

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

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

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.

زمینه و هدف: بروسلاز 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 پروژه بررسی میزان واکنش پذیری این پروتئین با آنتی‌بادی‌های IgG و IgM موجود در سرم بیماران است.

مواد و روشها: کاست ژنی طراحی شده در وکتور *pET-28a* کلون شد و به درون میزبان بیانی باکتریایی انتقال داده شد. پس از تایید ماهیت پروتئین، حجم مناسبی از آن بیان و توسط کروماتوگرافی میل ترکیبی خالص سازی شد. و 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 و حساسیت و دقت برای هر دو نوع آنتی‌بادی IgG و IgM توسط آنالیز ROC ارزیابی شد.

نتایج: پس از بیان پروتئین نوترکیب هویت آن توسط وسترن بلات تایید شده و غلظت آن توسط تست بردفور ۵۴/۳۷ میکروگرم بر میلی لیتر تخمین زده شد و واکنش مناسبی با سرم های مورد آزمایش، با میزان حساسیت و اختصاصیت ۵۶/۵۶ و ۷۲/۵٪ برای IgG؛ و ۷۵/۷٪ و ۶۲/۷۹٪ برای IgM گزارش شد.

نتیجه گیری: پروتئین نوترکیب تولید شده، قادر به واکنش با سرم بیماران بود 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

Abstract:

Background and Objective: 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

مقدمه:

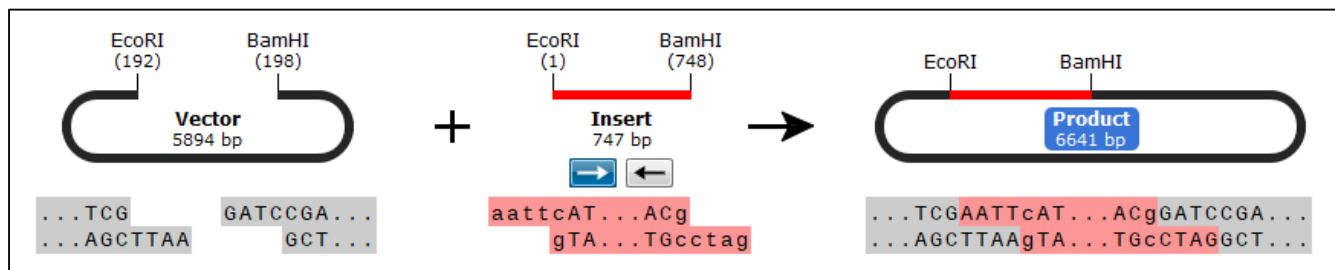
بروسلوز یک بیماری عفونی زئونوتیک جهانی شایع بین انسان و حیوان است و در کشورهای مدیترانه‌ای، خاورمیانه، آمریکای لاتین و آسیایی به صورت اندمیک باقی مانده است. در اغلب نقاط ایران نیز این بیماری به صورت اندمیک وجود دارد (۱، ۲). این بیماری در اثر تماس نزدیک فرد با خون، لثه و ترشحات آلوده مخاط حیوان، مصرف فرآورده‌های حیوانی آلوده به باکتری به ویژه شیر خام و گوشت و به ندرت از طریق استنشاق آئروسول‌های آلوده ایجاد می‌شود (۳). با وجود اینکه روش‌کشت خون به عنوان روش طلایی در تشخیص انواع بروسلوز حاد به شمار می‌رود ولی در موارد مزمن حساسیت کافی نداشته و زمان‌بر می‌باشد (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 می‌باشد (۵). تست‌های سرولوژیک کلاسیک عمدتاً بر پایه‌ی شناسایی آنتی بادی‌های ضد LPS می‌باشد که نتایج مثبت کاذب را به دلیل واکنش متقاطع با LPS سایر باکتری‌ها گرم منفی نظیر یرسینیا و اشرشیا کلی افزایش می‌دهد (۶، ۷). پروتئین‌های غشای خارجی (OMPs) در بروسلا‌ها به دلیل دارا بودن خاصیت آنتی ژنیک بالایی و ایجاد پاسخ ایمنی، به عنوان گزینه‌ای مناسبی از آنتی‌ژن‌های تشخیصی در نظر گرفته می‌شوند و می‌توانند جایگزین مناسبی به جای LPS برای تشخیص‌های سرولوژیکی به منظور کاهش نتایج مثبت کاذب باشند (۸). پروتئین غشایی ۳۱ kd (OMP 31) در بروسلا‌ها، علاوه بر اینکه دارای پتانسیل بالایی به عنوان آنتی ژن کاندید واکسن هستند، همچنین جزو فاکتورهای ویروالانس مهم گونه بروسلا با ایمونوژنیسیته بالایی نیز می‌باشند و با دارا بودن اپی توپ‌های B cell و T cell 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 آنتی بادی‌های ضد OMP 31 موجود در نمونه‌های سرم برای تشخیص وجود بروسلوز حاد یا مزمن انسانی و حیوانی کاربردی خواهد بود. هدف این پروژه‌ی تحقیقاتی، طراحی و ساخت پروتئین نو ترکیب OMP 31 و سنجش میزان واکنش پذیری آنتی ژن OMP 31 با آنتی بادی‌های موجود در نمونه‌های سرم افراد مبتلا به بیماری بروسلوز در مقایسه با افراد سالم می‌باشد تا در صورت مطلوب بودن نتایج به عنوان یک تست تشخیصی در نظر گرفته شود.

