

# طراحی روش الیزا جهت سنجش آنتی بادی ضد استرپتولیزین - O بر پایه

## پروتئین نو ترکیب استرپتولیزین - O

قاسم مسیبی<sup>۱</sup> (Ph.D)، حمید ابطحی<sup>۱\*</sup> (Ph.D)، علی قضاوی<sup>۲</sup> (M.Sc)، نادر زرین فر<sup>۳</sup> (M.D)، محسن خاکی<sup>۴</sup> (M.Sc)، محمدعلی پایانی<sup>۴</sup> (B.S)

۱- دانشگاه علوم پزشکی اراک، دانشکده پزشکی و عضو مرکز تحقیقات پزشکی مولکولی، گروه میکروبی شناسی و ایمنی شناسی

۲- دانشگاه علوم پزشکی اراک، دانشکده پزشکی و عضو مرکز تحقیقات عفونی، گروه میکروبی شناسی و ایمنی شناسی

۳- دانشگاه علوم پزشکی اراک، دانشکده پزشکی، گروه عفونی

۴- دانشگاه علوم پزشکی اراک، دانشکده پزشکی، گروه میکروبی شناسی و ایمنی شناسی

### چکیده

سابقه و هدف: باکتری استرپتوکوک بتا همولیتیک گروه A اصلی ترین عامل عفونت های گوش و حلق و بینی می باشد. عدم درمان یا تاخیر در اقدامات درمانی، منجر به اختلالات جدی مانند تب روماتیسمی حاد و گلوبرونفریت می شود. اندازه گیری آنتی بادی ضد استرپتولیزین -O به عنوان یک مارکر در تشخیص این عفونت کاربرد دارد. تهیه استرپتولیزین از محیط کشت باکتری وقت گیر و همراه با آلودگی است. در این مطالعه جهت اندازه گیری آنتی بادی ضد استرپتولیزین -O از استرپتولیزین -O نو ترکیب به عنوان آنتی ژن در طراحی روش الیزا استفاده شد. مواد و روش ها: ژن استرپتولیزین -O از استرپتوکوک پیوژن با روش پلیمرز زنجیره ای تکثیر گردید. ژن فوق در ناقل پلاسمیدی pET28a کلون گردید و وارد باکتری اشریشیا کلی سویه BL21-DE3-plySs شد. تولید پروتئین با القا توسط IPTG و بهینه سازی شرایط صورت گرفت. پروتئین نو ترکیب در غلظت های مختلف در میکروپلیت الیزا پوشانده شد. نمونه های سرمی بیماران در رقت های مختلف اضافه شد. میزان آنتی بادی ضد استرپتولیزین با روش آنزیمی الیزا اندازه گیری شد. نتایج با روش مهار همولیز مورد مقایسه و تجزیه و تحلیل قرار گرفت. یافته ها: نتایج حاصل از سنجش آنتی بادی ضد استرپتولیزین -O به روش الیزا با روش مهار همولیز نشان داد که هم بستگی معنی داری بین دو روش وجود دارد ( $r=0.97$ ،  $p=0.001$ ). همچنین حساسیت و ویژگی الیزای طراحی شده با پروتئین نو ترکیب به ترتیب ۱۰۰ و ۸۳ درصد بود. نتیجه گیری: روش الیزای طراحی شده بر اساس پروتئین نو ترکیب دارای حساسیت و ویژگی قابل قبولی است که می توان این روش را جایگزین روش مهار همولیز کرد.

