

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 می شود. علائم بارز این بیماری شامل تب در انسان و سقط در حیوانات آلوده می باشد. گام اساسی در کنترل این بیماری، شناسایی صحیح و به موقع است؛ بنابر این توسعه روش های 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 آنتی بادی مناسب می باشد. هدف از این تحقیق بررسی میزان واکنش پذیری این پروتئین با آنتی بادی های IgM و IgG موجود در سرم بیماران است.

مواد و روشها: کاست ژنی طراحی شده 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 آنتی بادی 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 بردفور ۵۴/۳۷ 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 ۷۲/۵۶٪ 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

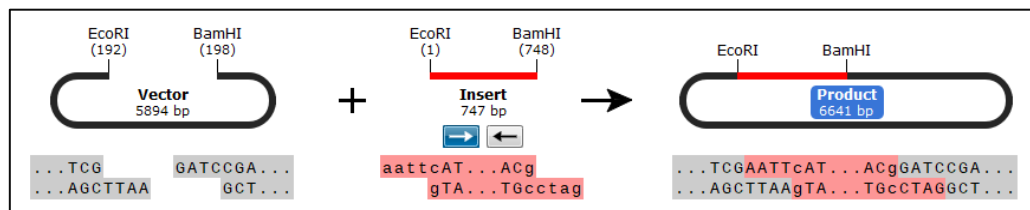
واکسن است، همچنین جزو فاکتورهای بیماریزایی مهم گونه بروسلا با ایمونونسیستی بالا نیز می باشد و با دارا بودن اپی توپهای B cell و T cell مناسب قادر است هم ایمنی همورال و هم پاسخ ایمنی T cell ها را به طور قابل توجهی ایجاد کند و میزبان را در برابر عفونت *brucella melitensis* ایمن سازد (۹). بنابراین استفاده از آنتی بادی های ضد OMP 31 موجود در نمونه های سرم در تشخیص وجود بروسلوز حاد یا مزمن انسانی و حیوانی کاربردی خواهد بود. هدف از این پژوهش، طراحی و ساخت پروتئین نو ترکیب OMP 31 و سنجش 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 ذکر شده در جدول ۱ با استفاده از ژنوم استخراج شده از باکتری بروسلا ملیتنسیس سویه Rev1 تهیه شده از موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی مشهد شعبه شمال شرق تکثیر گردید. جایگاه های برشی آنزیم های محدودالانر BamHI و EcoRI در پرایمرها جهت کلونینگ در وکتور بیانی pET-32a به گونه ای 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 و ۲).

بروسلوز یک بیماری عفونی زئونوتیک جهانی شایع بین انسان و حیوان است و در کشورهای مدیترانه ای، خاورمیانه، آمریکای لاتین و آسیای به صورت 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 آئروسول 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). تست های سرولوژیک کلاسیک عمدتاً بر پایه شناسایی آنتی بادی های ضد لیپوپلی ساکاریدی (LPS) می باشد که نتایج مثبت کاذب را به دلیل واکنش متقاطع با LPS سایر باکتری های گرم منفی نظیر یرسینیا و اشرشیا کلی افزایش می دهد (۶، ۷). پروتئین های غشای خارجی (OMPs) در بروسلا ها به دلیل دارا بودن خاصیت آنتی ژنی بالا و ایجاد پاسخ ایمنی، به عنوان گزینه ای مناسبی از آنتی ژن های تشخیصی در نظر گرفته می شوند و می توانند جایگزین مناسبی به جای LPS برای تشخیص های 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

