https://bjm.ui.ac.ir/?lang=en

Journal of Microbial Biology
E-ISSN: 3060-7647
15rd Year, Vol. 15, No. 57, 2026 pp. 33-44
Received: 01/01/2026 Accepted: 22/02/2026

(Research Paper)

Computational Evaluation of Diagnostic Epitopes for the Detection of *Mycoplasma* Infection in Small Ruminants

Malihe Akbarzadeh Niaki[1]

Department of Microbial Biotechnology, Faculty of Biotechnology, Amol University of Special Modern Technologies, Amol, Iran
m.akbarzadeh@ausmt.ac.ir

Abstract

Mycoplasma agalactiae is the primary etiological agent of contagious agalactia in small ruminants, a disease that has been reported in several countries, including Iran. The microorganism's ability to persist in chronic infections within herds results in substantial economic losses in the dairy industry. Recent advances in bioinformatics tools for macromolecular analysis, combined with the availability of the complete genome sequence of *M. agalactiae*, have enabled the systematic evaluation of diagnostically relevant epitopes and the rational design of novel constructs for diagnostic applications. The objective of the present study was to identify and evaluate epitopes with diagnostic potential and to design a multi-epitope protein suitable for use in diagnostic assays. The open reading frames (ORFs) of *M. agalactiae* were extracted using bioinformatics approaches. These ORFs were subsequently screened based on cellular localization, species specificity, toxicity, allergenicity, immunogenicity, and membrane-associated features to select appropriate candidate proteins for B-cell epitope prediction. The most promising epitopes were then employed in the design of a diagnostic multi-epitope protein. *In silico* analyses were performed to evaluate its structural and physicochemical properties, solubility, and interaction with the host MHC class II receptor. The results demonstrated that the bioinformatics screening process led to the selection of 5 ORFs and, ultimately, 7 B-cell epitopes exhibiting high immunogenicity, non-toxic and non-allergenic, and suitable specificity for *M. agalactiae*. Furthermore, the designed multi-epitope protein exhibited favorable structural stability, adequate solubility, and strong predicted interactions with the MHC class II receptor of goat immune cells. Overall, these findings suggest that the epitopes have significant potential for use in diagnostic assays and represent promising candidates for subsequent experimental validation of *M. agalactiae* infection.

Keywords: Contagious agalactia**,** Diagnostic approach, Bioinformatics, Epitope prediction.

[1] Corresponding Author

3060-7647/ © 2026 The Authors

This is an open access article under the CC BY-NC-ND/4.0/ License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

Akbarzadeh Niaki, M. Computational Evaluation of Diagnostic Epitopes for the Detection of Mycoplasma Infection in Small Ruminants. *Journal of Microbial Biology*, 2026; 15(57): 33-44. doi: 10.22108/bjm.2026.148014.1664.

Introduction

Mycoplasma agalactiae is recognized as the primary etiological agent of contagious agalactia, a significant infectious disease affecting small ruminants, particularly sheep and goats. The disease has been reported in numerous countries, including Iran, and remains a major concern for livestock health and dairy production systems. Infection with *M. agalactiae* is associated with significant economic losses due to decreased milk production, veterinary intervention costs, reduced animal productivity, and the long-term persistence of infection within affected herds. A notable characteristic of *M. agalactiae* is its capacity to establish chronic and subclinical infections. Infected animals may serve as long-term carriers, contributing to continuous transmission within herds. This persistence complicates control and eradication strategies, highlighting the necessity for reliable, sensitive, and specific diagnostic tools capable of detecting infection at various stages. Conventional diagnostic approaches, including microbiological culture and serological assays, may be limited by their sensitivity, specificity, or time requirements, emphasizing the need for improved diagnostic strategies based on well-defined antigenic determinants.

Advances in bioinformatics and immunoinformatics have provided powerful tools for antigen discovery and rational diagnostic design. The availability of the complete genome sequence of *M. agalactiae* enables the systematic evaluation of its open reading frames (ORFs) to identify proteins with diagnostic potential. Computational screening approaches allow for the prediction of immunogenic, non-toxic, and species-specific epitopes, thereby accelerating the development of recombinant diagnostic constructs. In particular, multi-epitope proteins, constructed by combining selected immunodominant epitopes into a single sequence, offer a promising platform for enhancing diagnostic performance while maintaining specificity.

The present study aimed to identify B-cell epitopes with diagnostic potential from the *M. agalactiae* genome and to design a multi-epitope protein suitable for use in diagnostic assays. Using a comprehensive *in silico* screening pipeline, candidate proteins were selected, epitopes were predicted and evaluated, and the resulting multi-epitope construct was analyzed in terms of its structural, physicochemical, and immunological properties.

Materials & Methods

A systematic bioinformatics approach was used to identify suitable antigenic targets from the complete proteome of *M. agalactiae*. Initially, all ORFs were extracted from the genomic dataset and subjected to a multi-step screening process, based on predefined criteria, to select targets with diagnostic relevance and safety. The first screening step involved the prediction of subcellular localization. Proteins predicted to be surface-exposed, membrane-associated, or secreted were prioritized, as these proteins are more accessible to the host immune system and are more likely to induce antibody responses detectable in serological assays. Computational localization tool, PSORT, was used to classify proteins according to their predicted cellular compartments.

Subsequently, species-specificity analysis was conducted to reduce potential cross-reactivity with other microorganisms, particularly closely related *Mycoplasma* species. The *Basic Local Alignment Search Tool* (*BLAST*) was used to exclude proteins with high homology to non-target organisms. This step was critical for enhancing the specificity of the potential diagnostic construct. Candidate proteins were further evaluated for predicted toxicity and allergenicity using established bioinformatics servers. Only proteins classified as non-toxic and non-allergenic were retained for further investigation. Subsequently, immunogenicity prediction was performed to assess the potential of the selected proteins to elicit a humoral immune response. Proteins exhibiting favorable antigenicity scores were selected for detailed B-cell epitope prediction.

Predicted linear B-cell epitopes were ranked according to their antigenicity, specificity, and overall suitability for diagnostic applications. The most promising epitopes were selected for inclusion in a multi-epitope construct. The selected epitopes were assembled into a single recombinant sequence using appropriate linker peptides to maintain structural independence and enhance epitope exposure. The final multi-epitope protein sequence was subjected to structural and physicochemical characterization. Secondary structure prediction was performed to evaluate the distribution of structural elements, while tertiary structure modeling provided insight into the three-dimensional conformation and overall stability of the construct.

