

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

Mandana Bagherzadeh<sup>1</sup>, Setareh Haghghat<sup>2</sup>, Mehdi Mahdavi<sup>3</sup>

<sup>1</sup> MSc Student, Department of Microbiology, Faculty of Advanced Science and Technology, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran

<sup>2</sup> Assistant Professor, Department of Microbiology, Faculty of Advanced Science and Technology, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran

<sup>3</sup> Assistant Professor, Recombinant Vaccine Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

### 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 ( $1.5 \times 10^8$  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, Haghghat 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 Haghghat

**Tel:** +98 21-22640051-5

**E-mail:** setareh\_haghghat@yahoo.com

**ORCID ID:** 0000-0002-6605-5245

**Received:** 30 Jul 2020; **Accepted:** 11 Oct 2020

## بررسی ایمنی همورال و سلولی پروتئین نو ترکیب اتولیزین استافیلوکوکوس اورئوس در مدل موشی

ماندانا باقرزاده<sup>۱</sup>، ستاره حقیقت<sup>۲</sup>، مهدی مهدوی<sup>۳</sup>

<sup>۱</sup> دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران  
<sup>۲</sup> استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران  
<sup>۳</sup> 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 نو ترکیب اتولیزین، ۲۰ میکروگرم R-AutoLysin فرموله شده با ادجوانت‌های آلوم و مونتانید 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 تیترا آنتی بادی توتال، ایزوتایپ‌های IgG2، IgG1 و سایتوکاین‌های IL4 و IFN- $\gamma$  اندازه‌گیری شد. موش‌های آزمایشی با دوز  $10^8$  ACFU  $\times$  ۵ مورد چالش باکتریایی قرار گرفتند، سپس تعداد باکتری‌ها در ارگان‌های داخلی تعیین شد.

**یافته‌ها:** ایزوتایپ آنتی‌بادی‌های IgG2a و IgG1 در موش‌های واکسینه شده در مقایسه با گروه کنترل، افزایش معنی‌داری داشتند. همچنین سایتوکاین‌های IFN- $\gamma$  و IL-4 تفاوت معنی‌داری در گروه‌های مختلف واکسینه شده در مقایسه با گروه کنترل نشان دادند. میزان باکتری در اندام‌های داخلی موش‌های واکسینه شده ۱۰۰۰ بار کمتر از گروه‌های 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 استافیلوکوکوس اورئوس است.

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

### مقدمه

وجود می‌آورد. از آنجا که مقاومت نسبت به داروهای ضد میکروبی در حال 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). از طرفی استافیلوکوکوس اورئوس به روش‌های مختلفی در برابر مکانیسم‌های دفاعی بدن مقاومت کرده یا از آن می‌گریزد. با توجه به اهمیت استافیلوکوکوس اورئوس در عفونت‌های بیمارستانی، آگاهی از میزان تنوع ژنتیکی این باکتری‌ها در

استافیلوکوک اورئوس نوعی کوکسی گرم مثبت فاقد تحرک با قطر تقریبی ۰/۸ تا ۰/۱ میکرون است که در سه محور تقسیم شده و تجمعات نامنظم از سلول‌هایی شبیه به خوشه انگور را به

آدرس نویسنده مسئول: تهران، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین، واحد علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، 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

منطقه در برنامه‌های کنترل، پیشگیری، درمان و پیش‌آگهی از پیامد عفونت حائز اهمیت است (۲). تعداد زیادی از فاکتورهای ویروالانس در بروز عفونت و مقاومت این باکتری به آنتی‌بیوتیک‌ها دخیل هستند. اخیراً 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 باکتربولایتیک موجود در پپتیدوگلیکان است که قادر به هیدرولیز اجزای پپتیدوگلیکان موجود در دیواره سلولی بوده و همچنین موجب جدا سازی سلول‌های دختره به دنبال تقسیم سلولی (از سلول مادری) است. این پروتئین دارای ناحیه آمیدازی و گلوکز آمینیدازی است که تحت برش پروتئولیتیک منجر به تولید دو هیدرولاز خارج سلولی پپتیدوگلیکان با نام‌های endo-b-N-acetylmuramyl-L-acetylglucosaminidase (kDa51) و -alanine amidase (kDa62) می‌شود. این آنزیم‌ها در جدا شدن سلول‌های دختر بعد از تقسیم نقشی اساسی دارند (۶-۲).