واژه های کلیدی: استرپتوکوک پیوژن، استرپتولیزین -O نو ترکیب، الیزا، آنتی بادی ضد استرپتولیزین -O

### مقدمه

چرکی، باد سرخ و زرد زخم می باشد. این باکتری ها هم چنین باعث بروز عوارض دیررس غیر چرکی از جمله تب روماتیسمی و گلوبرونولونفریت در انسان می شوند [۱، ۲]. تشخیص عفونت های استرپتوککی بر دو پایه کشت (جداسازی

استرپتوکوک های گروه A لانسفیلد عامل بسیاری از عفونت های چرکی در انسان می باشند. مهم ترین عوارض ناشی از این باکتری ها در انسان شامل سلولیت، لنفانژیت، گلودرد

pGEX-2T حاوی پروتئین الحاقی استفاده شد [۸]. از معایب وکتور حاوی پروتئین الحاقی، اضافه شدن یک پروتئین به پروتئین نوترکیب اصلی است که باعث افزایش وزن مولکولی و ممکن است سبب تغییر در ساختار پروتئین شود. ممکن است این پروتئین باعث واکنش متقاطع با برخی آنتی‌بادی‌های بدن شود و باعث کاهش حساسیت روش گردد. با توجه به مشکلات و معایب استفاده از استرپتولیزین تخلیص شده از کشت و همچنین معایب وکتورهای حاوی پروتئین الحاقی در تولید فرم نوترکیب استرپتولیزین-O، در این مطالعه جهت طراحی الایزا از استرپتولیزین-O نوترکیب به‌دست آمده از وکتور بدون پروتئین الحاقی (ناقل پلاسمیدی pET28a) جهت سنجش آنتی‌بادی ضد استرپتولیزین-O استفاده شد.

### مواد و روش‌ها

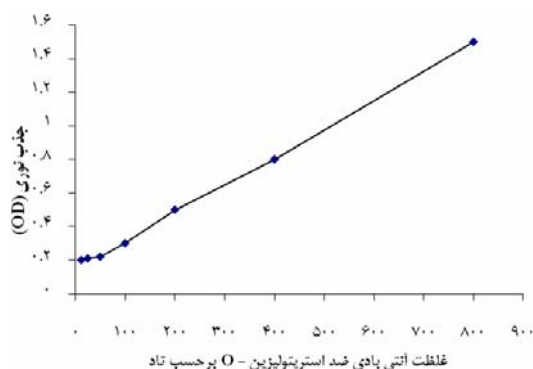
در این تحقیق با استفاده از ناقل پلاسمیدی pET28a تولید استرپتولیزین-O بدون پروتئین الحاقی تولید گردید [۹]. به طور خلاصه، DNA باکتری استرپتوکوک پیوزن بر اساس روش CTAB/NaCl جدا شد. پرایمرهای اختصاصی جهت ژن استرپتولیزین-O طراحی گردید و پس از تکثیر ژن با روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) ژن در دو پلاسمید pSK و pET28a کلون شد و به ترتیب وارد سلول مستعد اشریشیاکلی سویه DH50 و BL21-DE3-plySs گردید. تایید ترادف ژن با روش سنگر (Sanger) توسط شرکت آلمانی MWG صورت گرفت. تولید پروتئین استرپتولیزین-O توسط اشریشیاکلی سویه BL21-DE3-plySs تراریخت شده با پلاسمید pET28 α-SLO در محیط حاوی IPTG انجام شد. پروتئین استرپتولیزین-O با استفاده از کیت Ni-NTA خالص و جهت تایید پروتئین از روش وسترن بلات استفاده گردید. پروتئین استرپتولیزین-O در غلظت‌های ۵، ۱۰، ۲۰ و ۴۰ میکروگرم در میلی‌لیتر در بافر فسفات سالین با حجم ۱۰۰ میکرولیتر به حفره‌های پلیت الایزا (Nunc, Maxsorb, Denmark) اضافه شد. پلیت پوشیده شده با پروتئین نوترکیب استرپتولیزین-O به مدت یک شب