Physicochemical properties, including molecular weight, theoretical isoelectric point (pI), instability index, aliphatic index, and grand average of hydropathicity (GRAVY), were analyzed to determine the stability and suitability of the construct for recombinant expression. Solubility prediction tools were used to estimate the likelihood of successful expression in a heterologous host system. Finally, molecular docking analysis was performed to evaluate the interaction between the designed multi-epitope protein and the major histocompatibility complex (MHC) class

doi: 10.22108/bjm.2026.148014.1664.

II receptor of goat immune cells. This analysis was conducted to assess the potential immunological recognition of the construct and its relevance for diagnostic purposes.

Discussion of Results & Conclusions

The proteome-wide screening of *M. agalactiae* identified five ORFs that presented all predefined selection criteria, including appropriate cellular localization, species specificity, non-toxicity, non-allergenicity, and predicted immunogenicity. These ORFs were considered suitable candidates for detailed epitope mapping. B-cell epitope prediction on the selected proteins identified seven linear epitopes with high antigenicity and favorable immunological properties. All selected epitopes demonstrated specificity to *M. agalactiae*, reducing the likelihood of cross-reactivity in diagnostic applications. Additionally, the predicted epitopes exhibited physicochemical characteristics consistent with antibody accessibility and immune recognition. The seven selected epitopes were successfully integrated into a rationally designed multi-epitope protein construct. Structural analysis indicated that the designed protein exhibited a stable secondary structure composition and a plausible tertiary conformation.

Physicochemical analysis revealed that the multi-epitope construct possessed an acceptable molecular weight of 22 kDa, compatible with recombinant expression. The instability index suggested structural stability, while the aliphatic index indicated potential thermostability. The GRAVY score (35.25) reflected a hydrophilic nature, suggesting favorable solubility characteristics. Solubility index of approximately 0.8 further supported the feasibility of expressing the construct in a suitable host system. Molecular docking analysis demonstrated strong predicted interactions between the multi-epitope construct and the goat MHC class II receptor with docking score of -297.76 and confidence score of 0.95. The predicted binding profile suggested stable complex formation, supporting the potential immunological relevance of the construct and its applicability in serological diagnostic assays.

The present study demonstrates the applicability of an integrative immunoinformatics approach for the identification and design of diagnostically relevant antigenic determinants in *M. agalactiae*. Through systematic proteome screening and multi-parameter filtering, five candidate ORFs were identified and subsequently used for B-cell epitope mapping. The identification of seven highly antigenic, non-toxic, and non-allergenic epitopes highlights the effectiveness of the selection strategy. The design of a multi-epitope construct incorporating these selected epitopes represents a rational strategy for enhancing diagnostic sensitivity and specificity. By combining multiple antigenic regions into a single recombinant protein, the likelihood of detecting specific antibody responses may be increased while minimizing cross-reactivity through careful epitope selection. The favorable structural stability, predicted solubility, and strong interaction with goat MHC class II receptors collectively support the feasibility of recombinant production and immunological recognition of the construct. These properties are essential for the development of reliable serological diagnostic assays targeting contagious agalactia. Although the findings are based on *in silico* analyses, the comprehensive computational validation provides a solid foundation for subsequent experimental investigation. Future studies should focus on recombinant expression, purification, and empirical evaluation of the designed multi-epitope protein using sera from infected and non-infected animals to determine diagnostic performance.

In conclusion, the identified epitopes and the designed multi-epitope construct exhibit significant potential as candidates for the development of improved diagnostic assays for *M. agalactiae* infection. The study underscores the value of genome-based bioinformatics strategies in accelerating diagnostic innovation for economically important infectious diseases in small ruminants.

doi: 10.22108/bjm.2026.148014.1664.

زیست‌شناسی میکروبی
سال پانزدهم، شماره ۵۷، ۱۴۰۵، صفحه ۳۳-۴۴
تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۱۰/۱۱ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۱۲/۰۳

مقاله پژوهشی

ارزیابی محاسباتی اپی‌توپ‌های کاربردی برای تشخیص عفونت ناشی از مایکوپلاسمای نشخوارکنندگان کوچک

ملیحه اکبرزاده نیاکی*
گروه زیست‌فناوری میکروبی، دانشکده زیست‌فناوری، دانشگاه تخصصی فناوری‌های نوین آمل، آمل، ایران
m.akbarzadeh@ausmt.ac.ir

چکیده

باکتری *Mycoplasma agalactiae*، عامل اصلی بیماری آگالاکسی مسری در نشخوارکنندگان کوچک است که در بسیاری از کشورها ازجمله ایران گزارش شده است و به‌علت توانایی باقی‌ماندن به‌صورت مزمن در دام، خسارات اقتصادی چشمگیری به صنعت لبنیات وارد می‌کند. با پیشرفت ابزارهای بیوانفورماتیکی در آنالیز ماکرومولکول‌ها و همچنین دسترسی به ژنوم کامل باکتری *M. agalactiae* امکان ارزیابی اپی‌توپ‌های کاربردی و طراحی سازه‌های جدید برای استفاده در روش‌های تشخیص عفونت ناشی از این باکتری فراهم شده است. هدف از این مطالعه، انتخاب و ارزیابی اپی‌توپ‌های دارای پتانسیل تشخیصی و طراحی یک پروتئین چند اپی‌توپی قابل استفاده در آزمون‌های تشخیصی است. بدین منظور، با بهره‌گیری از روش‌های بیوانفورماتیک، چارچوب‌های خوانش باز (Open Reading Frames, ORFs) باکتری، استخراج و پس از غربالگری از نظر موقعیت سلولی، اختصاصیت گونه‌ای، سمیت، آلرژن‌بودن، خاصیت ایمنی و ساختار غشایی، پروتئین‌های مناسب برای پیش‌بینی اپی‌توپ‌های B-cell انتخاب شدند. در ادامه، اپی‌توپ‌های برتر برای طراحی یک پروتئین چند اپی‌توپی تشخیصی به کار گرفته شدند و ویژگی‌های ساختاری، فیزیکوشیمیایی، حلالیت و برهم‌کنش آن با رسپتور MHC class II میزبان به‌صورت محاسباتی ارزیابی شدند. نتایج نشان دادند غربالگری‌های بیوانفورماتیکی منجر به انتخاب ۵ ORFs و درنهایت ۷ B-cell اپی‌توپ با خاصیت ایمن‌زایی بالا، عدم سمیت، عدم آلرژنی و اختصاصیت مناسب برای باکتری *M. agalactiae* شد. همچنین، پروتئین چند اپی‌توپی طراحی‌شده، پایداری ساختاری، حلالیت مطلوب و برهم‌کنش مناسبی با رسپتور MHC class II سلول‌های ایمنی میزبان بز نشان داد. یافته‌ها نشان می‌دهند اپی‌توپ‌های پیشنهادی دارای پتانسیل کاربرد در آزمون‌های تشخیصی بوده‌اند و می‌توانند به‌عنوان کاندید مناسب برای انجام تحقیقات تجربی در جهت شناسایی عفونت ناشی از این باکتری مورد توجه قرار گیرند.

