Medical Science Journal of Islamic Azad University Vol. 31, No. 2, Summer 2021 ORIGINAL ARTICLE

Evaluation of humoral and cellular immunity of recombinant autolysin protein *Staphylococcus aureus* in mouse model

Mandana Bagherzadeh[1], Setareh Haghighat[2], Mehdi Mahdavi[3]
[1] MSc Student, Department of Microbiology, Faculty of Advanced Science and Technology, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran
[2]Assistant Professor, Department of Microbiology, Faculty of Advanced Science and Technology, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran
[3] Assistant Professor, Recombinant Vaccine Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-10-30]

[DOR: 20.1001.1.10235922.1400.31.2.11.1]
[DOI: 10.52547/iau.31.2.146]

Abstract

Background: *Staphylococcal aureus* is a gram positive cocci and opportunistic pathogen. Due to the spread of this bacterium to antibiotics resistance, one of the most important ways of prevention is the use of vaccines. In this respect, autolysin protein as one of the adhesion molecule of bacteria plays an important role for binding bacteria to the host cells and cell division. Herein, the role of autolysin protein was evaluated as a vaccine candidate.
Materials and methods: Following preparation of recombinant autolysin, Balb/c mice were injected subcutaneously with 20µg of r-autolysin formulated in Montanide ISA-266 and Alum adjuvants three times with two week intervals with proper control group. Total, specific isotype antibodies, IFN-γ and IL-4 cytokine were evaluated on sera by ELISA. Experimental mice were challenged with a sub-lethal dose of staphylococcus strains (1.5×10^8 CFU) and following that, the number of bacteria from internal organs were determined. Survival rate was recorded for 30 days.
Results: Significant increase of antibody with high level of IgG1 and IgG2a isotypes was demonstrated in vaccinated mice versus the control group. Also, IFN-γ and IL-4 cytokines showed significant differences in all of the experimental vaccine groups compared to control group. The bacterial load in the internal organs from immunized mice was 1000 times less than control groups. Finally, the life span of immunized mice after bacterial challenge was extended versus control mice.
Conclusion: These results may indicate the capacity of autolysin as candidate vaccine to control the staphylococcus infections.
Keywords: *Autolysin, Staphylococcus aureus, Vaccine, Cellular immunity, Humoral immunity.*

Cited as: Bagherzadeh M, Haghighat S, Mahdavi M. Evaluation of humoral and cellular immunity of recombinant autolysin protein *Staphylococcus aureus* in mouse model. Medical Science Journal of Islamic Azad University, Tehran Medical Branch 2021; 31(2): **146-155.**

Correspondence to: Setareh Haghighat
Tel: *+98 21-22640051-5*
E-mail: setareh_haghighat@yahoo.com
ORCID ID: 0000-0002-6605-5245
Received: 30 Jul 2020; **Accepted:** 11 Oct 2020

مجله علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی
دوره ۳۱، شماره ۲، تابستان ۱۴۰۰، صفحات ۱۴۶ تا ۱۵۵

Original Article

بررسی ایمنی هومورال و سلولی پروتئین نوترکیب اتولیزین استافیلوکوکوس اورئوس در مدل موشی

ماندانا باقرزاده[۱]، ستاره حقیقت[۲]، مهدی مهدوی[۳]

[۱] دانشجوی کارشناسی ارشد،گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
[۲] استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
[۳]استادیار، مرکز تحقیقات واکسن، دانشگاه علوم پزشکی تهران، ایران

چکیده

سابقه و هدف: *استافیلوکوکوس اورئوس کوکسی گرم مثبت و پاتوژن فرصت طلب است. با توجه به گسترش مقاومت این باکتری در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها، یکی از مهم‌ترین راه‌های پیشگیری، استفاده از واکسن است. در این بین، پروتئین اتولیزین به عنوان یکی از مولکول‌های چسبندگی باکتری نقش مهمی در اتصال به سلول‌های میزبان و تقسیم سلولی دارد. در مطالعه حاضر نقش پروتئین اتولیزین به عنوان کاندیدای واکسن مورد بررسی قرار گرفت.*

روش بررسی: *بعد از تولید پروتئین نوترکیب اتولیزین، ۲۰میکروگرم R-Autolysin فرموله شده با ادجوانت‌های آلوم و مونتاناید ISA-266 سه بار با فواصل دو هفته‌ای در موش‌های Balb/c به صورت زیر جلدی تزریق شد. با استفاده از روش الایزای غیر مستقیم تیتر آنتی بادی توتال، ایزوتایپ‌های IgG1، IgG2 و سایتوکاین‌های IL4 و IFN-γ اندازه گیری شد. موش‌های آزمایشی با دوز ۱۰۸cfu× ۵ مورد چالش باکتریایی قرار گرفتند، سپس تعداد باکتری‌ها در ارگان‌های داخلی تعیین شد.*

یافته‌ها: *ایزوتایپ آنتی‌بادی‌های IgG1 و IgG2a در موش‌های واکسینه شده در مقایسه با گروه کنترل، افزایش معنی‌داری داشتند. همچنین سایتوکین‌های IFN-γ و IL-4 تفاوت معنی‌داری در گروه های مختلف واکسینه شده در مقایسه با گروه کنترل نشان دادند. میزان باکتری در اندام‌های داخلی موش‌های واکسینه شده ۱۰۰۰ بار کمتر از گروه های کنترل بود. در نهایت بقای موش‌های ایمن پس از چالش در مقایسه با گروه کنترل افزایش یافته بود.*

نتیجه‌گیری: *نتایج به دست آمده نشان دهنده نقش اتولیزین به عنوان کاندیدای مناسب واکسن علیه عفونت استافیلوکوکی است.*

واژگان کلیدی: *استافیلوکوکوس اورئوس، اتولیزین، واکسن، ایمنی هومورال، ایمنی سلولی.*

مقدمه

استافیلوکوک اورئوس نوعی کوکسی گرم مثبت فاقد تحرک با قطرتقریبی ۰/۸ تا ۰/۱ میکرون است که درسه محور تقسیم شده و تجمعات نامنظم ازسلول‌هایی شبیه به خوشه انگور را به وجود می‌آورد. از آنجا که مقاومت نسبت به داروهای ضدمیکروبی درحال گسترش است و استافیلوکوکوس اورئوس در برابر بسیاری از داروهای ضد میکروبی مقاومت نشان می‌دهد، مکانیسم‌های دفاعی سیستم ایمنی به عنوان استراتژی ضد میکروبی این باکتری بسیار مورد توجه است (۱). ازطرفی استافیلوکوکوس اورئوس به روش‌های مختلفی در برابر مکانیسم‌های دفاعی بدن مقاومت کرده یا از آن می‌گریزد. باتوجه به اهمیت استافیلوکوکوس اورئوس در عفونت‌های بیمارستانی، آگاهی ازمیزان تنوع ژنتیکی این باکتری‌ها در