باکتری) و تست‌های سرولوژیک استوار است. یکی از مهم‌ترین آنتی‌ژن‌هایی که در آزمایشات سرولوژیک جهت تشخیص مورد استفاده قرار می‌گیرد استرپتولیزین-O ترشح شده از باکتری است [۳]. سنجش و تعیین تیتراژ آنتی‌بادی بر علیه استرپتولیزین علاوه بر تشخیص عفونت، به ارزیابی سیر بیماری نیز کمک می‌کند [۴]. روش‌های مختلفی جهت سنجش آنتی‌بادی ضد استرپتولیزین وجود دارد. یکی از روش‌های رایج، روش مهار همولیز است [۵]. در این روش در صورت عدم وجود آنتی‌بادی در سرم بیماران، گلبول قرمز در لوله آزمایش توسط استرپتولیزین لیز می‌شود. این روش هر چند از حساسیت نسبتاً خوبی برخوردار است ولی وقت‌گیر و باعث مصرف زیاد استرپتولیزین می‌گردد. همچنین به خاطر خطاهای پاراکلینیک و لیز گلبول قرمز امکان تداخل در آزمایش وجود دارد. تا کنون تلاش جهت طراحی کیت تشخیص آنتی‌بادی ضد استرپتولیزین-O بر پایه الایزا توسط برخی محققین انجام شده است. در سال ۱۹۸۶ برای اولین بار از روش الایزا (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) جهت سنجش آنتی‌بادی ضد استرپتولیزین-O استفاده شد [۶]. Moscoso و همکاران (۱۹۸۹) نیز از روش ELISA جهت سنجش کمی آنتی‌بادی ضد استرپتولیزین-O استفاده نمودند. بررسی انجام شده بر روی ۱۳۷ نمونه نشان داد که همبستگی خوبی بین این روش و روش استاندارد (مهار همولیز) وجود دارد [۷]. در این مطالعات از پروتئین استرپتولیزین-O به‌دست آمده از کشت باکتری‌ها استفاده گردید. تهیه استرپتولیزین از طریق کشت نیز پرهزینه می‌باشد و در صورتی که پروتئین به خوبی خالص نشود امکان واکنش مثبت کاذب وجود دارد. امروزه جهت تولید پروتئین‌ها از روش‌های مهندسی ژنتیک (نوترکیب) استفاده می‌شود. مقدار و خلوص پروتئین‌های به‌دست آمده از روش نوترکیب در مقایسه با روش‌های خالص‌سازی بهتر می‌باشد. تنها مطالعه‌ای که از استرپتولیزین-O نوترکیب جهت سنجش آنتی‌بادی ضد استرپتولیزین-O استفاده گردید، تحقیقی بود که در سال ۲۰۰۵ توسط Velazquez و همکاران انجام شد [۸]. در این مطالعه از وکتور

## نتایج

تیتراکتیبادی ضد استرپتولیزین-O با روش الیزا و همولیز مهاری. نتایج نشان داد که غلظت ۱۰ میکروگرم پروتئین نو ترکیب بهترین غلظت جهت Coating می باشد و در این غلظت حداقل رنگ زمینه ای وجود دارد.

از نمونه های سرم استاندارد با رقت های ۱ به ۱۰ تا ۱ به ۱۳۲۰ به صورت سریالی با حجم ۱۰۰ میکرولیتر اضافه و در مرحله آخر با اضافه کردن کونژوگه میزان جذب نوری، بر اساس پروتکل توضیح داده شده در فصل روش ها، با کمک دستگاه الیزا ثبت گردید (شکل ۱). رقت مناسب برای اضافه کردن سرم که حداقل رنگ زمینه ای را ایجاد کند و در این رقت اکثر نمونه ها را پوشش دهد رقت ۱ به ۱۰ می باشد.



شکل ۱. میزان جذب نوری بر حسب غلظت آنتی بادی ضد استرپتولیزین-O (منحنی استاندارد)

میزان آنتی بادی ضد استرپتولیزین بر اساس جذب نوری (OD) و منحنی استاندارد اندازه گیری شد و با نتایج به دست آمده از روش مهار همولیز مقایسه شد (جدول ۱). آنالیز آماری نشان داد که یک هم بستگی معنی داری بین دو روش وجود دارد ( $p=0/0001$ ،  $CI=0/95-0/99$ ).