مواد و روش‌ها:

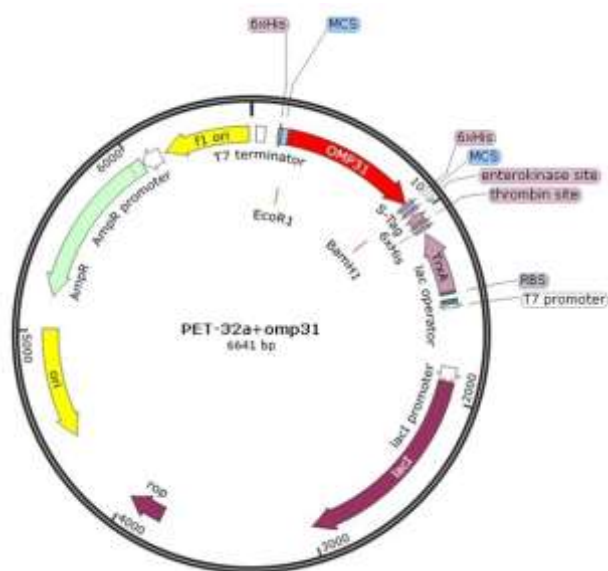
طراحی و ساخت سازه بیانی rOmp31

قطعه کد کننده ژن Omp31 با استفاده از پرایمرهای ذکر شده در جدول ۱ با استفاده از ژنوم استخراج شده از باکتری بروسلا ملیتسنسیس سویه Rev1 تهیه شده از موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی مشهد شعبه شمال شرق تکثیر گردید. جایگاه‌های برشی آنزیم‌های محدود کننده BamHI و EcoRI در پرایمرها جهت کلونینگ در وکتور بیانی pET-32a به گونه‌ای 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).