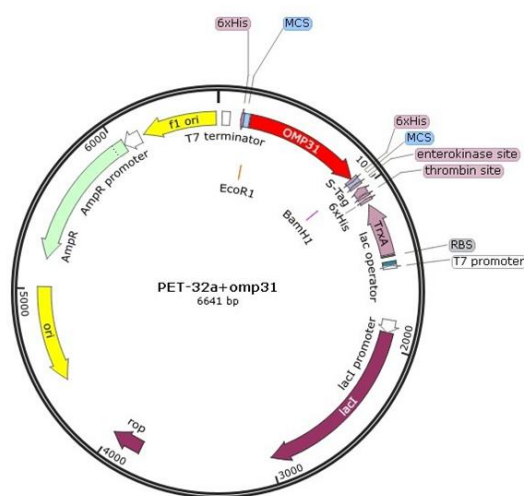


شکل ۱ - کلون کردن قطعه کد کننده ژن omp31 به کمک ناحیه برشی آنزیم های محدودالانر BamHI و EcoRI و ساخت وکتور بیانی pET32a/omp31

۱۰۰ میکرولیتر از هر کشت برداشته شده و به مدت ۵ دقیقه و 8000 rpm 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 درصد و تریس ۱ مولار با pH ۶/۸) حل شده و غلظت آن با استفاده از روش برادفورد تعیین شد.

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 میلی لیتر برات LB حاوی ۵۰ $\mu\text{g/ml}$ آمپی سیلین با چرخش ۱۵۰ دور در دقیقه در دمای 37°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، ۰/۷۵ و 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،



شکل ۲ - نقشه وکتور بیانی pET32a/omp31

بافر سالین حاوی یک درصد 20 tween) با آنتی پلی هیسیتیدین 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 (۳ و ۳- دی آمینو بنزیدین) به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق انجام شد.

تایید بیان پروتئین نوترکیب با استفاده از western blot

پس از الکتروفورز پروتئین روی ژل پلی آکریل آمید الکتروفورز، به غشا نیتروسلولز انتقال داده شد. مرحله بلاکینگ با شیر خشک (Skimmed milk) ۵ درصد شبانه در 4°C انجام شد و پس از شستشو با TBST (تریس

جدول ۱: پرایمرهای تکثیر ناحیه کد کننده ژن omp31

توضیح	ریورس	فوروارد	پرایمر
تکثیر ژن omp31 از ژنوم <i>Brucella melitensis</i>	GGATCCTTAGAACTTGTA GTTCAGACCG	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 اشتها، 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.

وستر بلات با نمونه های سرم افراد سالم و مبتلایان به تب مالت به صورت pooled (از هر گروه ده سرم به شکل مخلوط) انجام شد. پروتئین نو ترکیب بر روی ژل ۱۲٪ SDS-PAGE الکتروفورز شد و روی غشای نیتروسولوز منتقل شد. پس از بلاکینگ 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 نو ترکیب در بافر پوشش (۱۰۰ میکرولیتر کربنات ۹/۶ pH) در هر چاهک یک شبانه در دمای ۴°C انکوبه شد. سپس چاهک ها سه بار با ۲۰۰

میکرولیتر بافر PBST (PBS, pH= 7.2+ Tween 20,) شستشو داده شد. سپس چاه ها با ۲۰۰ میکرولیتر بافر بلاکینگ (PBS, pH= 7.2+ BSA 1%) به مدت یک ساعت در دمای اتاق انکوبه 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 انکوبه 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 انکوبه شد. پس از شستشوی چاهک ها با PBST رنگ زایی با افزودن ۱۰۰ میکرولیتر از سوبسترای (2, 2'-Azino-bis ABST (3-ethyl benzothiazoline-6-sulfonic acid)) انجام شد.

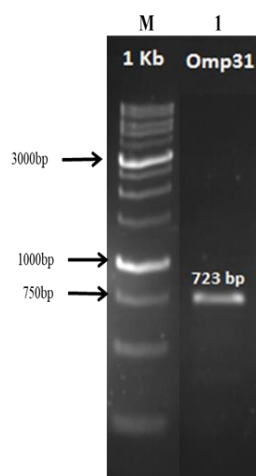
نتایج

PCR ژن Omp31 از باکتری بروسلا ملیتسنسیس و

ساخت سازه بیانی rOmp31

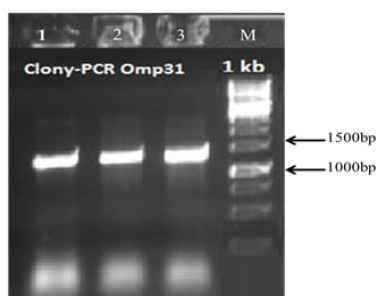
واکنش PCR بر روی ژنوم باکتری بروسلا ملیتسنسیس با استفاده از پرایمرهای طراحی شده Omp31 R و Omp31 F انجام شد. و باند ۷۲۳ bp بر روی ژل آگارز مشاهده شد (شکل ۳).