تعیین حساسیت روش الیزا طراحی شده. جهت تعیین حساسیت تست الیزا، نمونه هایی که بر اساس روش مهار همولیز مثبت بودند و تیتراکتیبادی ضد استرپتولیزین-O آنها بیش تر از ۲۵۰ تاد بود به عنوان نمونه مثبت انتخاب شد. میزان آنتی بادی ضد استرپتولیزین-O این نمونه ها با روش

در دمای ۴ درجه انکوبه شد. و سپس سه بار با بافر شستشو (بافر فسفات سالین حاوی ۰/۵ درصد Tween20) شسته شد. جهت بلوکه کردن از فسفات سالین حاوی ۱ درصد آلبومین گاوی (BSA) استفاده شد. حجم ۲۰۰ میکرولیتر از این بافر به هر حفره اضافه و سپس یک ساعت در دمای آزمایشگاه انکوبه گردید. مجدداً پلیت سه بار با بافر شستشو، شسته شد و نمونه های سرمی با رقت های ۱ به ۱۰، ۱ به ۱۰۰ و ۱ به ۱۰۰۰ در حجم ۱۰۰ میکرولیتر به هر حفره اضافه و پلیت به مدت ۲ ساعت در دمای آزمایشگاه انکوبه گردید. پس از شستشوی پلیت مانند مرحله قبل، آنتی بادی اختصاصی ضد آنتی بادی های انسانی کونژوگه شده با آنزیم پراکسیداز با رقت ۱ به ۱۰۰۰ به تمامی حفره ها اضافه و به مدت ۲ ساعت انکوبه گردید. مجدداً پلیت شستشو و با کاغذ جاذب رطوبت گیری شد. سوبسترای اختصاصی آنزیم ارتو-فنیلن دیامین (OPD) طبق دستورالعمل به حفره ها اضافه گردید. شدت رنگ (OD) در طول موج ۴۹۲ نانومتر با استفاده از دستگاه الیزا ریدر مدل Stat Fax-2100 ثبت گردید. از روی منحنی استاندارد غلظت آنتی بادی ضد استرپتولیزین-O مورد اندازه گیری قرار گرفت.

روش مهار همولیز: نمونه های سرمی مورد مطالعه در این تحقیق از نظر میزان آنتی بادی ضد استرپتولیزین-O توسط روش مهار همولیز مورد سنجش قرار گرفتند و از نمونه هایی که در این روش دارای غلظت مشخص از آنتی بادی ضد استرپتولیزین-O بودند به عنوان استاندارد در روش الیزا استفاده شد.

آنالیز آماری: ارتباط بین روش الیزا با روش همولیز مهاری با آزمون هم بستگی (Correlation) مورد بررسی قرار گرفت. هم چنین حساسیت و ویژگی روش الیزا به طریق زیر به دست آمد:

حساسیت = [موارد مثبت حقیقی ÷ موارد مثبت کاذب + موارد مثبت حقیقی] × ۱۰۰  
ویژگی = [موارد منفی حقیقی ÷ موارد مثبت کاذب + موارد منفی حقیقی] × ۱۰۰

آنتی‌بادی ضد استرپتولیزین-O می‌گردد. از این نمونه‌ها به عنوان کنترل منفی استفاده گردید. در این روش نیز ۵ نمونه دارای جذب نوری بالاتر از حد نقطه برش (Cut off) بودند. بر این اساس، ویژگی روش الیزا در روش اول ۸۳ درصد و در روش دوم ۹۰ درصد می‌باشد.

تکرارپذیری روش الیزا طراحی شده. جهت تکرارپذیری روش تعداد ۱۶ نمونه با غلظت‌های مختلف انتخاب شده و این نمونه‌ها در سه مرحله با روش الیزا مورد سنجش قرار گرفتند. نتایج نشان داد که تغییرات معنی‌داری در میزان جذب نوری نمونه‌ها با تکرار آزمایش مشاهده نمی‌شود (جدول ۲).