آدرس نویسنده مسئول: تهران، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم وفناوری های نوین، واحد علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاداسلامی، ستاره حقیقت (**email**: setareh_haghighat@yahoo.com)
ORCID ID: 0000-0002-6605-5245
تاریخ دریافت مقاله: ۹۹/۵/۹
تاریخ پذیرش مقاله: ۹۹/۷/۲۰

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-10-30]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1400.31.2.11.1]
[DOI: 10.52547/iau.31.2.146]

منطقه در برنامه‌های کنترل، پیشگیری، درمان و پیش آگهی از پیامد عفونت حائز اهمیت است (۲). تعداد زیادی از فاکتورهای ویرولانس در بروز عفونت و مقاومت این باکتری به آنتی بیوتیک‌ها دخیل هستند. اخیرا یک گونه جدید از ادهیسین مولکول‌های چسبنده Staphylococcus شناخته شده است که یکی از این ادهیسین‌ها اتولیزین است (۳, ۴). اتولیزین جزء پروتئین‌های دارای خواص باکتریولایتیک موجود در پپتیدوگلیکان است که قادر به هیدرولیز اجزای پپتیدوگلیکان موجود در دیواره سلولی بوده و همچنین موجب جدا سازی سلول‌های دختری به دنبال تقسیم سلولی (از سلول مادری) است. این پروتئین دارای ناحیه آمیدازی وگلوکز آمینیدازی است که تحت برش پروتئولیتیک منجر به تولید دو هیدرولاز خارج سلولی پپتیدوگلیکان با نام‌های endo-b-N-acetylglucosaminidas(kDa51) و N-acetylmuramyl-L-alanine amidase(kDa62) می‌شود. این آنزیم‌ها در جدا شدن سلول‌های دختر بعد از تقسیم نقشی اساسی دارند (۶-۲).

در مطالعاتی که اخیرا انجام شده به نقش این پروتئین در تشکیل بیوفیلم (۷) و اتصال به سطح سلول‌ها اشاره شده است. لازم به ذکر است که سکانس اسید آمینه‌ای این پروتئین در سویه‌های استافیلوکوک در حد بالایی حفاظت شده است (۹-۷).

آزمایشات بالینی متعددی با کاندید مختلف واکسن (ایمونیزاسیون فعال و غیر فعال) با هدف افزایش تیتر آنتی بادی‌های اپسونیک علیه پلی ساکاریدهای سطحی باکتریایی، پروتئین‌ها و توکسین‌ها تاکنون ناموفق بوده است (۲, ۱۰). اغلب واکسن‌ها باعث تحریک پاسخ ایمنی هومورال شده است، با این حال نقش آنتی بادی‌های اپسونیک در عفونت نامشخص است. لذا ایمنی سلولی با تحریک T سل‌ها TH1/ TH17 برای کمک به ساخت یک واکسن کارآمد می‌تواند مورد توجه قرار گیرد (۱۲،۱۱). با توجه به درک ایمونولوژی استافیلوکوکوس اورئوس باید از برانگیختن همزمان ایمنی هومورال با توجه به فعالیت اپسونیک آنتی بادی و همچنین تحریک ایمنی سلولی در جهت ساخت یک کاندید واکسن کارآمد استفاده کرد. از آن جا که اتولیزین می‌تواند در القای پاسخ ایمنی موثر باشد، کاندید طراحی واکسن شد.

مواد و روشها

بیان پروتئین نوترکیب در حجم بالا

در ابتدا ، یک کلونی تک از باکتری *E.coli* BL21 حاوی پلاسمید pET24a-Autolysin در ۱۰ میلی لیتر محیط LB broth حاوی آنتی بیوتیک کانامایسین ۵۰µg/ml تلقیح شد و از این محیط به عنوان استارتر استفاده شد. روز بعد در یک ارلن، مقدار ۱۰۰۰ml محیط LB براث ریخته شد و ۱۰ میلی لیتر از کشت شبانه به آن اضافه شد. پس از رسیدن کدورت محیط کشت به OD حدود ۰/۶-۰/۴ در طول موج ۶۰۰ نانومتر (حدودا پس از دو ساعت)، ابتدا مقدار ۱ میلی لیتر از آن به درون یک میکروتیوب منتقل شد و با دور g×۱۰۰۰۰به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. این رسوب تحت عنوان کنترل قبل القا در الکتروفورز استفاده شد. سپس IPTG به غلظت ۱ میلی مولار به باقیمانده محیط کشت ادر ارلن اضافه شد و مجددا در انکوباتور شیکر دار قرار گرفت. ۴ ساعت پس از القاء، محیط کشت با دورg×۱۰۰۰۰به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس رسوب حاصله تا مرحله تخلیص پروتئین در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد.

تخلیص پروتئین

از آنجا که میزان حلالیت پروتیین تولید شده کم بوده و بیشتر آن به صورت Inclusion body است، از روش تخلیص به شیوه دناتوراسیون استفاده شد. ۵۰ میلی لیتر از رسوب حاصل از محیط کشت حاوی باکتری‌های القاء شده با IPTG پس از خروج از فریزر ۲۰- درجه سانتی گراد در۵ میلی لیتر از بافر لیزکننده (حاوی NaH2PO4، ۱۰۰ میلی مولار، Tris.CL ، ۱۰ میلی مولار و Urea، ۸ میلی مولار، pH = ۸) حل شد. پس از ده دقیقه سانتریفیوژ با دور g×۱۰۰۰۰ ، مایع رویی به فالکن دیگری منتقل شد و مقدار ۵۰۰ میلی لیتر از رزین آگارز NiNTA به آن اضافه شد و ۱ ساعت در دمای اتاق ارام تکان داده شد. پس از آن نمونه همراه با رزین به یک ستون خالی در حالیکه cap انتهایی آن بسته است منتقل شد. پس از ته نشین شدن رزین موجود در ستون، دو بار و هر بار با ۴ میلی لیتر از بافر شستشو (NaH2PO4، ۱۰۰ میلی مولار، Tris.CL، ۱۰ میلی مولار و Urea، ۸ میلی مولار،pH = ۶,۳) شسته شد. سپس ۴ بار بار و هر بار با ۰/۵ میلی لیتر از بافر تخلیص (NaH2PO4، ۱۰۰ میلی مولار، Tris.CL، ۱۰ میلی مولار و Urea ، ۸ میلی مولار، pH = ۴/۵) پروتیین متصل به رزین elute شده و در میکروتیوب جمع آوری شد. درنهایت پروتیین تخلیص شده با روش SDS-page و به وسیله وسترن بلات تایید شد. پس از تخلیص پروتئین Autolysin، دیالیز جهت حذف اوره و تعیین غلظت با نانودراپ، از این پروتئین در فرمولاسیون واکسن استفاده شد.