بعد از اتصال قطعه Omp31 به وکتور pET32a مراحل ترانسفورماسیون انجام گرفت و از کلونی های رشد کرده بر روی پلیت حاوی آمپی سیلین جهت تأیید نهایی استفاده شد. واکنش کلنی PCR با پرایمرهای T7 promoter و T7 terminator انجام گرفت. محصول PCR تکثیر قطعه ای به طول ۱۴۷۵ جفت باز را تأیید کرد (شکل ۴).



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

شکل ۱

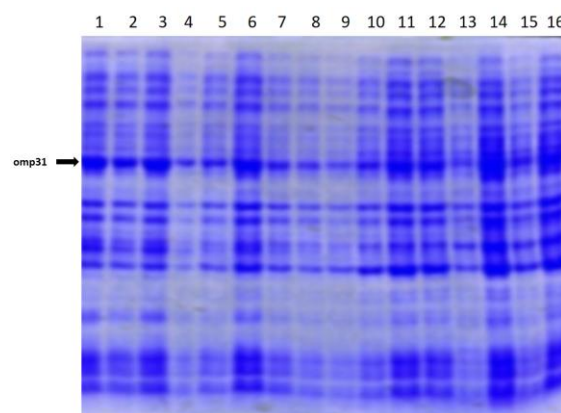


شکل ۴ - الکتروفورز محصول Colony PCR جهت تأیید ترانسفورم شدن سازه مورد نظر در باکتری *E.coli* سویه BL21. چاهک شماره ۱، ۲ و ۳: محصول PCR به طول ۱۴۷۵ جفت باز در کلنی‌های که وکتور نوترکیب pET32a-Omp31 را دریافت کرده‌اند، چاهک M: مارکر ۱۰Kb

پس از القاء بود. داده‌های الکتروفورز حاصل از رسوب‌های جمع‌آوری شده از هر مرحله از القا پس از انجام SDS PAGE در (شکل ۵) دیده می‌شود.

نتایج بیان و خالص‌سازی پروتئین نوترکیب rOmp31

بیان بهینه پروتئین نوترکیب OMP 31 حاوی 6His-Tag در حضور IPTG با غلظت ۰/۲۵ میکرومولار و ۲ ساعت

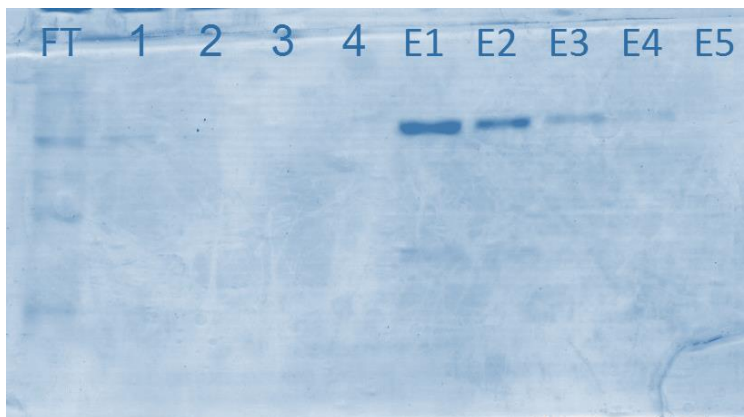


شکل ۵: تصویر ژل جهت بررسی میزان القاء بیان ژن در غلظت‌های مختلف IPTG چاهک ۱-۴: دو ساعت پس از القا در غلظت‌های ۰/۲۵، ۰/۵، ۱۰/۷۵ میکرومولار IPTG چاهک ۵-۸: چهار ساعت پس از القا در غلظت‌های ۰/۲۵، ۰/۵، ۱۰/۷۵ میکرومولار IPTG چاهک ۹-۱۲: شش ساعت پس از القا در غلظت‌های ۰/۲۵، ۰/۵، ۱۰/۷۵ میکرومولار IPTG چاهک ۱۳-۱۶: القای Overnight در غلظت‌های ۰/۲۵، ۰/۵، ۱۰/۷۵ میکرومولار IPTG

نتایج حاصل از تخلیص پروتئین:

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 پروتئین های میزبان است.