الیزا اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد که تمام نمونه‌ها نیز در روش الیزا مثبت هستند و بنابراین حساسیت روش ۱۰۰ درصد می‌باشد.

تعیین ویژگی روش الیزا. جهت تعیین ویژگی از دو روش استفاده شد. نمونه‌هایی که غلظت ASO آن‌ها بر اساس روش مهاری کم‌تر از ۵۰ واحد بود انتخاب و این نمونه‌ها با رقت‌های ۱ به ۱۰۰ در روش الیزا مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج نشان داد که از ۶۰ نمونه تنها ۱۰ نمونه در این روش مثبت می‌باشند. در روش دوم نمونه‌ها ابتدا با استرپتولیزین-O تجارتي مخلوط شده که این عمل باعث جذب و حذف

جدول ۱. میزان جذب نوری در نمونه‌های سرمی با روش الیزا

شماره بیمار	تیترا ASO	جذب نوری	شماره بیمار	تیترا ASO	جذب نوری	شماره بیمار	تیترا ASO	جذب نوری
۱	۵۰	۰/۱۵	۶۲	۵۰	۰/۱۸	۴۲	۵۰	۰/۲
۴	۴۰۰	۰/۹۱	۶۳	۵۰	۰/۱۵	۴۳	۵۰	۰/۳۵
۸	۱۰۰	۰/۲	۶۴	۵۰	۰/۱۵	۴۴	۵۰	۰/۲۳
۹	۲۰۰	۰/۴۸	۶۵	۱۰۰	۰/۲۲	۴۵	۵۰	۰/۲۱
۱۱	۵۰	۰/۲	۶۶	۲۵	۰/۱	۴۶	۴۰۰	۰/۹۸
۱۲	۱۰۰	۰/۲۷	۶۷	۱۰۰	۰/۳	۴۷	۳۲۰۰	>۳
۲۶	۱۰۰	۰/۲۷	۶۸	۲۰۰	۰/۵	۴۸	۵۰	۰/۱۹
۲۹	۵۰	۰/۱۸	۶۹	۲۵	۰/۱۲	۴۹	۵۰	۰/۲۱
۳۰	۵۰	۰/۲	۷۰	۵۰	۰/۲۵	۵۰	۲۵	۰/۱۲
۳۱	۲۵	۰/۱	۷۱	۵۰	۰/۲۵	۵۱	۲۵	۰/۱۴
۳۲	۱۰۰	۰/۳	۷۲	۲۵	۰/۱	۵۲	۱۰۰	۰/۳۶
۳۳	۲۰۰	۰/۳۵	۷۴	۱۰۰	۰/۳۳	۵۳	۵۰	۰/۲
۳۴	۲۵	۰/۱	۷۵	۲۵	۰/۱	۵۴	۵۰	۰/۱۸
۳۵	۱۰۰	۰/۲۵	۷۶	۲۵	۰/۱۲	۵۵	۵۰	۰/۱۸
۳۶	۱۰	۰/۱	۷۷	۱۰۰	۰/۲۹	۵۶	۲۰۰	۰/۵۳
۳۷	۵۰	۰/۱۸	۷۸	۲۵	۰/۱	۵۷	۲۵	۰/۱۵
۳۸	۲۰۰	۰/۴۵	۷۹	۵۰	۰/۲	۵۸	۵۰	۰/۲
۴۰	۵۰	۰/۱۵	۸۰	۲۵	۰/۱۱	۵۹	۱۰۰	۰/۳۴
۴۱	۱۰۰	۰/۲۵	۸۵	۵۰	۰/۲۲	۶۰	۵۰	۰/۲
۸۶	۴۰۰	۱	۸۸	۲۰۰	۰/۵۱	۸۷	۵۰	۰/۲