واژگان کلیدی: آگالاکسی مسری، روش تشخیصی، بیوانفورماتیک، پیش‌بینی اپی‌توپ

* **نویسندهٔ مسئول مکاتبات**

اکبرزاده نیاکی, ملیحه. ارزیابی محاسباتی اپی‌توپ‌های کاربردی جهت تشخیص عفونت ناشی از مایکوپلاسمای نشخوارکنندگان کوچک. *زیست شناسی میکروبی*، ۱۴۰۵؛ ۱۵(۵۷): ۳۳-۴۴. doi: 10.22108/bjm.2026.148014.1664

3060-7647/ © 2026 The Authors
This is an open access article under the CC BY-NC-ND/4.0/ License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)

مقدمه

باکتری *Mycoplasma agalactiae* یک پاتوژن فاقد دیواره سلولی است که به‌عنوان عامل کلاسیک اتیولوژیک بیماری آگالاکسی مسری در گوسفند و بز شناخته می‌شود. این بیماری از اکثر کشورهای جهان به‌ویژه کشور ایران گزارش شده و سازمان جهانی سلامت حیوانات World Organization for Animal Health (OIE))، آگالاکسی مسری را مسئول خسارات سنگین اقتصادی به صنعت لبنیات اعلام کرده است. مطالعات متعددی حضور عامل بیماری را در حیوانات ناقلی که هم به‌صورت طبیعی و هم تجربی آلوده شده بودند، ماه‌ها پس از فاز حاد آلودگی نشان دادند. ماندگاری باکتری منجر به ایجاد حالت مزمن بیماری می‌شود که به‌عنوان تهدیدی جدی در صنعت لبنیات و اقتصاد کشورهای وابسته به این صنعت به شمار می‌رود؛ زیرا حیواناتی که دچار آلودگی مزمن شده‌اند می‌توانند به‌راحتی از دید برنامه‌ریزی کنترل و حذف بیماری پنهان مانده و موجب شعله‌ورشدن مجدد آتش شیوع بیماری شوند [۱- ۴].

بیوانفورماتیک علمی بین رشته‌ای است که از ترکیب علوم زیست‌شناسی، کامپیوتر و آمار برای تحلیل و تفسیر داده‌های زیستی استفاده می‌کند. برخی از رویکردهای بیوانفورماتیکی شامل دسته‌بندی داده‌های زیستی، ارزیابی کمی و کیفی این داده‌ها و همچنین بهبود طراحی داروها و واکسن‌ها براساس اطلاعات زیستی حاصل از تجزیه و تحلیل مولکول‌های DNA، RNA و پروتئین است. در سال‌های اخیر، بیوانفورماتیک به‌عنوان پیشرفته‌ترین حوزه با دستاوردهای چشمگیر در پیشگیری، کنترل، تشخیص و درمان بیماری‌ها در علوم پزشکی و دامپزشکی شناخته شده است [۵]. ایمونوانفورماتیک یا ایمونولوژی محاسباتی یکی از جدیدترین زیرشاخه‌های علم بیوانفورماتیک است که می‌تواند به‌عنوان یک رویکرد قدرتمند برای تحلیل، مدل‌سازی و پیش‌بینی عملکرد سیستم ایمنی در شرایط سلامت و بیماری به کار رود و فرایند توسعه و تسریع تولید واکسن‌ها و تست‌های تشخیصی جدید براساس داده‌های ژنومی و پروتئومی را تسهیل کند. چنین واکسن‌ها و روش‌های تشخیصی، به‌ویژه آنهایی که برای کنترل و مقابله با عوامل عفونتی کشنده و فراگیر در سطح جهان طراحی شده‌اند، می‌توانند از اهمیت استراتژیکی ویژه‌ای برای بهبود سلامت جهانی برخوردار باشند. ایمنوانفورماتیک از طیف گسترده‌ای از ابزارها برای پیش‌بینی اپی‌توپ در آنتی‌ژن‌ها استفاده می‌کند. این پیش‌بینی، اخیراً با اهداف مختلفی ازجمله تولید تست‌های تشخیصی، شناسایی علل بیماری‌ها و ساخت واکسن‌های مبتنی بر اپی‌توپ شایان توجه محققان قرار گرفته است. واکسن‌های مبتنی بر اپی‌توپ نشان داده‌اند به‌علت ایجاد پاسخ ایمنی قوی‌تر با ماندگاری بیشتر، تحریک هر دو سیستم ایمنی هومورال و سلولی و امنیت بالاتر، جایگزین مناسبی برای واکسن‌های کشته و واکسن‌های زنده تخفیف حدت یافته هستند. همچنین کیت‌های تشخیصی مبتنی بر پروتئین‌های نوترکیب چند اپی‌توپی نیز مزایای چشمگیری از قبیل ساخت آسان و هزینه تولید کمتر، حساسیت و اختصاصیت بیشتر و میزان پایین نتایج مثبت کاذب نسبت به کیت‌های مبتنی بر کل باکتری یا آنتی‌ژن دارند [۶].

همچنین، با توجه به زمان‌بربودن و هزینه بالای آزمایشات مربوط به بررسی ایمن‌زایی هر پروتئین شامل بیان پروتئین نوترکیب، خالص‌سازی و بررسی ایمن‌زابودن پروتئین خالص‌سازی‌شده، استفاده از ابزار بیوانفورماتیکی و پیش‌گویی ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی و آنتی‌ژنی یک پروتئین و اپی‌توپ‌های آن و طراحی یک پروتئین مولتی‌اپی‌توپ مورد اطمینان پیش از انجام مراحل تجربی، امری کلیدی به نظر می‌رسد [۷].

در مطالعه حاضر، با به‌کارگیری ابزارهای بیوانفورماتیکی، نواحی اپی‌توپی پروتئین‌های سطح سلولی باکتری *M. agalactiae* تخمین زده شدند و سپس از کنار هم قرار دادن بهترین اپی‌توپ‌ها با استفاده از لینکر مناسب، یک پروتئین

doi: 10.22108/bjm.2026.148014.1664.

نوترکیب چند اپی‌توپی با پتانسیل آنتی‌ژنی بالا ساخته شد که قابلیت شناسایی آنتی‌بادی‌ها علیه این باکتری را دارد.