در مطالعاتی که اخیراً 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 تیتراژ آنتی‌بادی‌های اپسونیک علیه پلی‌ساکاریدهای سطحی باکتریایی، پروتئین‌ها و توکسین‌ها تاکنون ناموفق بوده است (۲، ۱۰). اغلب واکسن‌ها باعث تحریک پاسخ ایمنی هومورال شده است، با این حال نقش آنتی‌بادی‌های 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 (۱۱، ۱۲). با توجه به درک ایمونولوژی استافیلوکوکوس اورئوس باید از برانگیختن همزمان ایمنی هومورال با توجه به فعالیت اپسونیک آنتی‌بادی 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 نو ترکیب 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

آنتی‌بیوتیک کانامایسین  $50 \mu\text{g/ml}$  تلقیح شد و از این محیط به عنوان استارتر استفاده شد. روز بعد در یک ارلن، مقدار ۱۰۰۰ ml محیط LB برات ریخته شد و ۱۰ میلی لیتر از کشت شبانه به آن اضافه شد. پس از رسیدن کدورت محیط کشت به OD حدود  $0.4-0.6$  در طول موج ۶۰۰ نانومتر (حدوداً پس از دو ساعت)، ابتدا مقدار ۱ میلی لیتر از آن به درون یک میکروتیوب منتقل شد و با دور  $10000 \times \text{g}$  به 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 مجدداً در انکوباتور شیکر دار قرار گرفت. ۴ ساعت پس از القاء، محیط کشت با دور  $10000 \times \text{g}$  به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس رسوب حاصله تا مرحله تخلیص پروتئین در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

### تخلیص پروتئین

از آنجا که میزان حلالیت پروتئین 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 سانتی‌گراد در ۵ میلی لیتر از بافر لیزکننده (حاوی  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ، ۱۰۰ میلی مولار، Tris.CL، ۱۰ میلی مولار و Urea، ۸ میلی مولار،  $\text{pH} = 8$ ) حل شد. پس از ده دقیقه سانتریفیوژ با دور  $10000 \times \text{g}$ ، 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 آرام 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 ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ، ۱۰۰ میلی مولار، Tris.CL، ۱۰ میلی مولار و Urea، ۸ میلی مولار،  $\text{pH} = 6.3$ ) شسته شد. سپس ۴ بار بار و هر بار با  $0.5/5$  میلی لیتر از بافر تخلیص ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ، ۱۰۰ میلی مولار، Tris.CL، ۱۰ میلی مولار و Urea، ۸ میلی مولار،  $\text{pH} = 4.5$ ) پروتئین متصل به رزین elute شده و در میکروتیوب جمع آوری شد. در نهایت پروتئین 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 تقریبی ۲۰ گرم استفاده شد. گروه بندی موش‌ها مطابق جدول ۱ صورت گرفت. تزریقات در سه نوبت در

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 در بافر 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 الیزا ریدر خوانده شد.

#### سنجش ایزوتایپ IgG1, IgG2a

پس از تعیین تیتراژ آنتی‌بادی توتال جهت تعیین ایزوتایپ آنتی‌بادی‌ها از کیت الیزای شرکت سیگما استفاده شد. مراحل تعیین ایزوتایپ IgG (IgG1, IgG2a) مشابه مراحل گفته شده در بالا است.

#### سنجش میزان سایتوکاین‌ها

برای بررسی پاسخ‌های سایتوکاینی IFN- $\gamma$  و IL-4 از کیت‌های تجاری اختصاصی اندازه گیری سایتوکاین‌های موشی (Mabtech) به روش الیزا 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 آنتی‌بادی 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 الیزا ریدر در طول موج ۴۵۰ نانومتر خوانده شدند.

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 آنتی‌بادی و بررسی پاسخ‌های ایمنی مورد استفاده قرار گرفت (جدول ۱).

#### جدول ۱. گروه‌بندی موش‌های مورد مطالعه

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

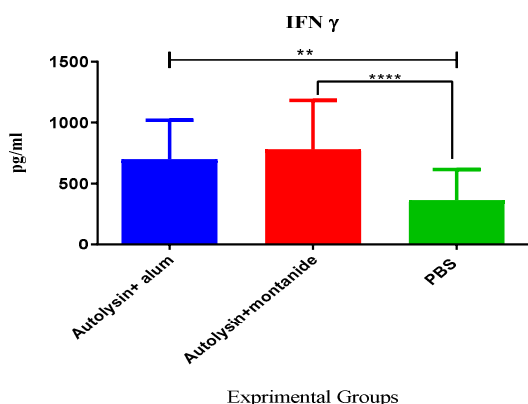
#### چالش حیوانات و سنجش میزان باکتری در کبد، طحال و کلیه‌ها

به منظور سنجش میزان بقای حیوانات ایمن نسبت به غیر ایمن در برابر دوز کشنده، از سویه‌های MRSA (Methicillin resistance staphylococcus aureus) COL strain کشندگی LD50 ( $5 \times 10^8$ cfu) استفاده شد. دوز کشندگی این سویه ابتدا با روش Reed and Munch تعیین شد، سپس  $5 \times 10^8$ cfu 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 اگراسیلین 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