جدول ۲. نتایج حاصل از تکرار آزمایش الیزا بر روی نمونه‌ها

شماره بیمار	تیتراژ ASO	جذب نوری	جذب نوری (تکرار دوم)	جذب نوری (تکرار سوم)
۱	۵۰	۰/۱۵	۰/۱۷	۰/۱۷
۴	۴۰۰	۰/۹۱	1	۰/۹۵
۸	۱۰۰	۰/۲	۰/۲۱	۰/۲
۹	۲۰۰	۰/۴۸	۰/۵	۰/۵۲
۶۶	۴۰۰	۰/۹۸	۰/۹۵	۰/۹۶
۶۷	۳۲۰۰	۳	۳	۳
۷۷	۲۰۰	۰/۵۳	۰/۵	۰/۵۱
۸۰	۱۰۰	۰/۳۴	۰/۳۶	۰/۳۶

منحنی استاندارد تهیه شده، نمونه‌های که تیتراژ آنتی‌بادی ضد استرپتولیزین-O آنها در روش مهارتی کم‌تر از ۵۰ واحد تاد باشد، در روش الیزا کم‌ترین میزان جذب را دارند و نمونه‌هایی که میزان جذب نوری آنها در روش الیزا بیش‌تر از ۰/۵ می‌باشد در روش مهارتی نیز دارای تیتراژ بالاتر از ۲۵۰ واحد تاد بوده و مثبت تلقی می‌شود. از این جهت نقطه برش الیزا را می‌توان بر حسب جذب نوری برابر ۰/۵ در نظر گرفت و نمونه‌های کم‌تر از آن را به عنوان منفی و نمونه‌های بیش‌تر از آن را مثبت تلقی کرد.

با توجه به منحنی استاندارد لازم بود از رقت‌هایی از سرم استفاده شود که در آن رقت، اکثر نمونه‌ها در محدوده منحنی استاندارد قرار گیرد. بنابراین نمونه‌ها با چهار رقت ۱، ۱۰، ۱۰۰ به ۱، ۱۰۰، ۱۰۰۰ و ۱ به ۱۰۰۰ مورد سنجش قرار گرفتند. نتایج نشان داد که ۹۵ درصد نمونه‌ها با رقت ۱ به ۱۰۰ در محدوده منحنی استاندارد قرار می‌گیرند و بنابراین در آزمایشگاه نیز برای استفاده از این کیت در تشخیص می‌توان نمونه‌های سرم را با رقت مربوطه استفاده کرد و این رقت ۹۵ درصد نمونه‌ها را پوشش می‌دهد.

نتایج حاصل از تعیین حساسیت و ویژگی نیز نشان داد که حساسیت این روش ۱۰۰ درصد می‌باشد. در خصوص نمونه‌هایی که تیتراژ آنتی‌بادی ضد استرپتولیزین-O آنها در روش مهارتی کم‌تر از ۲۵۰ واحد تاد بود این حساسیت کم‌تر می‌باشد. ویژگی این روش بین ۸۳ تا ۹۰ درصد بود.

در سال ۱۹۸۶ ریتانو (Reitano) و همکاران با استفاده از پروتئین استرپتولیزین به دست آمده از کشت باکتری یک روش الیزا جهت سنجش آنتی‌بادی ضد استرپتولیزین-O طراحی کردند [۶]. آنها نشان دادند که بین روش الیزا و روش مهارتی همولیز یک ارتباط معنی‌داری وجود دارد ( $r=0/707$ ). در حالی که در مطالعه حاضر این ارتباط نزدیک به یک می‌باشد ( $r=0/97$ ). در مطالعه دیگر نشان داده شد که بین روش الیزا و روش مهارتی جهت سنجش آنتی‌بادی ضد استرپتولیزین-O یک ارتباط مثبت و معنی‌داری ( $r=0/86$ ) وجود دارد. در این تحقیق حساسیت و ویژگی روش به ترتیب ۹۱ درصد و ۹۳