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



شکل ۶ - 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 نو ترکیب تخلیص شده.

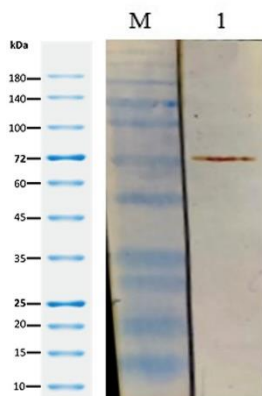
نتایج تعیین غلظت و تایید پروتئین هدف توسط

WESTERN BLOTING:

پس از انتخاب شرایط بهینه بیان پروتئین، وسترن بلات با هدف تایید ماهیت پروتئین بیان شده انجام شد. با توجه به اینکه پروتئین نو ترکیب دارای برجسب 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.

غلظت پروتئین تخلیص شده با استفاده از روش 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.

شکل ۲



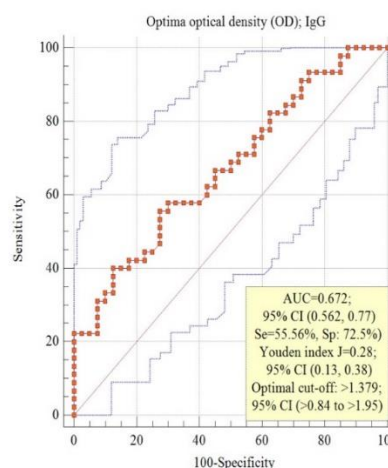
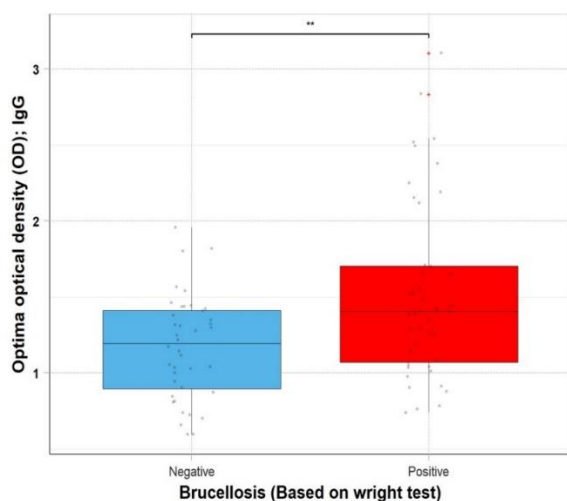
شکل ۷ - تایید بیان پروتئین نو ترکیب Omp31 با روش وسترن بلات با رقت 1:2000 آنتی بادی Anti His-Tag: چاهک M: مارکر پروتئین، چاهک ۱: پروتئین Omp31 تخلیص شده.

نتایج حاصل از الایزا

بررسی واکنش پذیری پروتئین نو ترکیب با آنتی بادیهای سرم بیماران و سرم گروه کنترل (IgM و IgG) با استفاده از دو نوع آنتی بادی Anti human و Anti human IgG صورت گرفت. پس از آزمون الایزا و اندازه گیری جذب IgM صورت گرفته. داده های حاصل پس از محاسبه میانگین و انحراف معیار در نرم افزار GraphPad Prism مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به نتایج بدست آمده که در شکل نشان داده شده است، در هر دو گروه آنتی 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 نو ترکیب برای آنتی بادی IgG بترتیب ۷۲/۵٪ و ۵۵/۵۶٪ و برای آنتی بادی IgM، ۶۲/۷۹٪ و ۷۲/۷٪ گزارش شد (نمودارهای 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 نمودار ROC تست الایزا با آنتی بادی IgG جهت تعیین حساسیت و اختصاصیت.