گروه‌های تجربی و واکسیناسیون موش‌ها

در این مطالعه از موش‌های ۶ تا ۸ هفته‌ای تهیه شده از انیستیتو پاستور کرج با وزن تقریبی۲۰ گرم استفاده شد. گروه بندی موش‌ها مطابق جدول ۱ صورت گرفت. تزریقات در سه نوبت در

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-10-30]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1400.31.2.11.1]
[DOI: 10.52547/iau.31.2.146]

روزهای ۰، ۱۴ و ۲۸ به صورت زیر پوستی انجام شد و حجم نهایی تزریق به هر موش در هر گروه به میزان ۱۰۰ میکرولیتر و دوز واکسن ۲۰ میکروگرم بود. قبل از شروع تزریقات و دو هفته پس از آخرین تزریق، از موش‌ها خون‌گیری (سینوس چشم) به عمل آمد. سرم‌ها جدا و برای سنجش عیار آنتی بادی و بررسی پاسخ های ایمنی مورد استفاده قرار گرفت (جدول ۱).

جدول ۱. گروه‌بندی موش های مورد مطالعه

گروه ها	واکسن	گروه بندی	دوز تزریق	حجم تزریق	تعداد موش
گروه ۱	اتولایزین + ادجوانت آلوم	تست	۲۰ میکروگرم	۱۰۰µl	۱۵
گروه ۲	اتولایزین + ادجوانت مونتانایید	تست	۲۰ میکروگرم	۱۰۰µl	۱۵
گروه ۳	PBS	کنترل	۲۰ میکروگرم	۱۰۰µl	۱۵

چالش حیوانات و سنجش میزان باکتری در کبد، طحال و کلیه‌ها

به منظور سنجش میزان بقای حیوانات ایمن نسبت به غیر ایمن در برابر دوز کشنده، از سویه‌های MRSA(Methicillin resistance staphylococcus aureus) COL strain، با دوز کشندگی LD50 (5×10^8cfu) استفاده شد. دوز کشندگی این سویه ابتدا با روش Reed and Munch تعیین شد، سپس 5×10^8cfu باکتری به صورت داخل صفاقی به تمامی گروه‌های مورد آزمایش تزریق شد. سه روز بعد از چالش باکتریایی، ۴ موش از هر گروه به صورت تصادفی انتخاب و به وسیله نخاعی بیهوش شدند. تحت شرایط استریل بعد از باز کردن شکم حیوان،کبد، طحال و کلیه‌های موش جدا شد. بعد از هموژنیزه کردن ارگان‌ها، از مایع درون پلیت رقت‌های سریالی تهیه شد و بر روی محیط LB Agar حاوی ۵۰µg/ml اگزاسیلین کشت و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد. سپس تعداد کلونی‌های رشد کرده در هر گروه با توجه به رقت آن مورد محاسبه قرار گرفت و میزان مرگ و میر و بقاء در ۳ گروه مذکور به مدت یک ماه پیگیری و ثبت شد.

سنجش IgG سرمی

به منظور سنجش سطح IgG توتال در بین گروه‌های مختلف از روش الایزای غیرمستقیم استفاده شد. سنجش عیار IgG سرمی و مقایسه عیار آنتی بادی القاء شده علیه اتولیزین نوترکیب در گروه‌های مختلف بر روی تک تک سرم‌های ایمن و غیرایمن مطابق مراحل زیر انجام پذیرفت؛ ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت ۱۰µg/ml محلول اتولیزین نوترکیب در بافر PBS به هر چاهک پلیت اضافه و در ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱۸ ساعت انکوبه شد تا کف چاهک‌ها با آنتی ژن مورد نظر به خوبی پوشیده شود. پس از گذشت زمان انکوبه شدن، چاهک‌ها سه بار با بافر PBS-T شستشو داده شدند. تمامی چاهک‌ها با ۲۰۰ میکرولیتر بافر مسدود کننده پر شده و به مدت دو ساعت انکوبه شد. پس از شستشو، ۱۰۰ میکرولیتر از هر رقت سرم‌های ایمن و غیرایمن (کنترل) به چاهک‌ها اضافه شد (از رقت ۱:۲۰ الی ۱:۲۵۶۰). سپس کونژوگه HRP در رقت ۱:۸۰۰۰ دربافر شیر خشک ۰/۵ ٪ تهیه و به میزان ۱۰۰ میکرولیتر به تمام چاهک‌ها اضافه شد و به مدت ۱ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد. پس از شستشو ۱۰۰ میکرولیتر از سوبسترا TMB به هر چاهک اضافه شد و پلیت‌ها در تاریکی انکوبه شدند. در نهایت ۱۰۰ میکرولیتر اسید سولفوریک ۱ مولار به هر چاهک اضافه و جذب نوری در ۴۵۰ نانومتر با دستگاه الایزا ریدر خوانده شد.

سنجش ایزوتایپ IgG1, IgG2a

پس از تعیین تیتر آنتی‌بادی توتال جهت تعیین ایزوتایپ آنتی بادی‌ها از کیت الایزای شرکت سیگما استفاده شد. مراحل تعیین ایزوتایپ IgG(IgG1, IgG2a) مشابه مراحل گفته شده در بالا است.

سنجش میزان سایتوکاین‌ها

برای بررسی پاسخ‌های سایتوکاینی IL-4 وIFN-γ از کیت‌های تجاری اختصاصی اندازه گیری سایتوکاین‌های موشی (Mabtech) به روش الایزا استفاده شد. با توجه به پروتکل کارخانه سازنده، مراحل انجام تست برای سنجش هر ۲ سایتوکاین یکسان است. مراحل انجام کار به طور خلاصه به این صورت بود که ۱۰۰ میکرولیتر از آنتی بادی اختصاصی هر سایتوکاین با رقت ۱:۱۰۰۰ به صورت جداگانه در هر پلیت اضافه شد و یک شب در دمای ۴ درجه سانتی گراد انکوبه شد. پس از شستشو و اضافه کردن ۲۰۰ میکرولیتر از بافر مسدودکننده، پلیت‌ها یک ساعت در دمای اتاق انکوبه شدند.

پس از شستشو، مقدار ۵۰ میکرولیتر از نمونه‌های سرم داخل چاهک‌ها ریخته و پلیت‌ها ۲ ساعت در دمای اتاق انکوبه شدند. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از Detection Antibody با رقت ۱:۱۰۰۰ به هر چاهک اضافه شدند. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از Streptavidin-HRP اضافه شد. پس از انکوباسیون و شستشوی مجدد، ۱۰۰ میکرولیتر از محلول سوبسترا (TMB) به هر چاهک اضافه و در تاریکی انکوبه شد. در نهایت ۱۰۰ میکرولیتر از محلول متوقف کننده (اسید سولفوریک) به هر چاهک اضافه و بلافاصله مقدار OD چاهک‌ها با الایزا ریدر در طول موج ۴۵۰ نانومتر خوانده شدند.