## بحث و نتیجه‌گیری

استاندارد طلایی جهت تشخیص عفونت‌های ناشی از باکتری‌های استرپتوکوک گروه A جداسازی از بافت یا اندام آلوده است. ولی بررسی روند پیش‌رفت بیماری یا موفقیت درمان بر پایه ردیابی و تعیین تیتراژ آنتی‌بادی بر علیه آنتی‌ژن‌های مهم باکتری از جمله استرپتولیزین-O می‌باشد. در روش متداول جهت تعیین آنتی‌بادی علیه استرپتولیزین-O از پروتئین طبیعی تهیه شده از استرپتوکوک پیورن استفاده می‌شود. از پروتئین نوترکیب استرپتولیزین می‌توان جهت تشخیص آنتی‌بادی اختصاصی استفاده کرد. در این تحقیق با استفاده از ناقل پلاسمیدی pET28a تولید استرپتولیزین-O بدون پروتئین الحاقی تولید گردید. جهت مقایسه آنتی‌ژنیسیته پروتئین نوترکیب تولید شده در این طرح با استرپتولیزین-O تجارتي از آزمون وسترن بلات استفاده گردید. نتایج نشان داد که پروتئین تولید شده دارای خاصیت آنتی‌ژنیک بوده و قادر به شناسایی با آنتی‌بادی‌های ضد استرپتولیزین-O می‌باشد.

نتایج این مطالعه نشان داد که غلظت ۵ تا ۱۰ میکروگرم از پروتئین نوترکیب استرپتولیزین-O جهت پوشاندن (Coating) پلت الیزا مناسب است. مقایسه غلظت استرپتولیزین-O در روش مهارتی با روش الیزا نشان داد که یک هم‌بستگی و ارتباط مثبت و معنی‌داری بین دو روش وجود دارد. بر اساس

## تشکر و قدردانی

بدینوسیله از معاونت تحقیقات و آموزش دانشگاه علوم پزشکی اراک جهت تامین هزینه مالی این طرح تحقیقاتی تشکر می‌گردد.

## منابع

- [1] Koshi G, Mammen A, Feldman DB, Bhakthaviziam C, Myers RM. A preliminary report on beta-hemolytic Streptococci and anti-streptolysin O (ASO) titres in pyogenic skin infections in children, with a case report of acute glomerulonephritis following repeated skin infections. *Indian J Med Res* 1967; 55: 920-929.
- [2] Jeng A, Beheshti M, Li J, Nathan R. The role of beta-hemolytic streptococci in causing diffuse, nonculturable cellulitis: a prospective investigation. *Medicine* 2010; 89: 217-226.
- [3] Tiesler E, Trinks U. The production of streptolysin O by beta-hemolytic streptococci of group A. *Zentralbl Bakteriolog Orig A* 1979; 245: 17-24.
- [4] Blyth CC, Robertson PW. Anti-streptococcal antibodies in the diagnosis of acute and post-streptococcal disease: streptokinase versus streptolysin O and deoxyribonuclease B. *Pathology* 2006; 38: 152-156.
- [5] Rantz LA, Spink WW, Boisvert PJ. Hemolytic streptococcus sore throat; detailed study of the simultaneous infection of a large number of men by a single type. *Arch Intern Med* 1945; 76: 278-283.
- [6] Reitano M, Pisano MA, Eriquez LA, D'Amato RF. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of streptolysin O antibodies. *J clin microbiol* 1986; 23: 62-65.
- [7] Moscoso del Prado J, Serrano C. An ELISA method for the quantification of anti-streptolysin-O antibodies. *J Immunol Methods* 1989; 124: 219-223.
- [8] Velazquez B, Massaldi H, Battistoni J, Chabalgoity JA. Construction and expression of recombinant streptolysin-o and preevaluation of its use in immunoassays. *Clin Diagn Lab Immunol* 2005; 12: 683-684.
- [9] Abtahi H, Mosayebi G, Salmanian AH. Expression of recombinant streptolysin O by escherichia coli. *J Arak Univ Med Sci (AMUJ)* 2007; 3: 1-8. (Persian).