مواد و روش‌ها

استخراج توالی ژنوم باکتری و ارزیابی پروتئین‌های منتخب تشخیص

ابتدا توالی ژنوم باکتری *M. agalactiae* از پایگاه داده NCBI با فرمت FASTA استخراج شد. سپس با استفاده از سرور ORFfinder تمامی چارچوب‌های خوانش باز (Open Reading Frames, ORFs) موجود در توالی ژنوم استخراج‌شده تعیین شدند. از میان ORFهای حاصل، تنها ORFهای مربوط به پروتئین‌های غشای خارجی و خارج سلولی در معرض سیستم ایمنی میزبان هستند؛ بنابراین، با استفاده از سرور Psort موقعیت سلولی هریک از پروتئین‌های حاصل از ORFهای تعیین‌شده پیش‌گویی شد و صرفاً ORFهای مربوط به پروتئین‌های غشای خارجی و خارج سلولی انتخاب شدند [۸]. در مرحله بعد با استفاده از سرور SignalP، وجود توالی سیگنال پپتید در ORFs حاصل، بررسی و از توالی اصلی پروتئین‌ها حذف شد [۹]. به‌منظور بررسی اختصاصیت پروتئین‌های حاصل برای باکتری *M. agalactiae* روی توالی همه ORFها هم‌ترازی انجام گرفت و ORFهای دارای همولوژی بالا با سایر گونه‌ها حذف شدند. سپس با کمک سرور VaxiJen، همه پروتئین‌ها از نظر خاصیت ایمن‌زایی با در نظر گرفتن حد آستانه ۰/۴، آنالیز و پروتئین‌هایی با امتیاز بالاتر برای انجام مراحل بعدی انتخاب شدند [۱۰]. همچنین، مارپیچ‌های داخل غشایی که در معرض سیستم ایمنی نبودند و کاندید مناسبی برای تشخیص نیستند، با استفاده از سرور TMHMM حذف شدند [۱۱].

پیش‌بینی و ارزیابی B-cell اپی‌توپ‌های منتخب تشخیص

در مرحله بعد، B-cell اپی‌توپ‌های فضایی و خطی مربوط به هریک از پروتئین‌های حاصل با استفاده از نرم‌افزار SVMTriP (http://sysbio.unl.edu/SVMTriP/ prediction.php) براساس توالی آمینواسیدی پروتئین و نرم‌افزار ElliPro (http://tools.immuneepitope.org/tools/ElliPro) براساس ساختار سه‌بعدی پروتئین با فرمت PDB پیش‌بینی شد [۱۲، ۱۳]. اپی‌توپ‌های پیش‌بینی‌شده مجدداً از نظر سمیت، آلرژن‌بودن و خاصیت ایمنی بررسی شدند و از میان اپی‌توپ‌های حاصل، بهترین اپی‌توپ‌ها از نظر فاکتورهای مهم، مانند خاصیت ایمن‌زایی و سمیت، برای ساخت یک پروتئین چند اپی‌توپی انتخاب شد.

ساخت و ارزیابی یک پروتئین چند اپی‌توپی کاندید تشخیص با استفاده از اپی‌توپ‌های منتخب

با استفاده از لینکر KK، اپی‌توپ‌های منتخب به هم متصل شدند و پروتئین چند اپی‌توپی ساخته شد. ساختار دوم و سوم پروتئین حاصل به‌ترتیب با نرم‌افزارهای SOPMA و Robetta پیش‌بینی شدند. همچنین خصوصیات فیزیکوشیمیایی از قبیل وزن مولکولی، پایداری و نیمه‌عمر پروتئین از طریق سرور آنلاین ProtParam Tool بررسی شد. نرم‌افزار آنلاین Protein-sol میزان حلالیت پروتئین چند اپی‌توپی حاصل را در مقایسه با میزان میانگین حلالیت مناسب پروتئین‌های محلول باکتری *E. coli* محاسبه کرد که شاخص ۰/۴۵ دارد. هرچه عدد حاصل به این شاخص نزدیک‌تر باشد، به معنی مطلوب‌بودن وضعیت حلالیت پروتئین مدنظر است.

بررسی برهم‌کنش پروتئین چند اپی‌توپی کاندید تشخیص با سیستم ایمنی میزبان

به‌منظور ارزیابی پروتئین چند اپی‌توپی طراحی‌شده در برهم‌کنش مطلوب با سیستم ایمنی میزبان، با استفاده از سرور

doi: 10.22108/bjm.2026.148014.1664.

HDOCK داکینگ مولکولی بین این پروتئین به‌عنوان لیگاند و پروتئین DRB1-4 بز (NCBI Reference Sequence: NP_001301146.2) به‌عنوان رسپتور MHC class II سلول‌های ایمنی میزبان انجام گرفت [۱۴].

نتایج

ارزیابی و انتخاب پروتئین‌های منتخب تشخیص

براساس نتایج سرور ORFfinder درمجموع ۴۳۷۲ ORF از توالی ژنوم باکتری *M. agalactiae* شناسایی شدند که از میان آنها ۶۹ ORF توسط سرور Psort به‌عنوان پروتئین‌های غشای خارجی و خارج سلولی معرفی شدند. به‌علت موقعیت سلولی این پروتئین‌ها و در دسترس بودن آنها برای سیستم ایمنی میزبان، مراحل بعدی روی این ۶۹ ORF ادامه یافت. پس از انجام هم‌ترازی روی توالی ORFs موجود، ۲۱ ORF به‌علت عدم وجود همولوژی بالا با سایر گونه‌ها به‌عنوان پروتئین‌های اختصاصی برای باکتری *M. agalactiae*، انتخاب و توسط سرور VaxiJen از نظر خاصیت ایمنی‌زایی بررسی شدند. نتایج این سرور نشان دادند درمجموع ۵ ORF دارای بالاترین امتیاز آنتی‌ژنی بودند و برای تخمین نواحی اپی‌توپی وارد مرحله بعد شدند.

