونه های کنترل: نتایج الایزای نمونه های بیمار و نمونه های کنترل با cut-off >1.379 و نتایج آنالیز نمودارROC تست الایزا با آنتی بادی IgG جهت تعیین حساسیت و اختصاصیت.

بحث

بروسلوز یک عفونت زئونوتیک جهانی است که تاثیر مخرب اقتصادی در دام و مشکلات سلامت عمومی در کشور-های در حال توسعه ایجاد کرده است(۱۰). گام اساسی در کنترل بیماری تشخیص صحیح و به موقع آن است، که اهمیت یک متد تشخیصی مناسب را آشکار می‌سازد. حساسیت و اختصاصیت متدهای کلاسیک موجود که غالبا بر پایه LPS باکتری می‌باشند، به دلیل ایجاد واکنش متقاطع با سایر باکتری‌های گرم منفی نظیر *Yersinia enterocolitica* و ایجاد نتایج مثبت کاذب ، قابل بحث و انتقاد است. فاکتور اساسی در به کارگیری روش تشخیصی مناسب، درک درست نحوه پاسخ ایمنی به پاتوژن مورد نظر است که در مورد بروسلا آنتی‌بادی‌ها توانسته اند علیه باکتری بروسلا محافظت ایجاد کنند. (۱۱). نقش اساسی B cell ها ترشح سیتوکاین و

آنتی‌بادی است که آنتی‌بادی‌های ضد بروسلا باعث آگلوتیناسیون و ایجاد رسوب در واکنش با آنتی‌ژن همولوگ مشتق شده از باکتری بروسلا می‌شوند. غالب این آنتی‌بادی ها علیه LPS ترشح می‌شوند با این وجود پروتئین‌های آنتی ژنیک دیگری نظیر OMP ها نیز شناسایی شده‌اند (۱۲).



شکل ۹- آنالیز تست الایزای نمونه های سرمی بیماران بروسلوز و نمونه های کنترل: نتایج الایزای نمونه های بیمار و نمونه های کنترل با cut-off > 0.69 و نتایج آنالیز نمودارROC تست الایزا با آنتی بادی IgM جهت تعیین حساسیت و اختصاصیت.

مطالعات پیشین با بررسی پروتئین‌های آنتی‌ژنیک نشان داده اند که OMP 31 از مهمترین پروتئین‌های غشای باکتری بروسلا می‌باشد که نقش مهمی در ایجاد پاسخ ایمنی و همورال علیه باکتری بروسلا ایفا میکند و به عنوان یک آنتی‌ژن ایمونودامیننت در نظر گرفته می‌شود. پژوهش مربوط به ژانگ در سال ۲۰۱۹ ، آنتی‌ژنیک بودن این پروتئین غشایی با بررسی اپی توپ‌های آن مورد بررسی قرار گرفته و به عنوان یک آنتی‌ژن محافظ معرفی شده است (۱۲, ۱۳).

به منظور سنتز پروتئین نوترکیب، پلاسمید نو ترکیب طراحی و سنتز شده، درون باکتری Ecoli BL 21 ترانسفورم شد که با توجه به مطالعات پیشین میزبان بیانی مناسبی است (۱۴) و نوترکیبی آن با کلونی PCR مورد بررسی قرار گرفت و هویت پروتئین با استفاده از وسترن بلاتینگ در محدوده کیلو دالتون۴۱ تایید شد. پس از بیان پروتئین در حجم بالا ، با روش افینیتی کرماتوگرافی تخلیص شد(۱۵). پروتئین نوترکیب تولید شده به صورت اینکلوژن-بادی است بنابراین با استفاده از اوره لیز شد و چون در ساختار خودش دارای his tag است و با استفاده از ستون کروماتوگرافی و با آنتی‌بادی Anti poly histidin به سهولت خالص سازی شد.

به منظور تعیین غلظت پروتئین از دو روش در دسترس استفاده شد. ابتدا با استفاده از نرم افزار Image j غلظت پروتئین ۱۳۰ µg /ml محاسبه شد. در روش دوم با تست برد فورد غلظت پروتئین۵۴ µg/ml تعیین شد (با در نظر گرفتن تداخل ترکیبات حلال پروتئین نظیر SDS در خوانش تست برد فورد). با وجود دو غلظت متفاوت برای پروتئین، به

منظور انتخاب غلظت و مقدار پروتئین مناسب و قابل قبول برای انجام مراحل بعدی آزمایش و با توجه به نتایج سایر مطالعات، که غلظت مشابهی با روش برد فورد داشتند، غلظت ۵۴/۳۷ به عنوان مرجع برای پروتئین OMP 31 در نظر گرفته شد (۱۶, ۱۷).