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-10-30]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1400.31.2.11.1]
[DOI: 10.52547/iau.31.2.146]

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-10-30]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1400.31.2.11.1]
[DOI: 10.52547/iau.31.2.146]

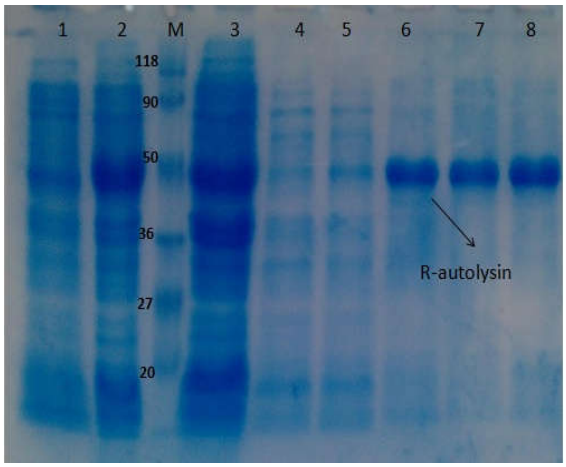
تحلیل آماری داده‌ها

جهت تحلیل داده‌ها از نرم افزار Graphpad prism 8 استفاده شد. داده‌های کمی بر اساس میانگین سه بار تکرار تحلیل شدند. داده‌های کمی به صورت میانگین و انحراف معیار و داده‌های کیفی به صورت فراوانی و درصد خلاصه شدند. داده‌های کمی از لحاظ دارا بودن توزیع نرمال بررسی و در صورت داشتن توزیع نرمال، از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه (One-Way ANOVA) و t-test با سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ استفاده شد.

یافته‌ها

تخلیص پروتئین نوترکیب

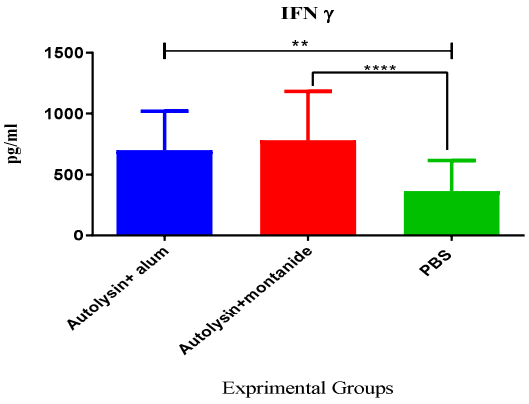
نتایج حاصل از تخلیص پروتئین نوترکیب اتولیزین بر روی ژل 12٪ SDS-PAGE ران شد تا باندهای حاصله مشاهده و تایید شدند (شکل ۱). پروتیین نوترکیب تولید شده با وزن تقریبی ۴۳ کیلو دالتون تایید شد.



شکل۱. نمونه تخلیص پروتئین بر روی ژل SDS-PAGE
چاهک ۱: لیزات باکتریایی حاصل از کلون نوترکیب القاء نشده (کنترل بیان)، چاهک ۳ و ۲ : لیز باکتریایی پس از القاء با بافردناتوره کننده، چاهک ۵ و ۴: مراحل شستشوی ستون با بافر شستشو چاهک ۸،۷،۶: مراحل Elution و خارج سازی اتولیزین نوترکیب از ستون تخلیص با رزین نیکل ،چاهک M : سایز مارکر

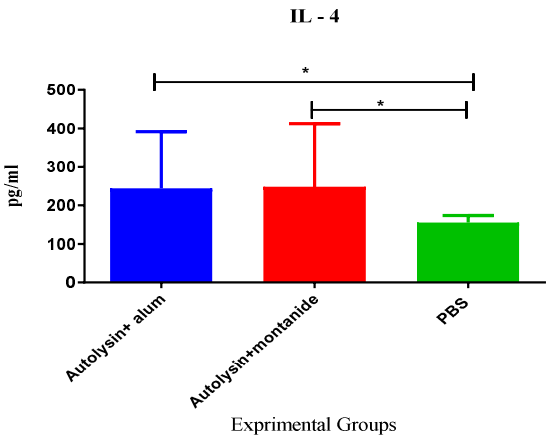
نتایج آنالیز سایتوکاین‌ها

نتایج بررسی IFN-γ نشان داد که بین گروه دریافت کننده اتولیزین-آلوم با گروه دریافت کننده PBS تفاوت معنی-داری وجود دارد (p=۰/۰۰۱۱). همچنین بین گروه دریافت کننده اتولیزین-مونتانایدبا گروه دریافت کننده PBS در میزان IFN-γ تفاوت معنی‌داری مشاهده شد (p<۰/۰۰۰۱). اما، بین گروه دریافت کننده اتولیزین-آلوم با گروه دریافت کننده اتولیزین-مونتانایدتفاوت معنی‌داری وجود نداشت (p=۰/۶۴) (نمودار ۱).



نمودار ۱. پاسخ های ایمنی سایتوکاین IFN-γ

نتایج بررسی IL-4 بین گروه دریافت کننده اتولیزین-آلوم با گروه دریافت کننده PBS تفاوت معنی‌داری را نشان داد (p=۰/۰۳). همچنین بین گروه دریافت کننده اتولیزین-مونتانایدبا گروه دریافت کننده PBS در میزان IL-4 تفاوت معنی‌داری مشاهده شد (p=۰/۰۲)، اما بین گروه دریافت کننده اتولیزین-آلوم با گروه دریافت کننده اتولایزین-مونتانایدتفاوت معنی‌داری نشان داده نشد (p=۰/۹۹) (نمودار ۲).

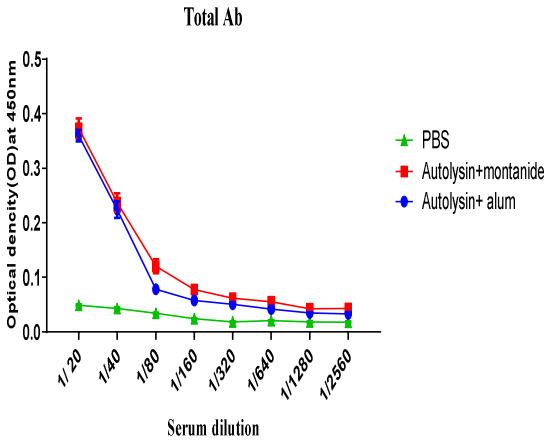


نمودار ۲. پاسخ‌های ایمنی سایتوکاین IL-4

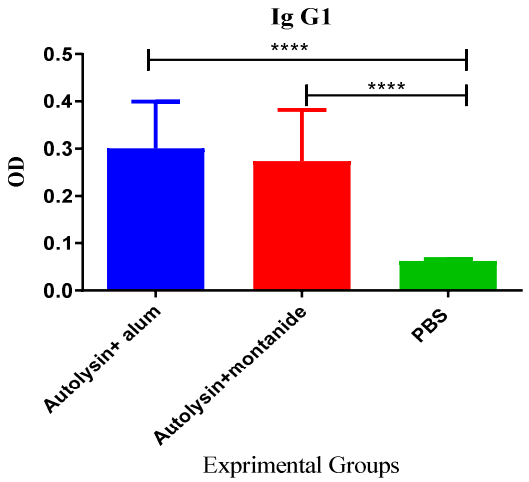
سنجش آنتی بادی توتال IgG

در مرحله اول پروتئین اتولیزین کوت شد و از تمامی سرم-ها به عنوان نمونه برای سنجش استفاده شد. بررسی نتایج نشان داد که بین گروه دریافت کننده اتولیزین-آلوم و اتولیزین-مونتانایدبا گروه دریافت کننده PBS در تمامی رقت‌ها تفاوت معنی‌دار است (p<۰/۰۰۰۱). اما بین گروه دریافت کننده اتولیزین-آلوم با گروه دریافت کننده

اتولیزین-مونتاناید، در تمامی رقت‌ها تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (p>۰/۰۵) (نمودار ۳).