پیش‌بینی و انتخاب B-cell اپی‌توپ‌های منتخب تشخیص

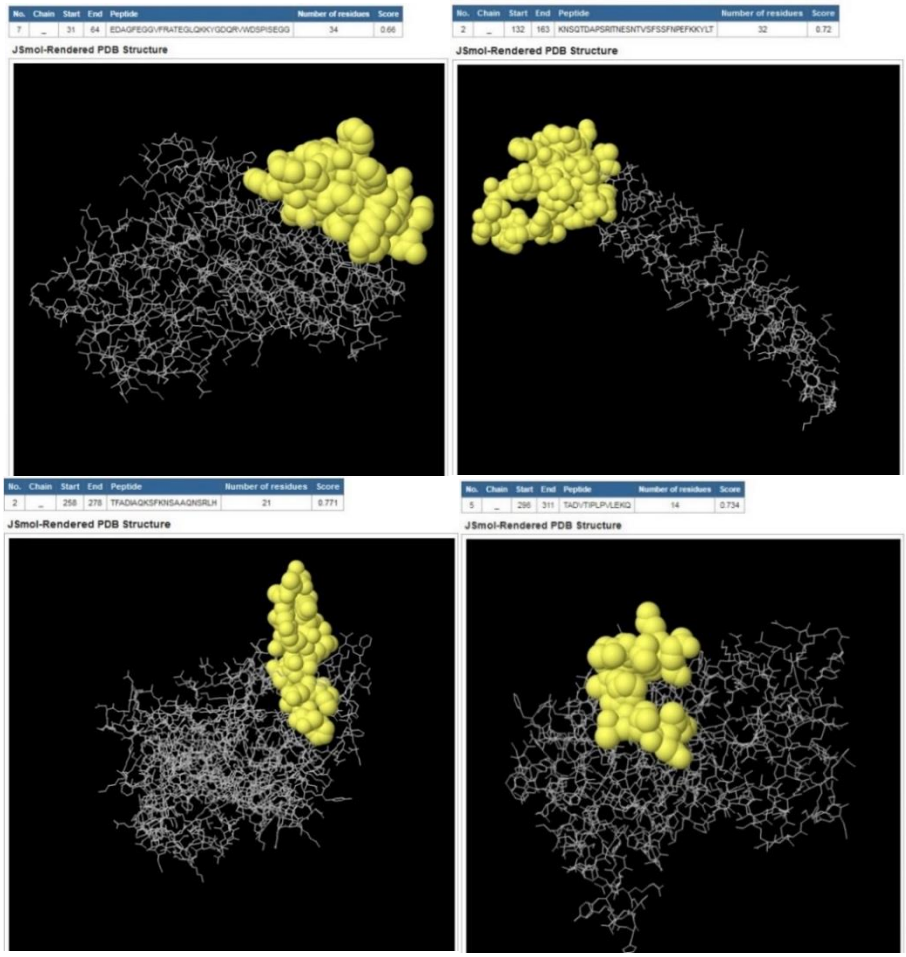
پس از پیش‌بینی B-cell اپی‌توپ‌ها با نرم‌افزارهای آنلاین SVMTriP و ElliPro، اپی‌توپ‌های غیرتوکسیک، غیرآلرژن و دارای خاصیت آنتی‌ژنی بالاتر با نرم‌افزارهای آنلاین ToxinPred، AllerTOP و VaxiJen به‌عنوان اپی‌توپ‌های منتخب برای ساخت پروتئین چند اپی‌توپی انتخاب شدند. این اپی‌توپ‌های منتخب در جدول ۱ و شکل ۱ ذکر شده‌اند.

جدول ۱. لیست B-cell اپی‌توپ‌های منتخب

Table 1. Selected B-cell Epitopes

	Epitope Sequence	Score	VaxiJen Score	Allergenicity	Toxicity
Linear Epitopes Predicted via SVMTriP	HSEALEAIYSHVPGLKVIMP	1.00	0.74	Non Allergen	Non Toxic
	AASCGDKYFKETEVDGVKTI	0.95	0.80	Non Allergen	Non Toxic
	YNSLAAKLASKKITDKYKRE	0.91	0.99	Non Allergen	Non Toxic
Discontinuous Epitopes Predicted via Ellipro	TFADIAQKSFKNSAAQNSRLH	0.77	0.68	Non Allergen	Non Toxic
	TADVTIPLPVLEKQ	0.73	0.73	Non Allergen	Non Toxic
	KNSQTDAPSRITNESNTVSFSSFNPEF KKYLT	0.72	0.69	Non Allergen	Non Toxic
	EDAGFEGGVFRATEGLQKKYGDQR VWDSPISEGG	0.66	0.70	Non Allergen	Non Toxic

doi: 10.22108/bjm.2026.148014.1664.



شکل ۱- ساختار سه‌بعدی B-cell اپی‌توپ‌های پیش‌بینی‌شده توسط نرم‌افزار ElliPro. نواحی زرد رنگ اپی‌توپ‌های پیش‌بینی‌شده را در ساختار سه‌بعدی پروتئین نمایش می‌دهد.

Figure1. 3D structure of B-cell Epitopes estimated by ElliPro.

ساخت پروتئین چند اپی‌توپی با اپی‌توپ‌های منتخب

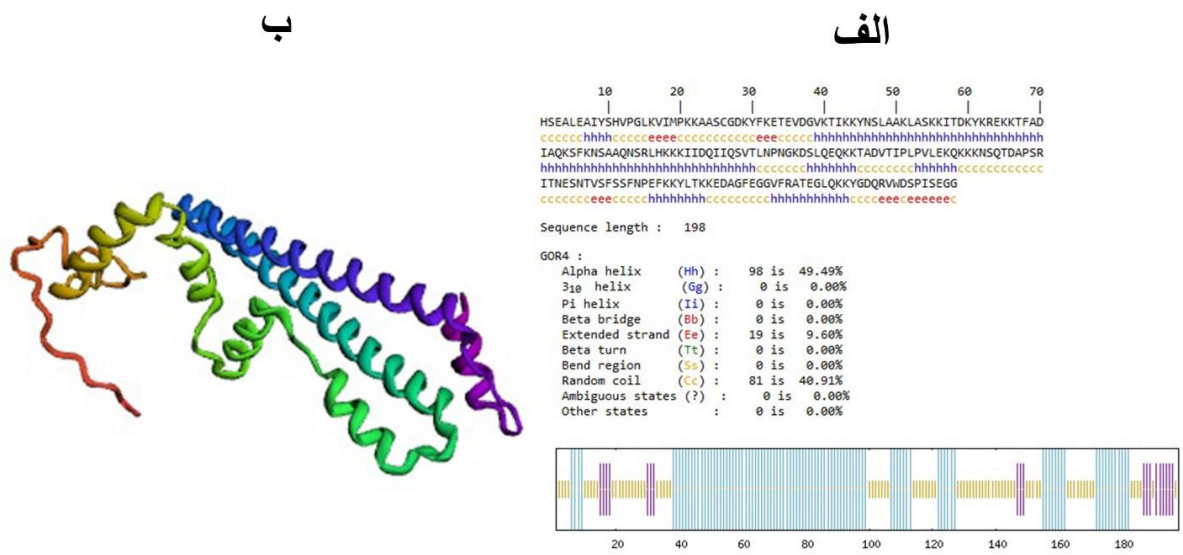
با اتصال B-cell اپی‌توپ‌های انتخاب‌شده با کمک لینکر KK پروتئین چند اپی‌توپی مدنظر ساخته شد.