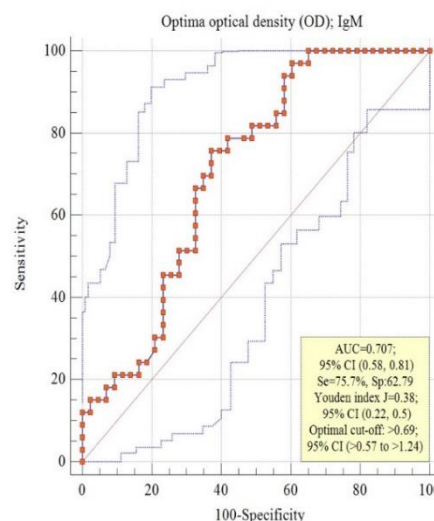
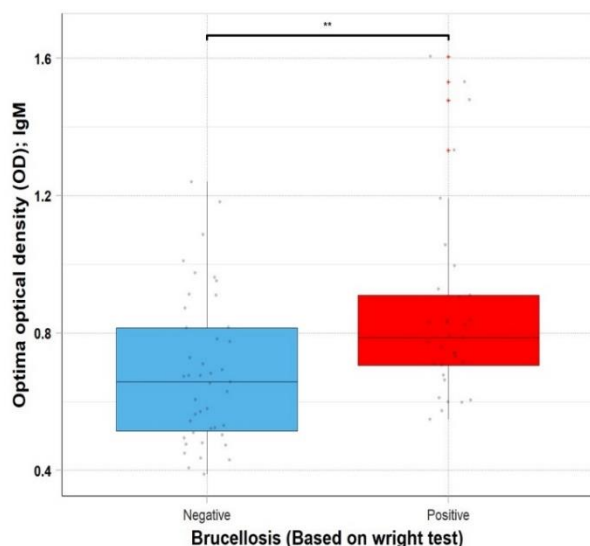
بحث

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 می سازد. حساسیت و اختصاصیت متدهای کلاسیک موجود که غالبا بر پایه LPS

باکتری می باشند، به دلیل ایجاد واکنش متقاطع با سایر باکتری های 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 آنتی بادی ها توانسته اند علیه باکتری بروسلا محافظت ایجاد کنند. (۱۱). نقش اساسی B cell ها ترشح سیتوکاین و

آنتی بادی است که آنتی بادی های ضد بروسلا باعث آگلوتیناسیون و ایجاد رسوب در واکنش با آنتی ژن همولوگ مشتق شده از باکتری بروسلا می شوند. غالب این آنتی بادی ها

علیه LPS ترشح می شوند با این وجود پروتئین های آنتی ژنیک دیگری نظیر OMP ها نیز شناسایی شده اند (۱۲).



شکل ۹- آنالیز تست الایزای نمونه های سرمی بیماران بروسلاز و نمونه های کنترل: نتایج الایزای نمونه های بیمار و نمونه های کنترل با $\text{cut-off} > 0.69$ و نتایج آنالیز نمودار ROC تست الایزای با آنتی بادی IgM جهت تعیین حساسیت و اختصاصیت.

بلا تینگ در محدوده کیلو دالتون ۴۱ تایید شد. پس از بیان پروتئین در حجم بالا، با روش افینیتی کروماتوگرافی تخلیص شد (۱۵). پروتئین نو ترکیب تولید شده به صورت اینکلوزن- 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 آنتی بادی 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 $\mu\text{g/ml}$ محاسبه شد. در روش دوم با تست برد فورد غلظت پروتئین ۵۴ $\mu\text{g/ml}$ 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

مطالعات پیشین با بررسی پروتئین های آنتی ژنیک نشان داده اند که OMP 31 از مهمترین پروتئین های غشای باکتری بروسلا می باشد که نقش مهمی در ایجاد پاسخ ایمنی و همورال علیه باکتری بروسلا ایفا میکند و به عنوان یک آنتی ژن ایمونودامیننت در نظر گرفته می شود. پژوهش مربوط به ژانگ در سال ۲۰۱۹، آنتی ژنیک بودن این پروتئین غشایی با بررسی اپی توپ های آن مورد بررسی قرار گرفته و به عنوان یک آنتی ژن محافظ معرفی شده است (۱۲، ۱۳).