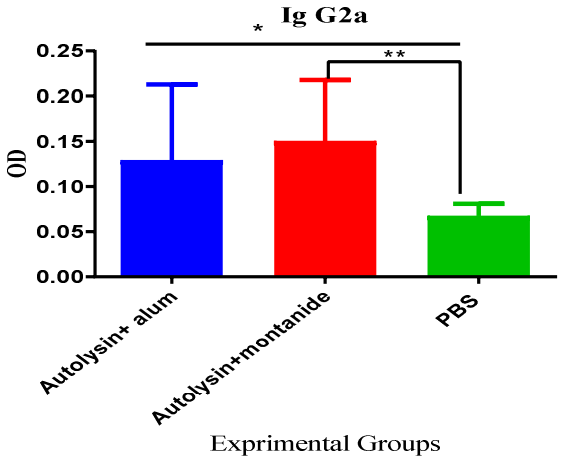
نمودار ۳. پاسخ‌های ایمنی آنتی بادی Total IgG



نمودار ۴. پاسخ‌های ایمنی ایزوتیپ IgG1

سنجش آنتی‌بادی IgG1 و IgG2a

نتایج حاصل از بررسی ایزوتایپ IgG1 نشان داد که گروه دریافت کننده فرمولاسیون اتولیزین-مونتاناید و اتولیزین-آلوم نسبت به گروه دریافت کننده PBS افزایش معنی‌داری را در سطح IgG1 نشان دادند (p<۰/۰۰۰۱) (نمودار ۴). بین گروه‌های دریافت کننده فرمولاسیون اتولیزین-مونتاناید نسبت به گروه دریافت کننده اتولیزین-آلوم افزایش معنی‌داری در سطح IgG1 مشاهده نشد (p=۰/۰۹). بین گروه دریافت کننده فرمولاسیون اتولیزین –آلوم نسبت به گروه‌های دریافت کننده PBS در سطح IgG2a افزایش معنی‌داری مشاهده شد (p=۰/۰۳). همچنین بین گروه دریافت کننده فرمولاسیون اتولیزین-مونتاناید نسبت به گروه دریافت کننده PBS افزایش معنی‌داری مشاهده شد (p=۰/۰۲). اما بین گروه دریافت کننده فرمولاسیون اتولیزین -آلوم نسبت به گروه‌های دریافت کننده اتولیزین-مونتاناید افزایش معنی‌داری در سطح IgG2a مشاهده نشد (p=۰/۱۴) (نمودار ۵).



نمودار ۵. پاسخ های ایمنی ایزوتیپ IgG2

بارمیکروبی

سه روز پس از چالش باکتریایی، ۴ موش از هر گروه به صورت کاملا تصادفی انتخاب و پس از کشته شدن موش‌ها، کلیه، کبد و طحال آنها خارج شد و تعداد باکتری‌ها در هر ارگان سنجیده شد.

در گروه‌های واکسینه شده با کاندید واکسن همراه ادجوانت آلوم و مونتانای، در مقایسه با گروه‌های کنترل میزان باکتری کمتری در اندام‌ها مشاهده شد (p<۰/۰۰۰۱).

نتایج این قسمت نشان می‌دهد که قدرت القای فرآیند اپسونوفاگوسیتوزیس و همچنین کاهش بار باکتریایی در بافت‌ها و ارگان‌های واکسینه با فرم فرموله شده در ادجوانت مونتاناید و آلوم بیشتر است.

بین گروه دریافت کننده فرمولاسیون اتولیزین -آلوم نسبت به گروه‌های دریافت کننده اتولیزین-مونتاناید تفاوت معنی-داری در میزان بار باکتری در ارگان‌های مختلف مشاهده نشد (p>۰/۰۵) (نمودار ۶).

میزان بقا

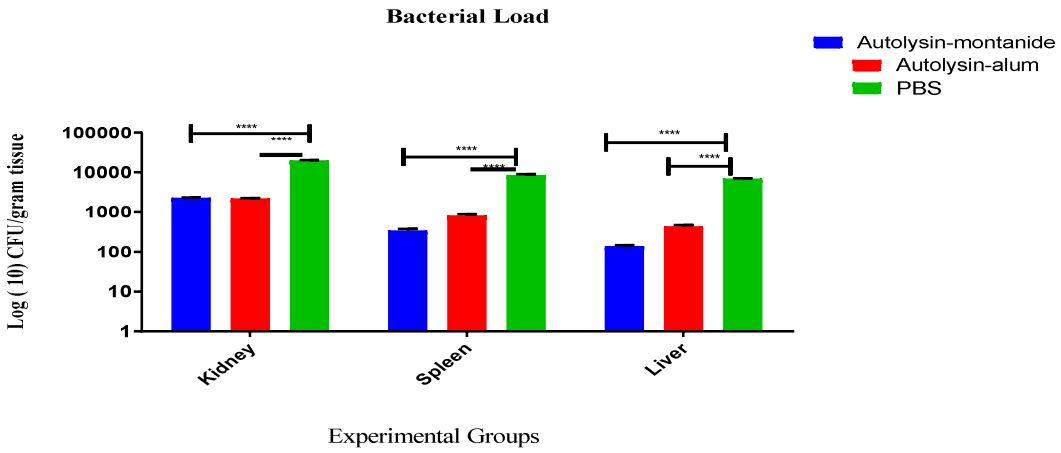
در این قسمت، چالش میکروبی به واسطه تاثیرگذاری واکسن کاندید اتولیزین-آلوم و اتولیزین-مونتاناید علیه دوز عفونی کننده MRSA انجام شد. نتایج به دست آمده نشان داد که ۷۰٪ از موش‌هایی که PBS دریافت کرده بودند، در

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-10-30]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1400.31.2.11.1]
[DOI: 10.52547/iau.31.2.146]