HSEALEAIYSHVPGLKVIMPKKAASCGD
KYFKETEVDGVKTIKKYNSLAAKLASKK
ITDKYKREKKTFADIAQKSFKNSAAQNSR
LHKKKIIDQIIQSVTLNPNGKDSLQEQKK
TADVTIPLPVLEKQKKKNSQTDAPSRITN
ESNTVSFSSFNPEFKKYLTKKEDAGFEGG
VFRATEGLQKKYGDQRVWDSPISEGG

پیش‌بینی ساختار دوم و سوم پروتئین چند اپی‌توپی

با استفاده از سرور آنلاین SOPMA پروتئین چند اپی‌توپی حاصل از نظر ساختار دوبعدی ارزیابی شد. براساس این، درصد حضور random coil، extended strand (β fold) و α helices به‌ترتیب ۴۰/۹۱، ۹/۶ و ۴۹/۴۹ درصد است که در شکل ۲-الف نمایش داده شده است. ساختار سوم پروتئین چند اپی‌توپی توسط نرم‌افزار Robetta، پیش‌بینی و فایل PDB حاصل استخراج شد (شکل ۲-ب).

doi: 10.22108/bjm.2026.148014.1664.

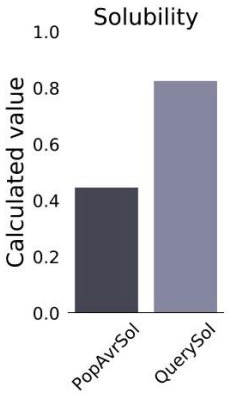


شکل ۲- پیش‌بینی ساختار پروتئین چند اپی‌توپی طراحی شده. الف) پیش‌بینی ساختار دوم با استفاده از نرم‌افزار SOPMA ب) پیش‌بینی ساختار سوم با استفاده از نرم‌افزار Robetta

Figure 2. Prediction of Multi-Epitope Protein Structure.

ارزیابی خواص فیزیکوشیمیایی و حلالیت پروتئین کاندید تشخیص

یافته‌های حاصل از ارزیابی خواص فیزیکوشیمیایی پروتئین چند اپی‌توپی توسط سرور آنلاین ProtParam Tool نشان دادند این پروتئین شامل ۱۹۸ آمینواسید با وزن مولکولی تقریبی ۲۲ کیلودالتون و دارای نیمه‌عمر مطلوب (۱۰ ساعت در میزبان باکتریایی *E. coli*) است. همچنین، شاخص ناپایداری این پروتئین ۳۵/۲۵ (<۴۰) تخمین زده شد که حاکی از پایداری مطلوب پروتئین چند اپی‌توپی پیشنهادی است. نتایج حاصل از نرم‌افزار Protein-sol نیز نشان دادند شاخص حلالیت پروتئین کاندید تشخیص، تقریباً ۰/۸ تخمین زده شد که در مقایسه با شاخص حلالیت مناسب پروتئین‌های باکتری *E. coli* (۰/۴۵)، حلالیت بالای پروتئین پیشنهادی را نشان می‌دهد.



شکل ۳- پیش‌بینی میزان حلالیت پروتئین چند اپی‌توپی (QuerySol) در مقایسه با میانگین حلالیت پروتئین‌های باکتری *E. coli* (PopAvrSol).

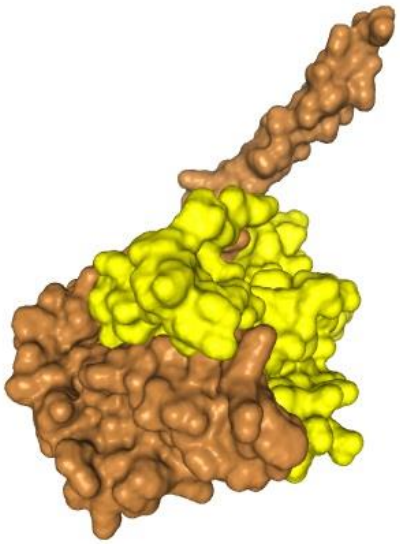
Figure 3. Predicting the Multi-epitopic protein (QuerySol) Solubility Compared to the Average Solubility of *E. coli* Proteins (PopAvrSol).

بررسی برهم‌کنش پروتئین چند اپی‌توپی کاندید تشخیص با سیستم ایمنی میزبان

نتایج حاصل از داکینگ مولکولی بین پروتئین چند اپی‌توپی طراحی‌شده به‌عنوان لیگاند و پروتئین DRB1-4 به‌عنوان رسپتور MHC class II سلول‌های ایمنی میزبان با استفاده از

doi: 10.22108/bjm.2026.148014.1664.

سرور HDOCK در شکل ۴ نمایش داده شده‌اند. امتیاز داکینگ (Docking Score) ۲۹۷/۷۶- و امتیاز اطمینان (Confidence Score) ۰/۹۵ بود که حاکی از برهم‌کنش مناسب بین این دو پروتئین است.



شکل ۴- داکینگ مولکولی بین رسپتور DRB1-4 (قهوه‌ای) و پروتئین چند اپی‌توپی کاندید تشخیص (زرد)

Figure 4. Molecular Docking between DRB1-4 Receptor (Brown) and Serodiagnostic Candidate Multi-Epitope Protein (Yellow)