درصد بود [۷]. در این مطالعات از پروتئین استرپتولیزین به‌دست آمده از کشت باکتری به عنوان آنتی‌ژن استفاده شده است در حالی که در تحقیق حاضر از پروتئین نوترکیب به عنوان آنتی‌ژن استفاده شد. حساسیت بالای الایزا در مطالعه حاضر ممکن است به دلیل استفاده از پروتئین نوترکیب باشد. در هر حال تحقیق انجام شده توسط Velazquez و همکاران (۲۰۰۵) نیز نشان داد که از پروتئین نوترکیب استرپتولیزین می‌توان در تشخیص عفونت استفاده کرد [۸]. در این مطالعه از وکتور pGEX-2T حاوی پروتئین الحاقی استفاده شد [۹]. پروتئین‌های الحاقی می‌تواند باعث تغییر در شاخص آنتی‌ژنیک و افزایش واکنش‌های متقاطع گردد، در حالی که در پژوهش حاضر از وکتور بدون پروتئین الحاقی جهت تولید استرپتولیزین استفاده گردید که این امر باعث افزایش حساسیت روش می‌گردد.

در مجموع روش الایزای طراحی شده بر مبنای استفاده از پروتئین نوترکیب استرپتولیزین-O از حساسیت و ویژگی قابل قبولی برخوردار است و هم‌خوانی و ارتباط مثبتی با روش مهار همولیز دارد. استفاده از این روش باعث صرفه‌جویی در وقت، افزایش دقت و اندازه‌گیری ایزوتیپ‌های مختلف آنتی‌بادی می‌شود.

# Design of enzyme-linked immunosorbent assay method for detection of anti-streptolysin-O antibodies on base of recombinant streptolysin-O

Ghasem Mosayebi (Ph.D)<sup>1</sup>, Hameid Abtahi (Ph.D)<sup>1\*</sup>, Ali Ghazavi (M.Sc)<sup>1</sup>, Nader Zareinfar (M.D)<sup>2</sup>, Mohsen Khaki (M.Sc)<sup>1</sup>, Mohammad Ali Payani (B.S)<sup>1</sup>

1 - Molecular and Medicine Research Center and Department of Immunology and Microbiology, School of Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran

2 - Department of Infection diseases, School of Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran

(Received: 8 Feb 2011 Accepted: 20 Sep 2011)

**Introduction:** Group A,  $\beta$  hemolytic streptococci are among the major causative agents of otorhinolaryngology infections. Inadequate treatment of disease may lead to serious disorders such as acute rheumatic fever and glomerulonephritis. Anti-streptolysin-O (ASO) is commonly used as a marker in the diagnosis of infection. Purification of native streptolysin-O has several difficulties and its industrial production process is time consuming with very low yield and the risk of biological contamination. In this study, we used a recombinant streptolysin-O protein as an antigen to detect ASO antibodies in enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

**Materials and Methods:** We amplified streptolysin-O gene by polymerase chain reaction (PCR) method and subcloned in prokaryotic expression vector PET28a. E.coli. BL21-DE3-plySs strain was transformed with PET28a-streptolysin-O and gene expression was induced by IPTG. ELISA microplates were coated with different concentration of streptolysin-O protein. Level of ASO antibodies were detected by ELISA method. The results obtained from ELISA method were compared with inhibition of hemolysis assay as a standard method.

**Results:** The results showed that there is a positive significant correlation between the ELISA and inhibition of hemolysis method ( $r=0.97$ ,  $p=0.0001$ ). The sensitivity and specificity of ELISA for detection of ASO anti bodies were 100% and 83%, respectively.

**Conclusion:** ELISA developed with recombinant streptolysine O showed a good sensitivity for detection of ASO antibodies. It is suggested that this method could be suitable for immunoassays.

**Keywords:** Streptococci pyogene, Recombinant streptolysin-O, Anti-streptolysin-O antibodies, Enzyme-linked immunosorbent assay

---

\* Corresponding author: Fax: +98 861 4173521; Tel: +98 861 4173502  
habtahi2001@yahoo.com