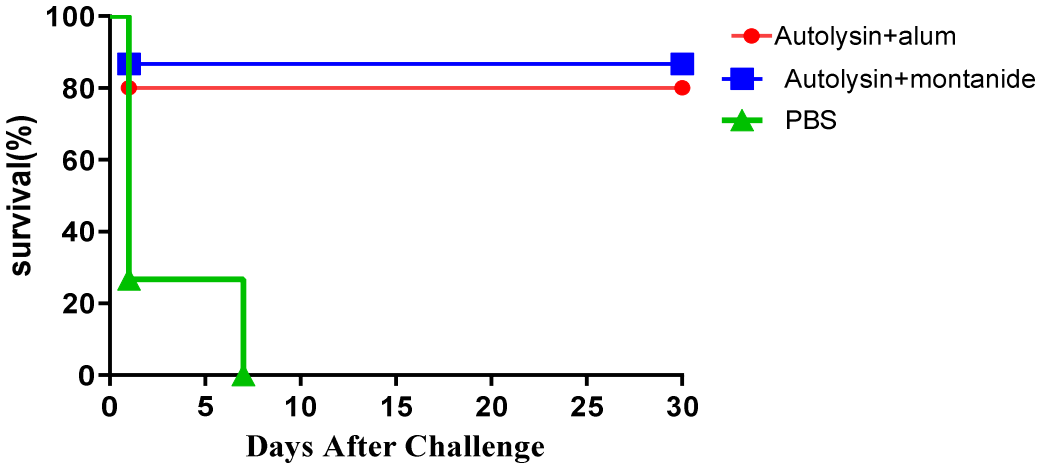
طول ۲ روز بعد از چالش مردند. درگروه‌های اصلی واکسن به همراه ادجوانت آلوم و مونتاناید، میزان مرگ و میر کمتر بود و به ترتیب ۸۰٪ و ۸۶٪ از موش‌ها در طی ۳۰ روز زنده ماندند. نتایج نشان داد که گروه‌های مورد مطالعه سطح بالایی از حفاظت اختصاصی ایمنی را در برابر مدل باکتریمی عفونت نشان می‌دهند (نمودار ۷).

بحث

در این مطالعه از مولکول اتولیزین به عنوان کاندید واکسن استفاده شد و پاسخ آنتی بادی ضداتولیزین را در مقابل عفونت های تجربی مورد بررسی قرار دادیم. همچنین در این مطالعه آنتی‌ژن با دو ادجوانت آلوم ومونتاناید ISA-266 فرموله شد. مطالعات نشان می‌دهند که آلوم، ادجوانت بسیار خوبی برای القاء پاسخ‌های آنتی بادی است. در واقع جذب پروتئین در سطح آلوم منجر به رسوب در محل تزریق می‌شود. در ادامه به دلیل تحریک سیستم ایمنی برای مدت چند هفته با آنتی ژن، سطح پاسخ ایمنی افزایش پیدا می‌کند. در مطالعات متعددی ادجوانت آلوم در واکسن‌های انسانی مورد استفاده قرار گرفته و به عنوان ادجوانت برای القاء پاسخ‌های آنتی بادی شناخته می‌شود (۱۵,۱۴). این مطالعات نشان می‌دهند که پاسخ آنتی بادی در کنترل عفونت‌های استافیلوکوکوس اورئوس بسیار حائز اهمیت است، به همین دلیل از ادجوانت آلوم در یکی از گروه‌های تجربی، به منظور بررسی توان القاء پاسخ‌های ایمنی



نمو.دار ۶. میانگین تعداد باکتری‌ها دربافت ارگان‌های موش‌های ایمن و غیر ایمن (نتایج به صورت میانگین تعداد باکتری‌ها در اندام‌ها به صورت ± خطای استاندارد نشان داده شده است).



نمودار ۷. میزان بقا گروه های مورد آزمایش بعد از چالش با دوز عفونی کننده MRSA.

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-10-30]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1400.31.2.11.1]
[DOI: 10.52547/iau.31.2.146]

استفاده شد. مطالعات متعددی نشان داده که مونتانايد-ISA 266 توانایی القاء پاسخ‌های ایمنی هومورال و سلولی را دارد (۱۶, ۱۷). در این مطالعه همچنین از مونتانايد ISA-266 استفاده شد، زیرا در کنترل عفونت استافیلوکوک هم ایمنی هومورال وهم ایمنی سلولی نقش دارد.

از آنجایی که افزایش بیان سایتوکاین‌ها شاخصی از نوع الگوی پاسخ سیستم ایمنی است، می‌توان از سایتوکاین ها به عنوان شاخص‌هایی جهت شیفت پاسخ ایمنی متعاقب واکسن‌ها استفاده کرد (۱۸). IFN-γ شاخص ایمنی سلولی و IL-4 شاخص ایمنی هومورال است، به طوری که نسبت IFN-γ به IL-4 یک شاخص برای تعادل پاسخ‌های Th1 به Th2 است (۱۸, ۱۹) ازسوی دیگر مطالعات متعددی نشان می‌دهند که IL-4 با افزایش آنتی بادی و IFN-γ با تحریک سیستم ایمنی سلولی در کنترل و پاکسازی عفونت‌های استافیلوکوک نقش دارد (۲۰). اما باید به این موضوع توجه داشت که درمحیط in vivo یک سایتوکاین نمی‌تواند نمایان‌گر نوع پاسخ ایمنی ایجاد شده علیه عامل پاتوژن باشد، بلکه یک شبکه سایتوکاینی است که نوع پاسخ ایمنی را تعیین می‌کند (۲۱). در مطالعه حاضر نتایج حاصل از IFN-γ نشان داد که در این پروفایل سایتوکاینی تفاوت چندانی بین گروه‌های دریافت کننده واکسن مشاهده نشد. درIL-4 نیز بین گروه‌های دریافت کننده واکسن تفاوت واضحی مشاهده نشد. به طوری که Campbell و همکارانش طی مطالعه‌ای که روی سلول‌های تک هسته‌ای خون کودکان مبتلا به درماتیت اتوپیک ناشی از استافیلوکوک اورئوس انجام دادند، علی رغم افزایش پاسخ تکثیری، کاهش معنی‌دار IFN-γ و افزایش معنی‌دار IL-4 را نسبت به گروه کنترل گزارش کردند (۲۲).

در نهایت نتایج سایتوکاین‌ها نشان داد که همه گروه‌های دریافت کننده واکسن توانایی القاءIL-4 و IFN-γ را داشته اند، که در این گروه‌ها این اختلاف با گروه PBS معنی‌دار بود.

نتایج حاصل از بررسی آنتی بادی توتال نشان داده است که گروه تجربی کاندید واکسن فرموله شده با اتولیزین و مونتانايد موجب افزایش معنی‌دار آنتی بادی توتال نسبت به PBS شد؛ این تفاوت معنی‌دار در تمام رقت‌ها (۱:۲۰ الی ۱:۲۵۶۰) مشاهده شد.