بحث

بیماری آگالاکسی به‌دلیل احتمال بالای انتشار عامل بیماری‌زا از حیوانات ناقل بدون علامت حتی تا ماه‌ها پس از آلودگی اولیه، پتانسیل ایجاد حالت مزمن و ماندگاری در گله را دارد که حذف کامل این بیماری از سطح گله را دشوار می‌کند. از سوی دیگر، درمان آنتی‌بیوتیکی نیز منجر به کاهش علائم و افزایش حالت ناقل می‌شود؛ ازاین‌رو، به‌کارگیری روشی دقیق و سریع برای تشخیص زودهنگام و غربال‌گری سریع حیوانات آلوده و جداسازی آنها از حیوانات سالم، نقش به‌سزایی در کنترل و حذف این بیماری از سطح گله خواهد داشت. شناسایی آنتی‌بادی‌های موجود در سرم افراد آلوده با روش سرولوژیکی الایزا مناسب‌ترین و سریع‌ترین روش تشخیص وجود عفونت در سطح گله است. در گذشته از عصاره سلول باکتری برای انجام این تست استفاده می‌شد که شامل مقادیر زیادی پروتئین و سایر ماکرومولکول‌ها بود که با ایجاد نتایج مثبت کاذب بر کارایی تست اثر منفی داشتند [۱، ۲، ۳، ۱۵]. امروزه، استفاده از پروتئین‌های نوترکیب خالص‌سازی‌شده حاصل از تکنیک‌های مولکولی شامل ترکیبی از اپی‌توپ‌های آنتی‌ژنتیک باکتری برای شناسایی آنتی‌بادی‌های موجود در سرم فرد آلوده، روش مؤثرتری با حساسیت و اختصاصیت دقیق‌تر است. مطالعات گسترده‌ای برای یافتن آنتی‌ژن‌های مؤثر در بهبود روش‌های سرولوژیکی انجام گرفته است؛ اما تاکنون یک پروتئین نوترکیب چند اپی‌توپی قطعی برای استفاده در ساخت روش تشخیص سرولوژیکی معرفی نشده است. دسترسی به ژنوم کامل باکتری *M. agalactiae* فرصت مناسبی برای پیش‌بینی پروتئین‌های دارای قدرت آنتی‌ژنی بالا و تخمین اپی‌توپ‌های آنها با کمک ابزارهای بیوانفورماتیکی فراهم کرده است [۱۶]. در مطالعه حاضر، برای اولین‌بار یک پروتئین جدید متشکل از اپی‌توپ‌های اختصاصی، غیرتوکسیک، غیرآلرژن با قدرت آنتی‌ژنی بالا برای کاربرد در توسعه روش تشخیص سرولوژیکی طراحی و معرفی شد. با توجه به ارتباط بین ساختار دوبعدی پروتئین و توزیع اپی‌توپ‌های آن، با استفاده از نرم‌افزار آنلاین SOPMA ساختار دوم پروتئین چند اپی‌توپی طراحی‌شده بررسی شد. ساختارهای α helices و extended strand (β fold) با قرارگیری در بخش‌های داخلی پروتئین در پایداری و استحکام پروتئین نقش دارند و ساختار random coil با موقعیت‌یابی در سطح سلول، در معرض سیستم ایمنی قرار داشته و احتمال تشکیل اپی‌توپ در آن بالاتر است [۱۷]. با توجه به درصد حضور هریک از ساختارهای فوق می‌توان نتیجه گرفت پروتئین چند اپی‌توپی حاضر، از نظر استحکام و پتانسیل تشکیل اپی‌توپ در وضعیت مطلوبی قرار دارد. این نتایج با یافته‌های حاصل از سرور ProtParam مطابقت داشت که با بررسی خواص فیزیکوشیمیایی پروتئین چند اپی‌توپی طراحی‌شده، آن را پایدار ارزیابی کرده بود. همچنین، بر اساس نتایج حاصل از نرم‌افزار که حاکی از شاخص حلالیت بالای پروتئین پیشنهادی در مقایسه با محدوده مطلوب حلالیت پروتئین‌های بیان‌شده در باکتری *E. coli* است، می‌توان استنباط کرد قطبیت بالای این

doi: 10.22108/bjm.2026.148014.1664.

پروتئین از یک‌سو آن را برای کاربردهای تشخیصی و برهم‌کنش با آنتی‌بادی مناسب می‌کند و از سوی دیگر، بیان و اجرای مراحل خالص‌سازی آن در شرایط استاندارد به‌سهولت امکان‌پذیر است و احتمال تجمع پروتئین و تشکیل اینکلوژن‌بادی در سیستم بیانی *E. coli* پایین ارزیابی می‌شود.

به‌منظور بررسی پتانسیل پروتئین چند اپی‌توپی طراحی‌شده در برهم‌کنش با سیستم ایمنی میزبان، با استفاده از سرور HDOCK، داکینگ مولکولی بین ساختار سه‌بعدی پروتئین طراحی‌شده به‌عنوان لیگاند و ساختار سه‌بعدی پروتئین DRB1-4 به‌عنوان رسپتور MHC class II میزبان بز انجام گرفت. این سرور با آنالیز برهم‌کنش‌های بیوفیزیکی و بیوشیمیایی، داکینگ بین دو مولکول را ارزیابی می‌کند. طبق نتایج به‌دست‌آمده، برهم‌کنش مطلوب بین پروتئین چند اپی‌توپی پیشنهادی و رسپتور MHC class II نشان می‌دهد اپی‌توپ‌های این پروتئین قابل شناسایی برای سیستم ایمنی میزبان هستند و آنتی‌بادی‌های تولیدشده در میزبان، توانایی تشکیل کمپلکس با این پروتئین را دارند. این قابلیت، حاکی از پتانسیل بالای پروتئین چند اپی‌توپی طراحی‌شده برای کاربرد در تولید روش‌های تشخیص سرولوژیکی بر پایه اپی‌توپ است. در توافق با یافته‌های مقاله حاضر، مطالعات متعددی در حیطه طراحی و تولید پروتئین‌های چند اپی‌توپی در توسعه روش تشخیص مؤثر برای سایر گونه‌های مایکوپلاسما از قبیل *M. bovis*، *M. gallisepticum*، *M. pneumonia* و *M. synoviae* با به‌کارگیری داکینگ مولکولی نشان دادند برهم‌کنش مناسب پروتئین‌های طراحی‌شده، با رسپتورهای سلول‌های ایمنی میزبان اختصاصی هر باکتری، شاخص مناسبی برای تخمین ایجاد پاسخ ایمنی پایدار و تشکیل صحیح کمپلکس آنتی‌ژن-آنتی‌بادی است [۶، ۱۸، ۱۹، ۲۰].

نتیجه‌گیری

در تحقیق حاضر، پروتئین‌ها و اپی‌توپ‌های دارای ویژگی‌های مناسب برای کاربرد در تشخیص عفونت ناشی از باکتری *M. agalactiae* ارزیابی و انتخاب شدند و برای اولین‌بار با استفاده از آنالیزهای بیوانفورماتیکی، یک پروتئین چند اپی‌توپی اختصاصی باکتری *M. agalactiae* غیرتوکسیک، غیرآلرژن، با خاصیت آنتی‌ژنی بالا، طراحی و از نظر ساختار، پایداری، خواص فیزیکوشیمیایی، حلالیت و توانایی ایجاد کمپلکس آنتی‌ژن-آنتی‌بادی تأیید شد. گام بعدی مطالعه، تولید پروتئین نوترکیب و ارزیابی خاصیت ایمن‌زایی این پروتئین و توانایی شناسایی آنتی‌بادی‌های موجود در سرم حیوان بیمار است.