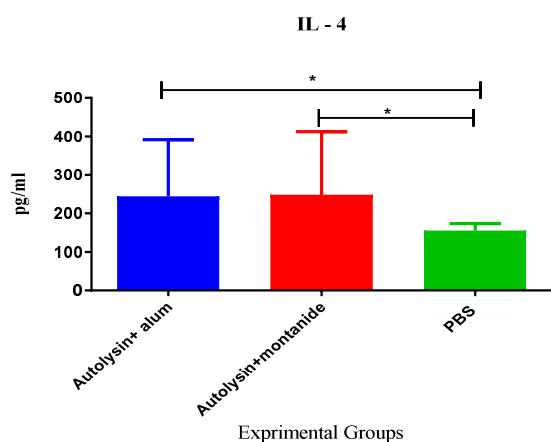
به منظور سنجش سطح IgG توتال در بین گروه‌های مختلف از روش الیزای غیرمستقیم استفاده شد. سنجش عیار IgG سرمی و مقایسه عیار آنتی‌بادی القاء شده علیه اتولیزین نوترکیب در گروه‌های مختلف بر روی تک تک سرم‌های ایمن و غیرایمن مطابق مراحل زیر انجام پذیرفت؛ ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت ۱۰µg/ml محلول اتولیزین نوترکیب در بافر PBS به هر چاهک

کننده اتولیزین-مونتانايد تفاوت معنی داری وجود نداشت (p=0/64) (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 معنی داری را نشان داد (p=0/03). همچنین بین گروه دریافت کننده اتولیزین-مونتانايد با گروه دریافت کننده PBS در میزان IL-4 تفاوت معنی داری مشاهده شد (p=0/02)، اما بین گروه دریافت کننده اتولیزین-آلوم با گروه دریافت کننده اتولیزین-مونتانايد تفاوت معنی داری نشان داده نشد (p=0/99) (نمودار ۲).



نمودار ۲. پاسخ های 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-مونتانايد با گروه دریافت کننده PBS در تمامی رقت ها تفاوت معنی دار است (p<0/001). اما بین گروه دریافت کننده اتولیزین-آلوم با گروه دریافت کننده

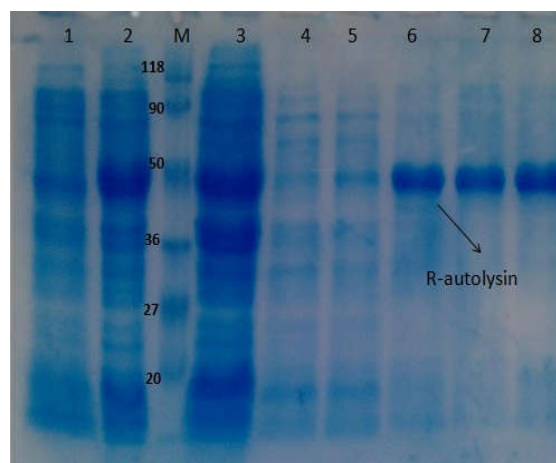
### تحلیل آماری داده ها

جهت تحلیل داده ها از نرم افزار Graphpad prism 8 استفاده شد. داده های کمی بر اساس میانگین سه بار تکرار تحلیل شدند. داده های کمی به صورت میانگین و انحراف معیار و داده های کیفی به صورت فراوانی و درصد خلاصه شدند. داده های 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 معنی داری کمتر از 0/05 استفاده شد.

### یافته ها

#### تخلیص پروتئین نو ترکیب

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



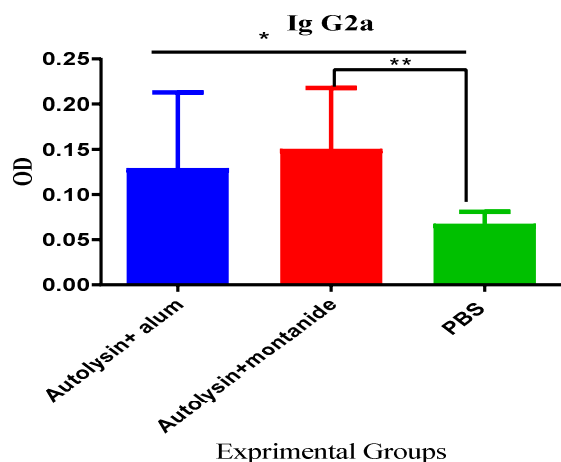
شکل ۱. نمونه تخلیص پروتئین بر روی ژل SDS-PAGE