پروتئین OMP 31 تخلیص شده از نظر واکنش‌پذیری سرولوژیکی مورد ارزیابی قرار گرفت. از آن جهت که الایزا مناسب ترین انتخاب برای تشخیص بروسلوز، مخصوصا زمانی که روش‌های دیگر محدود است و میتواند آنتی‌بادی‌های کلی و اختصاصی بروسلا را آشکار سازد (۱۸) بنابراین در این مطالعه واکنش پذیری پروتئین نوترکیب توسط تست الایزا با نمونه های سرمی بیمار و سالم، و به صورت کمی مورد ارزیابی قرار گرفت (۱۹).

پاسخ بیماران به تست‌های سرولوژیکی، بسته به مراحل مختلف بیماری متفاوت است. در مراحل اولیه بیماری پاسخ غالب ایمنی، آنتی‌بادی IgM است و پاسخ تست‌های بر پایه آگلوتیناسیون آنتی ژن IgM زیاد است. با پیشرفت بیماری و غالب شدن تیتر آنتی‌بادی IgG پاسخ بیشتری نسبت به آنتی‌بادی IgG مشاهده می شود (۲۰).

به منظور ارزیابی نتایج الایزا، آنالیز مربوط به نمودار ROC صورت گرفت. سطح زیر منحنی بالاتر از ۰/۵ برای هر دو آنتی بادی ، از نظر آماری نشان دهنده تفاوت معنادار در میزان واکنش پذیری پروتئین OMP 31 با سرم های بیمار و کنترل می‌باشد. Cut-off بهینه نیز با فاصله اطمینان ٪۹۵ ، بزرگتر از ۱/۳۷۹ به دست آمده است. نتایج حاصل برای آنتی بادی IgG نشان میدهد که اختصاصیت و حساسیت تست الایزای طراحی شده بترتیب٪ ۷۲/۵و ٪۵۵/۵۶ است.یعنی این تست ٪ ۷۲/۵ از افراد بیمار سالم را منفی نشان می دهد و ٪۲۷/۵ مثبت کاذب نشان می‌دهد.

نتایج مربوط به آنتی‌بادی IgM بیانگر این است که اختصاصیت و حساسیت تست انجام شده برای این آنتی‌بادی به ترتیب برابر ٪۶۲/۷۹ و ٪۷۵/۷ است و نقطه Cut- off با فاصله اطمینان ٪۹۵، بالاتر۰/۹۶ تعیین شده است. در مطالعه دهقانی این میزان برای پروتئین هیبرید نوترکیب ٪ ۸۸/۸۹ و ٪ ۸۳/۷۸ به دست آمده است که نشان می‌دهد میزان واکنش‌پذیری پروتئین هیبرید، شامل OMP31 ، OMP25 و OMP21، نسبت به تک پروتئین بیشتر است (۱۶). در مطالعه مشابه، الایزای بر پایه پروتئین نوترکیب OMP 28 انجام گرفت و میزان اختصاصیت و حساسیت به ترتیب٪۹۳/۸ و ٪۸۸/۷ گزارش شد (۲۱).

مونر و همکاران در سال ۲۰۱۵ به منظور بررسی واکنش-پذیری پروتئین‌های OMP باکتری بروسلا،۳ نوع OMP، شامل OMP 31، OMP25 و OMP 28 را کلون بیان کردند و ترکیبی از این ۳ نوع آنتی‌ژن در پلیت الایزا کوت شد. و واکنش‌پذیری آن با ۳ گروه موش شامل، گروه آلوده شده با *B melitetnsis* سویه ۳۳۱ گروه تزریق شده با سویه واکسن و گروه آلوده شده با یرسینیا مورد بررسی قرار گرفت که تست الایزا قادر به افتراق بین ۳ گروه بود و اختصاصیت و حساسیت آن هر دو ٪۱۰۰ بود (۱۵) که بیانگر این است که استفاده از ترکیب چند آنتی‌ژن قادر به شناسایی حساس آنتی‌بادی است در حالی که حساسیت کمتر در تست‌های مربوط به آنتی‌ژن واحد، مثل OMP 28 (٪۸۸/۷) (۲۱) و OMP31 (٪ ۸/ ۸۱) همچنان به عنوان چالش مطرح است . که در این آزمایش آنتی ژن نوترکیب OMP 31 با سرم بز و گوسفند مورد بررسی قرار گرفت که نسبت به مطالعه ما حساس‌تر بوده است (۱۵).