همچنین در تمامی رقت‌ها، گروه کاندید واکسن اتولایزین + آلوم در مقایسه با PBS افزایش معنی‌داری را در سطح توتال آنتی بادی نشان داد. این نتایج نشان می‌دهد که در گروهای تجربی کاندید واکسن، به ویژه گروه واکسن اتولیزین-مونتانايد و گروه واکسن اتولیزین-آلوم، با افزایش سطح توتال آنتی بادی موجب تقویت پاسخ های ایمنی ذاتی بوسیله تحریک B سل‌ها و متعاقب آن تولید پلاسماسل‌های تولید کننده آنتی بادی شده است. در نتیجه با تولید آنتی‌بادی‌های تام به طور معنی-دار در این گروه‌های واکسن تجربی می‌توان دریافت که آنتی بادی‌ها به ویژه ایمنوگلوبولین (IgM) با فعال کردن کمپلمان در سیتولیز و نوترالیزاسیون عفونت استافیلوکوکی نقش موثر داشته است. در مطالعه‌ای که توسط Haghighat و همکارانش در سال ۲۰۱۷ انجام گرفت، مشاهده شد فرمولاسیون اتولیزین با ادجوانت فروند موجب تقویت پاسخ ایمنی هومورال، افزایش سطح آنتی بادی، کاهش میزان باکتری در ارگان‌های داخلی و افزایش بقای موش‌ها دربرابر دوز کشنده MRSA شد، که نتایج حاصله با مطالعات آنها هم خوانی داشت (۱۰).

در پایان می‌توان این گونه نتیجه گرفت که با افزایش تولید توتال آنتی‌بادی‌ها (که شامل تمامی ایزوتایپ های آنتی بادی می‌شود) ایمنی هومورال با تمام عملکردهای بیولوژیک خود از جمله نوترالیزاسیون به وسیله مکانیسم ADCC، سیتولیز پاتوژن‌ها با تحریک موثر کمپلمان و اپسونیزاسیون پاتوژن‌ها برای عملکرد بهتر سلول‌های فاگوسیت کننده توانسته به طور موثری در پاک‌سازی عفونت‌های استافیلوکوکی ایفای نقش کند. در این میان اما، ادجوانت روغنی مونتانايد با قدرت بیشتری نسبت به آلوم توانسته پاسخ‌های ایمنی هومورال را در قالب تولید آنتی‌بادی توتال ایجاد کند. مطالعات نشان داده‌اند که ادجوانت روغنی مونتانايد با افزایش تیتر آنتی بادی قادر است تا پاسخ سیستم ایمنی را تحریک کند (۲۳).

همچنین در مطالعه دیگری ، Seung I. Jang و همکارانش نشان دادند که ادجوانت مونتانايد ISA71VG می‌تواند میزان آنتی بادی و متعاقب آن پاسخ ایمنی سلولی را افزایش دهد. سایر مطالعات نیز این مطلب را تصدیق می‌کنند که ادجوانت روغنی مونتانايد قادر است تولید آنتی بادی را افزایش دهد (۲۳, ۲۴).

نتایج حاصل از بررسی آنتی بادی ایزوتایپ IgG1 نشان داد که گروهی که فرمولاسیون اتولیزین به همراه مونتانايد را دریافت کردند، نسبت به گروه PBS افزایش معنی‌داری را در سطح IgG1 نشان دادند. در مطالعه‌ای، Gupta و همکارانش نشان دادند که ادجوانت آلوم و ترکیبات آن (آلومینیوم هیدروکسید و آلومینیوم فسفات) پاسخ ایمنی سلولی را به سمت Th2 می‌برد و تولید آنتی بادی IgG1 را افزایش می‌دهد (۲۵). این آنتی بادی علیه عفونت ناشی از استافیلوکوک در بدن وظایف متعددی از قبیل شرکت در فرایند ADCC، فعال کردن کمپلمان، اپسونیزاسیون و خنثی سازی را بر عهده دارد (۲۶).

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-10-30]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1400.31.2.11.1]
[DOI: 10.52547/iau.31.2.146]

به طوری که در سال ۲۰۱۸، Kwon و همکارانش نشان دادند که استفاده از داروی Thymol علیه درماتیت آتوپیک ناشی از استافیلوکوک سبب کاهش سطح سرمی IgG2a تولیدی علیه این عفونت می‌شود (۲۷). در مطالعه‌ای دیگر در سال ۲۰۱۸، Santos و همکارانش ارتباط بین تولید IgG2a و کاهش بار باکتری استافیلوکوک را نشان دادند (۲۸). نتایج حاصل از این آنتی بادی نیز نشان داد همه گروه‌های واکسینه توانستند سبب القای این زیرکلاس آنتی بادی شوند.

در مطالعه‌ای که توسط Kalali و همکارانش در سال ۲۰۱۹ انجام گرفت، آنتی بادی ضد اتولیزین توانست در روش ایمنی زایی غیرفعال باعث افزایش فعالیت اپسونوفاگوسیتوز و کاهش بار میکروبی در ارگان‌های داخلی شود که نشان دهنده این است که از این مولکول می‌توان به عنوان یک کاندید، هم در پیشگیری و هم در درمان عفونت‌های ناشی از استافیلوکوک اورئوس، استفاده کرد (۲).

در همین رابطه، نتایج حاصل از آزمون بارمیکروبی نشان داد که استفاده از واکسن کاندید اتولیزین-آلوم و اتولیزین-مونتاناید توانسته است به میزان قابل توجهی، بار میکروبی را در ارگان‌ها کاهش دهد. بنابراین، می‌توان گفت که اتولیزین به عنوان پروتئین مشتق شده از باکتری استافیلوکوکوس اورئوس موجب هم افزایی و تشدید اثر واکسن آلوم و مونتاناید در کاهش بار میکروبی در ارگان های داخلی شده است. همچنین، در این مطالعه چالش میکروبی نشان داد که واکسن اتولیزین-آلوم و اتولیزین-مونتاناید منجر به بقاء۸۰ تا ۸۶ درصدی موش‌هایی شد که MRSA دریافت کرده بودند. این سطح از حفاظت ایمنی به میزان چشمگیری در ارتباط با واکسن‌های مزبور دیده شد. بنابراین با توجه به نتایج بیان شده در بالا می‌توان دریافت که پروتئین اتولیزین از یک سو با کاهش بارمیکروبی در اندام‌های داخلی و از سوی دیگر با افزایش سطح پاسخرهای حفاظتی که منجر به افزایش بقاء شده است، می‌تواند گزینه مناسبی به عنوان کاندید واکسن علیه عفونت-های استافیلوک اورئوس باشد.

از این مطالعه می‌توان نتیجه گرفت که اتولیزین به عنوان یک کاندید واکسن، توانست میزان آنتی بادی را نسبت به گروه کنترل افزایش دهد و همچنین میزان بقاء را در گروه‌های دریافت کننده MRSA افزایش‌دهد. همچنین این واکسن توانست بار میکروبی را نیز در اندام‌های داخلی کاهش دهد. بنابراین، نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که اتولیزین قابلیت کاندید مناسب واکسن را دارد.