شکل ۱



شکل ۲



جدول ۱

پرایمر	فوروارد	ریورس	توضیح
Omp31	GAATTCATGAAATCCGTAATTTTGGC	GGATCCTTAGAACTTGTAAGTCAGACCG	تکثیر ژن omp31/ ژنوم Brucella melitensis

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. باکتری BL21 حاوی پلازمید نوترکیب PET-OMP31 در ۱ میلی لیتر برات LB حاوی ۵۰ µg/ml آمپی سیلین با چرخش ۱۵۰ دور در دقیقه در دمای C ۳۷° کشت داده شد. پس از اینکه جذب نوری در OD600 به ۰/۴ رسید. با کتریهای کشت شده با غلظت های متفاوتی از IPTG (۰/۲۵، ۰/۵، ۰/۷۵ و ۱ میکرومولار) و هر غلظت با زمانهای مختلف (۲، ۴، ۶ و شبانه) درون انکوباتور شیکردار القاء شد. بعد از گذشت زمانهای اشاره شده، ۱۰۰ میکرولیتر از هر کشت برداشته شده و به مدت ۵ دقیقه و 8000 rpm سانتریفیوژ شد.

میزان بیان پروتئین در غلظت های مختلف IPTG و زمان های 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.

تایید بیان پروتئین نوترکیب با استفاده از western blot

پس از الکتروفورز پروتئین روی ژل پلی آکریل آمید الکتروفورز، به غشا نیتروسولوز انتقال داده شد. مرحله بلاکینگ با شیر خشک (Skimmed milk) ۵ درصد شبانه در C ۴۰ 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 (۳ و ۳' -دی آمینو بنزیدین) به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق انجام شد.

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 افراد سالم 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 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 اینکوبه 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.

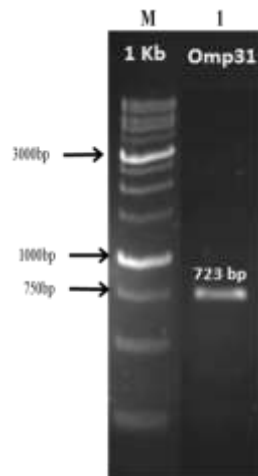
برای آزمایش الایزا، میکروپلیت ۹۶ چاهکی الایزا با ۰/۶ میکروگرم از پروتئین نوترکیب در بافر پوشش (۱۰۰ میکرولیتر کربنات ۹/۶ pH) در هر چاهک یک شبانه در دمای ۴°C انکوبه شد. سپس چاهک ها سه بار با ۲۰۰ میکرولیتر بافر PBST (PBS, pH= 7.2+ Tween 20, 0.05 %) شستشو داده شد. سپس چاه ها با ۲۰۰ میکرولیتر بافر بلاکینگ (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 (3-ethyl benzothiazoline-6-sulfonic acid ABST انجام شد.

نتایج

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

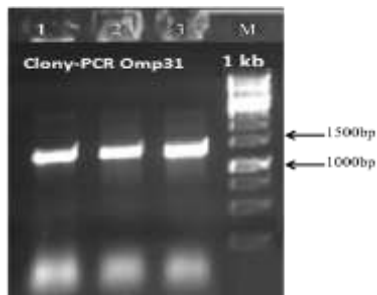
واکنش PCR بر روی ژنوم باکتری بروسلا ملیتنسیس با استفاده از پرایمرهای طراحی شده Omp31 و Omp31 R انجام شد. و باند ۷۲۳ bp بر روی ژل آگارز مشاهده شد (شکل ۳). بعد از اتصال قطعه Omp31 به وکتور pET32a مراحل ترانسفورماسیون انجام گرفت و از کلونی های رشد کرده بر روی پلیت حاوی آمپی سیلین جهت تأیید نهایی استفاده شد. واکنش کلنی PCR با پرایمرهای T7 promoter و T7 terminator انجام گرفت. محصول PCR بر روی ژل لود شد که تکثیر قطعه ای به طول ۱۴۷۵ جفت باز در (شکل ۴) نشان داده شده است.

شکل ۳



شکل ۳: تصویر الکتروفورز جهت بررسی تکثیر قطعه Omp31 توسط واکنش PCR با استفاده از پرایمرها Omp31 R/F. چاهک M: مارکر ۱۰Kb، چاهک شماره ۱: قطعه ژن Omp31.