در مطالعه دیگری میزان اختصاصیت و حساسیت برایIgG به ترتیب ۵۸/۹ و ٪۷۳/۷ و برای IgM، ۶۷/۸ و ٪۷۲/۲ گزارش شده است که نشان می هد تست برای هر دو آنتی‌بادی ، حساسیت لازم را دارد . با توجه به نتایج الایزای طراحی شده در این پروژه نسبت به IgG اختصاصیت بیشتری دارد. در حالی که برای IgM حساسیت بیشتری

نشان می‌دهد. که می‌تواند مربوط به فاز بیماری بروسلوز باشد (۲۰) .

با بررسی سوابق بیماران مشاهده می‌شود که اکثر آن‌ها در اولین مواجه با بروسلوز به بیمارستان مراجعه کرده اند بنابراین بیماری آن‌ها به صورت مزمن نیست و احتمال حضور آنتی بادی IgM در سرم بالاتر است. ودر نتیجه میزان واکنش‌پذیری بیشتری نیز با سرم خواهد داشت .

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج به دست آمده پروتئین OMP 31 طراحی شده، واکنش پذیری قابل قبولی با نمونه‌های سرمی کلینیکی داشته و توانایی افتراق بین نمونه‌های سرمی مبتلا به بروسلوز و نمونه‌های سالم را دارا می‌باشد.

تعارض منافع

نویسندگان مقاله، تعارض در منافع ندارند.

فهرست منابع

1. Yousefi S, Abbassi-Daloii T, Tahmoorespour M, Sekhavati MH. Nanoparticle or conventional adjuvants: which one improves immune response against Brucellosis? %J Iranian Journal of Basic Medical Sciences. 2019;22(4):360-6.

2. Golshani M, Buozari S. A review of Brucellosis in Iran: Epidemiology, Risk Factors, Diagnosis, Control, and Prevention. Iran Biomed J. 2017;21(6):349-59.

3. Naseri ZM, Alikhani MYP, Hashemi SHM, Kamarehei F, Arabestani MRP. Prevalence of the Most Common Virulence-Associated Genes among Brucella Melitensis Isolates from Human Blood Cultures in Hamadan Province, West of Iran. Iranian journal of medical sciences. 2016;41(5):422-9.

4. Avila-Calderon ED, Lopez-Merino A, Sriranganathan N, Boyle SM, Contreras-Rodriguez A. A history of the development of Brucella vaccines. Biomed Res Int. 2013;2013:743509.

5. Shi D, Chen Y, Chen M, Zhou T, Xu F, Zhang C, et al. Bioinformatics analysis of Omp19 and Omp25 proteins for designing multi-epitope vaccines against Brucella. Medicine. 2023;102(11):e3.۳۱۸۲

6. Cassataro J, Pasquevich K, Bruno L, Wallach JC, Fossati CA, Baldi PC. Antibody reactivity to Omp31 from Brucella melitensis in human and animal infections by smooth and rough Brucellae. Clin Diagn Lab Immunol. 2004;11(1):111-4.

7. Baldi PC, Miguel SE, Fossati CA, Wallach JC. Serological follow-up of human brucellosis by measuring IgG antibodies to lipopolysaccharide and cytoplasmic proteins of Brucella species. Clin Infect Dis. 1996;22(3):446-55.

8. Ahmed IM, Khairani-Bejo S, Hassan L, Bahaman AR ,Omar AR. Serological diagnostic potential of recombinant outer membrane proteins (rOMPs) from Brucella melitensis in mouse model using indirect enzyme-linked immunosorbent assay. BMC Vet Res. 2015;11:275.

9. Zhang F, Li Z, Jia B, Zhu Y, Pang P, Zhang C, et al. The Immunogenicity of OMP31 Peptides and Its Protection Against Brucella melitensis Infection in Mice. Sci Rep. 2019;9(1):3512.

10. Hisham Y, Ashhab Y. Identification of Cross-Protective Potential Antigens against Pathogenic Brucella spp. through Combining Pan-Genome Analysis with Reverse Vaccinology. J Immunol Res. 2018;2018(1):1474517.

11. Tian M, Song M, Yin Y, Lian Z, Li Z, Hu H, et al. Characterization of the main immunogenic proteins in Brucella infection for their application in diagnosis of brucellosis. Comparative Immunology,

Microbiology and Infectious Diseases. 2020;70:101462.

12. Jezi FM, Razavi S, Mirnejad R, Zamani K. Immunogenic and protective antigens of Brucella as vaccine candidates. Comparative immunology, microbiology and infectious diseases. 2019;65:29-36.

13. Zhang F, Li Z, Jia B, Zhu Y, Pang P, Zhang C, et al. The immunogenicity of OMP31 peptides and its protection against Brucella melitensis infection in mice. Scientific Reports. 2019;9(1):1-7.