تشکر و قدردانی

از تمامی پرسنل محترم دانشکده‌های داروسازی و علوم و فناوری‌های نوین دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم پزشکی تهران، انستیتو پاستور تهران، انستیتو پاستور و آزمایشگاه تحقیقاتی آرک که با شکیبایی و صبر همکاری لازم را با اینجانب داشتند، کمال تشکر و قدردانی را دارم.

REFERENCES

1. Dajani AS, Gray ED, Wannamaker L.W. Bactericidal substance from Staphylococcus aureus: Biological properties. J Exp Med1970; 131: 1004-1015.

2. Kalali Y,Haghighat S, Mahdavi M, Passive immunotherapy with specific IgG fraction against autolysin: Analogous protectivity in the MRSA infection with antibiotic therapy. Immun Letters 2019; 212:125-131.

3. Foster TJ, Geoghegan JA, Ganesh VK, Hook M. Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of Staphylococcus aureus. Nat Rev Microbiol 2014; 12: 49.

4. Foster S.J, Molecular characterization and functional analysis of the major autolysin of Staphylococcus aureus 8325/4. J Bacteriol 1995;177: 5723-5725.

5. Haghighat S, Siadat SD, Rezayat Sorkhabadi SM, , Akhavan Sepahi A, Mahdavi M. A novel recombinant vaccine candidate comprising PBP2a and autolysin against Methicillin Resistant Staphylococcus aureus confers protection in the experimental mice. Mol Immunol 2017; 91: 1-7.

6. OshidaT, Takano M, Sugai M, Suginaka H, Matsushita T. Expression analysis of the autolysin gene (atl) of Staphylococcus aureus. Microbiology and Immunology 1998; 42: 655-659.

7. Heilmann C., Thumm G , Chhatwal G,S, Hartleib J, Uekotter,A, Georg Peters G. Identification and characterization of a novel autolysin (Aae) with adhesive properties from Staphylococcus epidermidis. Microbiology 2003;149:2769-2778.

8. Ingavale S, Van Wamel W, Cheung A. Characterization of RAT, an autolysis regulator in Staphylococcus aureus. Mol microbial 2003;48: 1451-1466.

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-10-30]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1400.31.2.11.1]
[DOI: 10.52547/iau.31.2.146]

9. Singh VK., Carlos MR, Singh K. Physiological significance of the peptidoglycan hydrolase, LytM, in Staphylococcus aureus. FEMS Microbiol Lett 2010;311: 167-175.

10. Haghighat S, Siadat SD, Rezayat Sorkhabadi SM, Akhavan Sepahi A, Mahdavi M. Cloning, expression and purification of autolysin from methicillin-resistant Staphylococcus aureus: potency and challenge study in Balb/c mice. Mol Immunol 2016;82:10-18.

11. Foster TJ, Immune evasion by staphylococci. Nat Rev Microbiol 2005;3:948-958.

12. Shannon O, Uekotter A, Flock J.I., The neutralizing effects of hyperimmune antibodies against extracellular fibrinogen-binding protein, Efb, from Staphylococcus aureus. Scand J Immunol 2006; 63:184-190.

13. Veldkamp KE, Strijp JA. Innate immune evasion by staphylococci. In: Fallon PG, Ed. Pathogen-Derived Immunomodulatory Molecules. New York: SpringerScience+Business Media,LLC; 2009.

14. Kool M, Soulliee T, Nimwegen M, Willart A.M, Muskens F, Jung S ,et al. Alum adjuvant boosts adaptive immunity by i nducing uric acid and activating inflammatory dendritic cells. J Exp Med 2008;205: 869-882.

15. Petrovsky N. Aguilar JC. Vaccine adjuvants: current state and future trends. Immunol Cell Biol 2004;82: 488-496.

16. Reed SG, Bertholet S, Coler RN, Friede M. New horizons in adjuvants for vaccine development. Trend Immunol 2009;30: 23-32.

17. Ching XT, Fong MY, Lau YL, Evaluation of Immunoprotection Conferred by the Subunit Vaccines of GRA2 and GRA5 against Acute Toxoplasmosis in BALB/c Mice. Front Microbiol 2016;7: 1-11.

18. Axelsson J, Rehman J, Akerstedt T, Rolf Ekman R, Miller EG. Hoglund O,C, et al. Effects of sustained sleep restriction on mitogen-stimulated cytokines, chemokines and T helper 1/ T helper 2 balance in humans. PLoS One 2013;8:1-8.

19.Boskabady MH, Mehrjardi SS, Rezaee A, Rafatpanah H, Jalali S. The impact of Zataria multiflora Boiss extract on in vitro and in vivo Th1/Th2 cytokine (IFN-gamma/IL4) balance. Ethnopharmacol J 2013;150:1024-31.

20. Greenlee-Wacker MC, Nauseef WM. IFN-gamma targets macrophage-mediated immune responses toward Staphylococcus aureus. J Leukoc Biol 2017;101: 751-758.

21. Joseph L, Fink LM, Hauer-Jensen M. Cytokines in coagulation and thrombosis: a preclinical and clinical review. Blood Coagul Fibrinolysis 2002. 13: 105-116.

22. Campbell ED, Kemp SA, Proliferation and production of interferon-gamma (IFN-γ) and IL□4 in response to Staphylococcus aureus and Staphylococcal superantigen in childhood atopic dermatitis. Clin Exp Immunol 1997; 107: 392-397.

23.Aucouturier, J, Dupuis L, Deville S, Ascarateil S, Ganne V, Montanide ISA 720 and 51: a new generation of water in oil emulsions as adjuvants for human vaccines. Expert Rev Vaccines 2002; 1: 111-118.

24.Jang SI, Kim KD, Lillehoj SH, Lee HS, Woo Lee K, Lillehoj PE, et al., Montanide ISA 71 VG adjuvant enhances antibody and cell-mediated immune responses to profilin subunit antigen vaccination and promotes protection against Eimeria acervulina and Eimeria tenella. Exp Parasitol 2011;127: 178-83.

25.Gupta RK. Aluminum compounds as vaccine adjuvants. Adv Drug Deliv Rev 1998;32:155-72.

26.Dryla A, Prustomersky S, Gelbmann D, Hanner M, Bettinger E, Kocsis B, et al., Comparison of antibody repertoires against Staphylococcus aureus in healthy individuals and in acutely infected patients. Clin Diagn Lab Immunol 2005;12: 387-98.

27. Kwon HI, Jeong HN, So Hyun Jun HS, Son HJ, Kim Sh, Jeon H, et al., Thymol attenuates the worsening of atopic dermatitis induced by Staphylococcus aureus membrane vesicles. Int Immunopharmacol 2018;59: p. 301-309.

28.Santos DPd, Muniz RPI, Queiroz FA, Pereira SI, Souza APM, Lima JL, et al. Individual variation is the key to the development of a vaccine against Staphylococcus aureus: a comparative study between mice lineages. Braz J Med Biol Res 2018;51:e6773.

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-10-30]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1400.31.2.11.1]
[DOI: 10.52547/iau.31.2.146]