سپاس‌گزاری

از همراهی و همکاری تمامی افرادی که در اجرای این پژوهش نقش داشتند، صمیمانه قدردانی به عمل می‌آید.

منابع

[1] Derriche MH, Nouvel LX, Gaudino M, Sagné E, Simon E, Robert H, Pot G, Meyer G, de la Fe C, Arfi Y, Maillard R. Bacterial conjugation in the ruminant pathogen *Mycoplasma agalactiae* is influenced by eukaryotic host factors. *Applied and Environmental Microbiology*. 2025;91(6):e00868-25. https://doi.org/10.1128/aem.00868-25

[2] Barbosa MS, Sampaio BA, Spergser J, Rosengarten R, Marques LM, Chopra-Dewasthaly R. *Mycoplasma agalactiae* vaccines: current status, hurdles, and opportunities due to advances in pathogenicity studies. *Vaccines*. 2024;12(2):156. https://doi.org/10.3390/vaccines12020156

[3] Kumar A, Rahal A, Chakraborty S, Verma AK, Dhama K. *Mycoplasma agalactiae*, an etiological agent of contagious agalactia in small ruminants: a review. *Veterinary Medicine International*. 2014;2014(1):286752. https://doi.org/10.1155/2014/286752

[4] Corrales JC, Esnal A, De la Fe C, Sánchez A, Assunçao P, Poveda JB, Contreras A. Contagious agalactia in small ruminants. *Small Ruminant Research*. 2007;68(1-2):154-66. https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2006.09.010

[5] Ranjbar MM, Ebrahimi MM, Shahsavandi S, Farhadi T, Mirjalili A, Tebianian M, Motedayen MH. Novel applications of immuno-bioinformatics in vaccine and bio-product developments at research institutes. *Archives of Razi Institute*. 2019;74(3):219-33. https://doi.org/10.22092/ari.2018.122523.1224

[6] Ali I, Shoukat T, Parveen T, Raza S, Jamil F, Kanwal S, Ibrahim M, Rasheed MA. Multi epitope based vaccine design and analysis against *Mycoplasma bovis* using immunoinformatic approaches. *Pakistan Veterinary Journal*. 2022;42(1). http://dx.doi.org/10.29261/pakvetj/2021.068.

[7] Akbarzadeh-Niaki M, Derakhshandeh A, Kazemipour N, Eraghi V, Hemmatzadeh F. A novel chimeric recombinant protein PDHB-P80 of *Mycoplasma agalactiae* as a potential diagnostic tool. *Molecular Biology Research Communications*. 2020;9(3):123. https://doi.org/10.22099/mbrc.2020.37684.1513

[8] Horton P, Park KJ, Obayashi T, Fujita N, Harada H, Adams-Collier CJ, Nakai K. WoLF PSORT: protein localization predictor. *Nucleic Acids Research*. 2007;35(suppl_2):W585-7. https://doi.org/10.1093/nar/gkm259

[9] Teufel F, Almagro Armenteros JJ, Johansen AR, Gíslason MH, Pihl SI, Tsirigos KD, Winther O, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H. SignalP 6.0 predicts all five types of signal peptides using protein language models. *Nature Biotechnology*. 2022;40(7):1023-5. https://doi.org/10.1038/s41587-021-01156-3

[10] Zaharieva N, Dimitrov I, Flower D, Doytchinova I. Immunogenicity prediction by VaxiJen: a ten year *overview*. *Journal of Proteomics and Bioinformatics*. 2017;10(11):10-4172. https://doi.org/10.4172/jpb.100045

[11] Ganapathiraju M, Jursa CJ, Karimi HA, Klein-Seetharaman J. TMpro web server and web service: transmembrane helix prediction through amino acid property analysis. *Bioinformatics*. 2007;23(20): 2795-6. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm398

[12] Yao B, Zheng D, Liang S, Zhang C. SVMTriP: a method to predict B-cell linear antigenic epitopes. In *Immunoinformatics* 2020 Mar 12 (pp. 299-307). New York, NY: Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0389-5_17

[13] Ponomarenko J, Bui HH, Li W, Fusseder N, Bourne PE, Sette A, Peters B. ElliPro: a new structure-based tool for the prediction of antibody epitopes. *BMC Bioinformatics*. 2008;9(1):514. https://doi.org/10.1186/1471-2105-9-514

[14] Yakubu A, Salako AE, De Donato M, Peters SO, Takeet MI, Wheto M, Okpeku M, Imumorin IG. Association of SNP variants of MHC Class II DRB gene with thermo-physiological traits in tropical goats. *Tropical Animal Health and Production*. 2017;49(2):323-36. https://doi.org/10.1007/s11250-016-1196-1

[15] Gómez-Martín Á, De la Fe C, Amores J, Sánchez A, Contreras A, Paterna A, Buendía AJ, Corrales JC. Anatomic location of *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* and *Mycoplasma agalactiae* in naturally infected goat male auricular carriers. *Veterinary Microbiology*. 2012;157(3-4):355-62. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.01.004

[16] Sirand-Pugnet P, Lartigue C, Marenda M, Jacob D, Barré A, Barbe V, Schenowitz C, Mangenot S, Couloux A, Segurens B, De Daruvar A. Being pathogenic, plastic, and sexual while living with a nearly minimal bacterial genome. *PLoS Genetics*. 2007;3(5):e75. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0030075

[17] Forouharmehr A, Nassiry MR. B and T-cell epitopes prediction of the P40 antigen for developing *mycoplasma agalactiae* vaccine using bioinformatic tools. *Genetics in the Third Millennium*. 2015; 13(1):3954-3961. https://www.cabidigitallibrary.org/doi/full/10.5555/20153147621

[18] Zhang G, Han L, Zhao Y, Li Q, Wang S, Shi H. Development and evaluation of a multi-epitope subunit vaccine against *Mycoplasma synoviae* infection. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2023;253: 126685. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.126685

[19] Mugunthan SP, Harish MC. Multi-epitope-based vaccine designed by targeting cytoadherence proteins of *Mycoplasma gallisepticum*. *ACS omega*. 2021;6(21):13742-55. https://doi.org/10.1021/acsomega.1c01032

[20] Shi W, Zhao L, Li S, Xu G, Zeng Y. Serological diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infection by using the mimic epitopes. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2018;34(6):82. https://doi.org/10.1128/jb.00104-11