شکل ۴

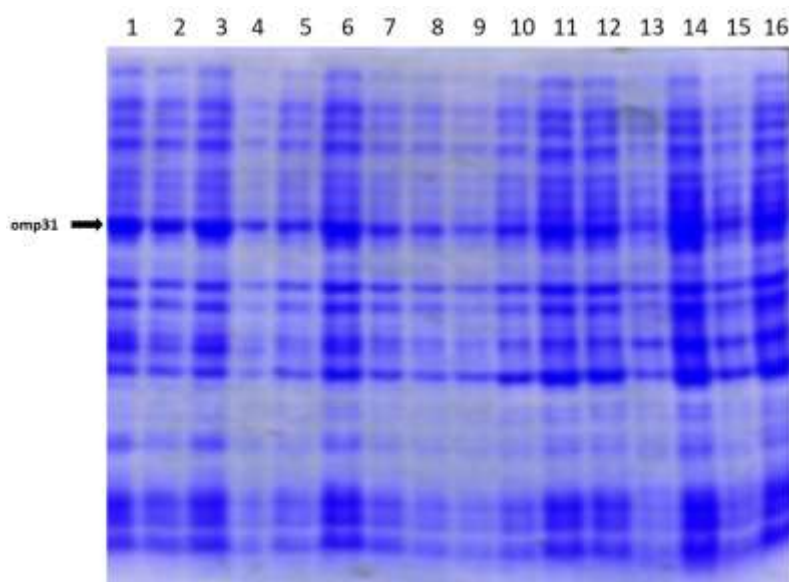


شکل ۴: الکتروفورز محصول Colony PCR جهت تأیید ترانسفورم سازه مورد نظر در باکتری *E.coli* BL21 چاهک شماره ۱، ۲ و ۳: کلنی‌های که وکتور نوترکیب pET32a- Omp31 را دریافت کرده‌اند، چاهک M: مارکر ۱۰Kb

نتایج بیان و خالص سازی پروتئین نوترکیب rOmp31

بیان بهینه پروتئین نوترکیب OMP 31 حاوی 6 His Tag در حضور غلظت IPTG ۰/۲۵ میکرو مولار و ۲ ساعت پس از القا بود. داده 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

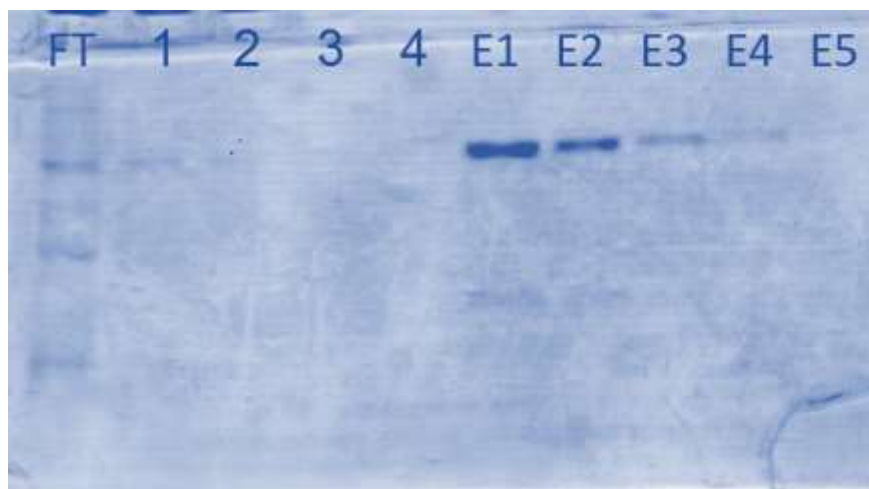


شکل ۵: تصویر ژل جهت بررسی میزان القاء بیان ژن در غلظت های مختلف IPTG
 چاهک ۱-۴: دو ساعت پس از القا در غلظتهای ۰/۲۵، ۰/۵، ۰/۷۵، ۱،۰ میکرومولار IPTG
 چاهک ۵-۸: چهار ساعت پس از القا در غلظتهای ۰/۲۵، ۰/۵، ۰/۷۵، ۱،۰ میکرومولار IPTG
 چاهک ۹-۱۲: شش ساعت پس از القا در غلظتهای ۰/۲۵، ۰/۵، ۰/۷۵، ۱،۰ میکرومولار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