به منظور سنتز پروتئین نو ترکیب، 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 نو ترکیبی آن با کلونی PCR مورد بررسی قرار گرفت و هویت پروتئین با استفاده از وسترن

به ترتیب برابر ۶۲/۷۹٪ و ۷۵/۷٪ است و نقطه Cut-off با فاصله اطمینان ۹۵٪، بالاتر از ۰/۹۶ تعیین شده است. در مطالعه دهقانی این میزان برای پروتئین هیبرید نو ترکیب 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، الیزای بر پایه پروتئین نو ترکیب 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، نوع OMP، شامل OMP 31، OMP 25 و OMP 28 را کلون بیان کردند و ترکیبی از این ۳ نوع آنتی‌ژن در پلیت الیزا کوت شد. واکنش‌پذیری آن با ۳ گروه موش شامل، گروه آلوده شده با *B melitensis* سویه ۳۳۱ گروه تزریق شده با سویه واکسن و گروه آلوده شده با یرسینیا مورد بررسی قرار گرفت که تست الیزا 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 (۸۱/۸٪) همچنان به عنوان چالش مطرح است. که در این آزمایش آنتی ژن نو ترکیب 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 برای IgG به ترتیب ۵۸/۹ و ۷۳/۷٪ و برای IgM، ۶۷/۸ و ۷۲/۲٪ گزارش شده است که نشان می‌دهد تست برای هر دو آنتی‌بادی، حساسیت لازم را دارد. با توجه به نتایج الیزای طراحی شده در این پروژه نسبت به IgG اختصاصیت بیشتری دارد. در حالی که برای IgM حساسیت بیشتری

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 الیزا مناسب ترین انتخاب برای تشخیص بروسلاز، مخصوصا زمانی که روش‌های دیگر محدود است و میتواند آنتی‌بادی‌های کلی و اختصاصی بروسلا را آشکار سازد (۱۸) بنابراین در این مطالعه واکنش‌پذیری پروتئین نو ترکیب توسط تست الیزا با نمونه‌های 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 تیتراژ آنتی‌بادی IgG پاسخ بیشتری نسبت به آنتی‌بادی IgG مشاهده می‌شود (۲۰).

به منظور ارزیابی نتایج الیزا، آنالیز مربوط به نمودار ROC صورت گرفت. سطح زیر منحنی بالاتر از ۰/۵ برای هر دو آنتی‌بادی، از نظر آماری نشان دهنده تفاوت معنادار در میزان واکنش‌پذیری پروتئین OMP 31 با سرم‌های بیمار و کنترل می‌باشد. Cut-off بهینه نیز با فاصله اطمینان ۹۵٪، بزرگتر از ۱/۳۷۹ به دست آمده است. نتایج حاصل برای آنتی‌بادی IgG نشان می‌دهد که اختصاصیت و حساسیت تست الیزای طراحی شده به ترتیب ۷۲/۵٪ و ۵۵/۵۶٪ است. یعنی این تست ۷۲/۵٪ از افراد بیمار سالم را منفی نشان می‌دهد 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

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-Dalooi 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):e3۳۱۸۲.
6. Cassataro J, Pasquevich K, Bruno L, Wallach JC, Fossati CA, Baldi PC. Antibody reactivity to Omp31 from Brucella melitensis

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

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

نتیجه‌گیری

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, Taramchi 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, Taramchi 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 recombinant 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, Yüksekaya 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, Gangaplar A. Recombinant OMP28 antigen-based indirect ELISA for serodiagnosis of bovine brucellosis. Molecular and cellular probes. 2010;24(3):142-5.



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

Amirhossein Taromchi¹, Zahra Taghipour², Faezeh Sabzei³, Saeed Kaboli⁴

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 .