14. Dumon-Seignovert L, Cariot G, Vuillard L. The toxicity of recombinant proteins in Escherichia coli: a comparison of overexpression in BL21 (DE3), C41 (DE3), and C43 (DE3). Protein expression and purification. 2004;37(1):203-6.

15. Gupta V, Verma D, Singh S, Vihan V. Serological diagnostic potential of recombinant outer membrane protein (Omp31) from Brucella melitensis in goat and sheep brucellosis. Small Ruminant Research. 2007;70(2-3):260-6.

16. Dehghani S, Sabzehei F, Taromchi AH, Mobaien AR, Arsang-Jang S. Hybrid recombinant Omp 22, 25, and 31 immunodominant epitopes can be used for serodiagnosis of brucellosis. Journal of Immunological Methods. 2021;497:113123.

17. Shirdast H, Ebrahimzadeh F, Taromchi AH, Mortazavi Y, Esmaeilzadeh A, Sekhavati MH, et al. Recombinant Lactococcus Lactis displaying Omp31 antigen of brucella melitensis can induce an immunogenic response in BALB/c mice. Probiotics and Antimicrobial Proteins. 2021;13(1):80-9.

18. Yin D, Li L, Song X, Li H, Wang J, Ju W, et al. A novel multi-epitope recombined protein for diagnosis of human brucellosis. BMC infectious diseases. 2016;16(1):1-8.

19. Tiwari S, Kumar A, Thavaselvam D, Mangalgi S, Rathod V, Prakash A, et al. Development and comparative evaluation of a plate enzyme-linked immunosorbent assay based on recombinant outer membrane antigens Omp28 and Omp31 for diagnosis of human brucellosis. Clinical and Vaccine Immunology. 2013;20(8):1217-22.

20. Özdemir M, Feyzioğlu B, Kurtoğlu MG, Doğan M, Dağı HT, Yüksekkaya Ş, et al. A comparison of immuncapture agglutination and ELISA methods in serological diagnosis of brucellosis. International Journal of Medical Sciences. 2011;8(5):428.

21. Chaudhuri P, Prasad R, Kumar V, Gangaplara A. Recombinant OMP28 antigen-based indirect ELISA for serodiagnosis of bovine brucellosis. Molecular and cellular probes. 2010;24(3):142-5.

Journal of Plasma & Biomarkers
Volume18 , Issue 2, Number 70, Pages 27-38
sanad.iau.ir/journal/qjaphd **ISSN: 9880-1735**

Investigation of the seroreactivity of Brucella-infected patients with the recombinant OMP 31 antigen using the ELISA diagnostic method.

Amirhossein Taromchi [1], Zahra Taghipour[2], Faezeh Sabzehei[3], Saeed Kaboli[4]

1- Associate Professor, Department of Medical Biotechnology, Faculty of Medicine, Zanjan University of Medical Sciences. Corresponding Author: taromchi@zums.ac.ir
2- Master's student, Department of Medical Biotechnology, Faculty of Medicine, Zanjan University of Medical Sciences
3- PhD, Faculty of Medicine, Zanjan University of Medical Sciences.
4- Assistant Professor, Department of Medical Biotechnology, Faculty of Medicine, Zanjan University of Medical Sciences.

Received:2025.03.17 **Accepted: 2025.05.15**

Abstract

Background & Aim: Brucellosis or Malta fever is a zoonotic bacterial infection with a global distribution caused by Brucella species. The hallmark symptoms of this disease include fever in humans and abortion in infected animals. The essential step in controlling this disease is correct and timely identification; therefore, the development of effective diagnostic methods is important. In this study, an ELISA test based on recombinant protein OMP 31 was used, which, based on previous research, is an immunogenic protein with the ability to stimulate an immune response and produce appropriate antibodies. The aim of this project is to investigate the reactivity of this protein with IgG and IgM antibodies present in the serum of patients.

Materials and Methods: The designed gene cassette was cloned in the pET-28a vector and transferred into a bacterial expression host. After confirming the nature of the protein, an appropriate volume of it was expressed and purified by affinity chromatography. After determining the concentration, the antigen was coated on an ELISA plate and its reactivity with patient serum and control serum was examined, and the sensitivity and specificity for both IgM and IgG antibodies were evaluated by ROC analysis.

Results: After expression of the recombinant protein, its identity was confirmed by Western blot and its concentration was estimated at 54.37 µg/ml by Bradford test, and a suitable reaction with the tested sera was reported, with a sensitivity and specificity of 56.56 and 72.5% for IgG; and 75.7% and 62.79 for IgM.

Conclusion: The produced recombinant protein was able to react with patient serum, and a significant difference in its reactivity with the patient group and the control group was observed.

Keywords: Omp31, Brucellosis, Serodiagnosis, ELISA .

.