شکل ۶

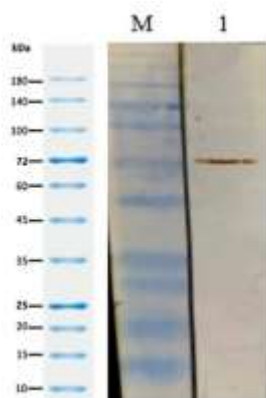


شکل ۶: تصویر ژل SDS-PAGE مربوط به تخلیص پروتئین OMP31 به روش کروماتوگرافی میل ترکیبی: چاهک FT: Flow through. چاهک های ۱-۴: برداشت های شستشوی ستون. چاهک های E1-E5: الوشن های پروتئین نو ترکیب تخلیص شده است.

نتایج حاصل از تعیین غلظت و تایید پروتئین هدف توسط WESTERN BLOTING:

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. پس از انتخاب شرایط بهینه بیان پروتئین، WESTERN BLOTING با هدف تایید ماهیت پروتئین بیان شده انجام شد. با توجه به اینکه پروتئین نو ترکیب دارای برجسب پلی هیستیدینی است شناسایی و تشخیص آن با استفاده از آنتی بادی Anti poly histidine صورت گرفت و نتایج در شکل ۷ نشان داده شده است.

شکل ۷



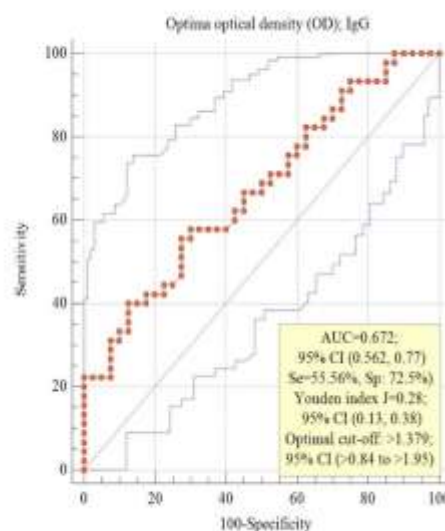
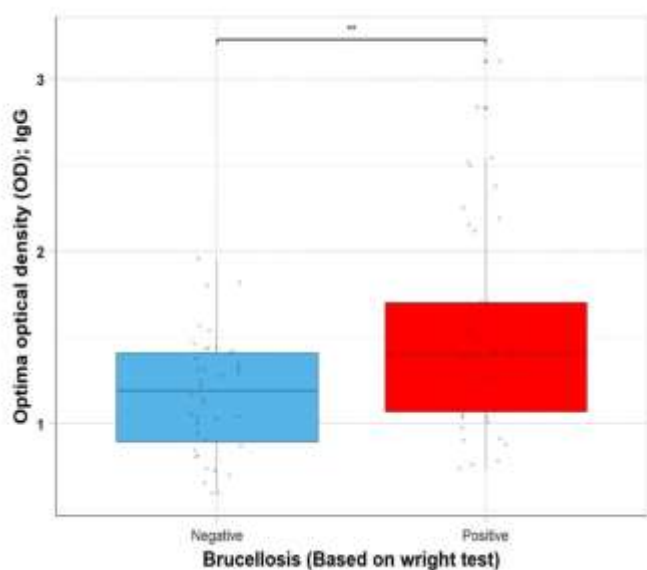
شکل ۷: تایید بیان پروتئین نو ترکیب Omp31 با روش وسترن بلات با رقت 1:2000 آنتی بادی Anti His-Tag: چاهک M: مارکر پروتئین، چاهک ۱: پروتئین Omp31 تخلیص شده.

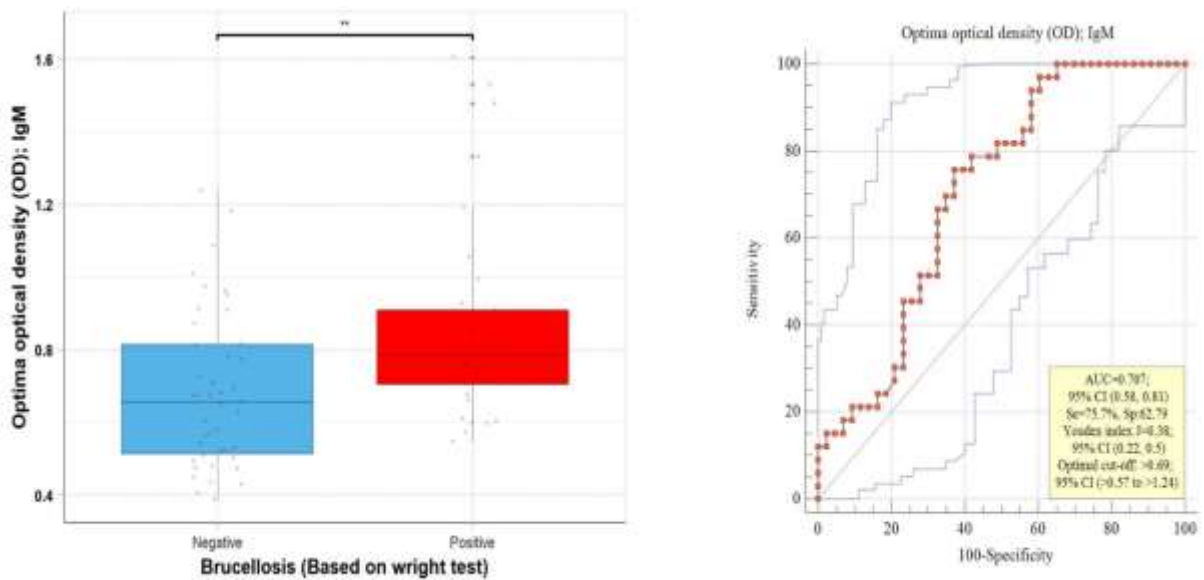
نتایج حاصل از الایزا

بررسی واکنش پذیری پروتئین نو ترکیب با سرم بیماران و سرم گروه کنترل با دو 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 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 به ترتیب $72/5\%$ و $55/56\%$ و برای آنتی بادی IgM ، $62/79\%$ و $72/7\%$ گزارش شد (نمودار های ۸ و ۹).

شکل ۸





بحث و نتیجه گیری

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).

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 پس در این مطالعه از آنتی ژن omp 31 با پتانسیل تحریکی استفاده شد بدین صورت که دارای توالی his tag به منظور تسهیل در خالص سازی بود. در 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 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 بلاتینگ در محدوده ۴۱ kd تایید شد. پس از بیان پروتئین در حجم بالا، با روش افینیتی کروماتوگرافی تخلیص شد (۱۵). پروتئین نو ترکیب 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 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 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 31 OMP تخلیص شده از نظر واکنش پذیری سرولوژیکی مورد ارزیابی قرار گرفت. از آن جهت که الایزا مناسب ترین انتخاب برای تشخیص بروسلوز، مخصوصا زمانی که روش های دیگر محدود است و میتواند آنتی- بادی های کلی و اختصاصی بروسلا را آشکار سازد (۱۸) بنابراین در این مطالعه واکنش پذیری پروتئین نو ترکیب توسط تست الایزا با نمونه های سرمی بیمار و سالم، و به صورت کمی مورد ارزیابی قرار گرفت (۱۹).

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

باتوجه با اینکه هدف این مطالعه بررسی واکنش پذیری سرولوژیکی 31 OMP بود، پروتئین با غلظت مناسب درون چاهک الایزا کوت شد و ابتدا واکنش پذیری آن با آنتی بادی Anti- human IgG HRP ، بارقت ۱:۱۰۰۰ و رقت سرمی ۱:۴۰۰ ، سپس با آنتی بادی Ant- human IgM HRP با رقت بارقت ۱:۱۰۰۰ و رقت سرم ۱:۲۰۰ مورد بررسی قرار گرفت و غلظت استفاده شده از قبل با انجام checker board ، ست آپ گردید. به منظور ارزیابی نتایج 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 31 OMP با سرم های بیمار و کنترل می باشد. 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 ۷۲/۵٪ و ۵۵/۵۶٪ است. یعنی این تست ۷۲/۵٪ از افراد بیمار سالم را منفی نشان می دهد و ۲۷/۵٪ مثبت کاذب نشان می دهد.

نتایج مربوط به آنتی بادی IgM بیانگر این است که اختصاصیت و حساسیت تست انجام شده برای این آنتی بادی به ترتیب برابر ۶۲/۷۹٪ و ۷۵/۷٪ است و نقطه Cut-off با فاصله اطمینان ۹۵٪ ، بالاتر 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 می دهد میزان واکنش پذیری پروتئین هیبرید، شامل 31 OMP ، 25 OMP و 21 OMP، نسبت به تک پروتئین

بیشتر است (۱۶). در مطالعه مشابه، الایزای بر پایه آنتی پروتئین نو ترکیب omp 28 انجام گرفت و میزان اختصاصیت و حساسیت به ترتیب ۸۸/۷٪ و ۹۳/۸٪ گزارش شد (۲۱).

مونر و همکاران در سال ۲۰۱۵ به منظور بررسی واکنش پذیری پروتئین های OMP باکتری بروسلا، ۳ نوع OMP، شامل OMP 31، OMP 25 و OMP 28 را کلون بیان کردند و ترکیبی از این ۳ نوع آنتی ژن در پلیت الایزا کوت شد. و واکنش پذیری 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 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 آنتی ژن قادر به شناسایی حساس آنتی بادی است در حالی که حساسیت کمتر در تست های مربوط به آنتی ژن واحد، مثل omp 28 (۸۸/۷٪) (۲۱) و omp 31 (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 حساس تر 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 می دهد تست برای هر دو آنتی بادی ، 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 می دهد. که می تواند مربوط به فاز بیماری بروسلوز باشد (۲۰) .

با بررسی سوابق بیماران مشاهده می شود که اکثر آن ها در اولین مواجهه با بروسلوز به بیمارستان مراجعه کرده اند بنابراین بیماری آن ها 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 .

نتیجه گیری:

با توجه به نتایج به دست آمده پروتئین omp 31 طراحی شده، واکنش پذیری قابل قبولی با نمونه های سرمی کلینیکی داشته و توانایی افتراق بین نمونه های سرمی مبتلا به بروسلوز و نمونه های سالم را دارا می باشد.

١٠. 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.
١١. Golshani M, Buozeni S. A review of Brucellosis in Iran: Epidemiology, Risk Factors, Diagnosis, Control, and Prevention. Iran Biomed J. 2017;21(6):349-59.
١٢. 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.
١٣. 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.
١٤. 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):e3١٨٢
١٥. 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.
١٦. 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.
١٧. 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.
١٨. 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.
١٩. 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.
٢٠. 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.

۱۲. 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.
۱۳. 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.
۱۴. 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.
۱۵. 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.
۱۶. 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.
۱۷. 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.
۱۸. 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.
۱۹. 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.
۲۰. Özdemir M, Feyzioğlu B, Kurtoğlu MG, Doğan M, Dağı HT, Yükksekaya Ş, et al. A comparison of immunocapture agglutination and ELISA methods in serological diagnosis of brucellosis. *International Journal of Medical Sciences*. 2011;8(5):428.
۲۱. 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.