چاهک ۱: لیزات باکتریایی حاصل از کلون نو ترکیب القاء نشده (کنترل بیان)، چاهک ۲ و ۳: لیز باکتریایی پس از القاء با بافردناتوره کننده، چاهک ۴ و ۵: مراحل شستشوی ستون با بافر شستشو چاهک ۸، ۷، ۶: مراحل Elution و خارج سازی اتولیزین نو ترکیب از ستون تخلیص با رزین نیکل، چاهک M: سایز مارکر

#### نتایج آنالیز سایتوکاین ها

نتایج بررسی IFN-γ نشان داد که بین گروه دریافت کننده اتولیزین-آلوم با گروه دریافت کننده PBS تفاوت معنی داری وجود دارد (p=0/0011). همچنین بین گروه دریافت کننده اتولیزین-مونتانايد با گروه دریافت کننده PBS در میزان IFN-γ تفاوت معنی داری مشاهده شد (p<0/0001). اما، بین گروه دریافت کننده اتولیزین-آلوم با گروه دریافت

گروه دریافت کننده PBS افزایش معنی داری مشاهده شد (p=۰/۰۲). اما بین گروه دریافت کننده فرمولاسیون اتولیزین-آلوم نسبت به گروه‌های دریافت کننده اتولیزین-مونتاناید افزایش معنی داری در سطح IgG2a مشاهده نشد (p=۰/۱۴) (نمودار ۵).



نمودار ۵. پاسخ های ایمنی ایزوتیپ IgG2

#### بار میکروبی

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 مونتانا، 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 مونتانا و آلوم بیشتر است.

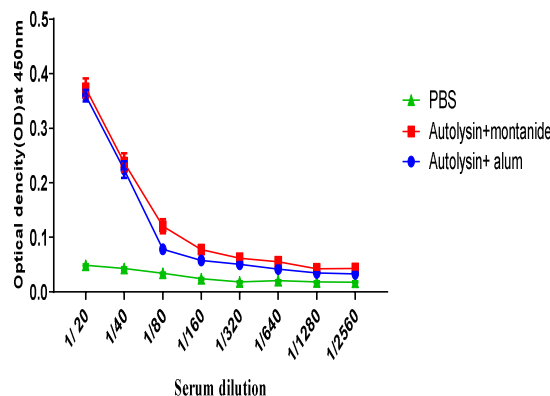
بین گروه دریافت کننده فرمولاسیون اتولیزین-آلوم نسبت به گروه‌های دریافت کننده اتولیزین-مونتانا تفاوت معنی-داری در میزان بار باکتری در ارگان‌های مختلف مشاهده نشد (p>۰/۰۵) (نمودار ۶).

#### میزان بقا

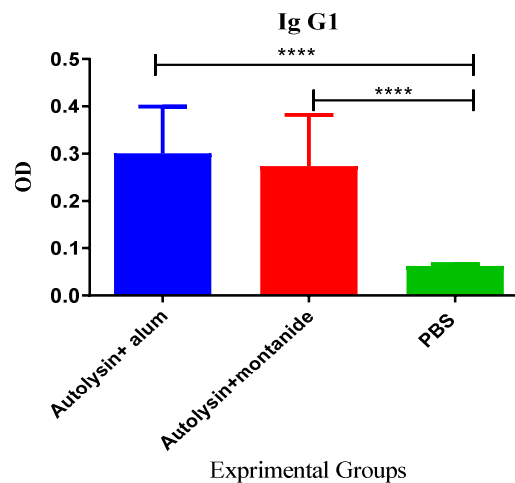
در این قسمت، چالش میکروبی به واسطه تاثیرگذاری واکسن کاندید اتولیزین-آلوم و اتولیزین-مونتانا علیه دوز عفونی کننده MRSA انجام شد. نتایج به دست آمده نشان داد که ۷۰٪ از موش‌هایی که PBS دریافت کرده بودند، در

اتولیزین-مونتانا، در تمامی رقت‌ها تفاوت معنی داری مشاهده نشد (p>۰/۰۵) (نمودار ۳).

#### Total Ab



نمودار ۳. پاسخ های ایمنی آنتی بادی Total IgG



نمودار ۴. پاسخ های ایمنی ایزوتیپ IgG1

#### سنجش آنتی بادی IgG2a و IgG1

نتایج حاصل از بررسی ایزوتیپ IgG1 نشان داد که گروه دریافت کننده فرمولاسیون اتولیزین-مونتانا و اتولیزین-آلوم نسبت به گروه دریافت کننده PBS افزایش معنی داری را در سطح IgG1 نشان دادند (p<۰/۰۰۰۱) (نمودار ۴). بین گروه‌های دریافت کننده فرمولاسیون اتولیزین-مونتانا نسبت به گروه دریافت کننده اتولیزین-آلوم افزایش معنی داری در سطح IgG1 مشاهده نشد (p=۰/۰۹).

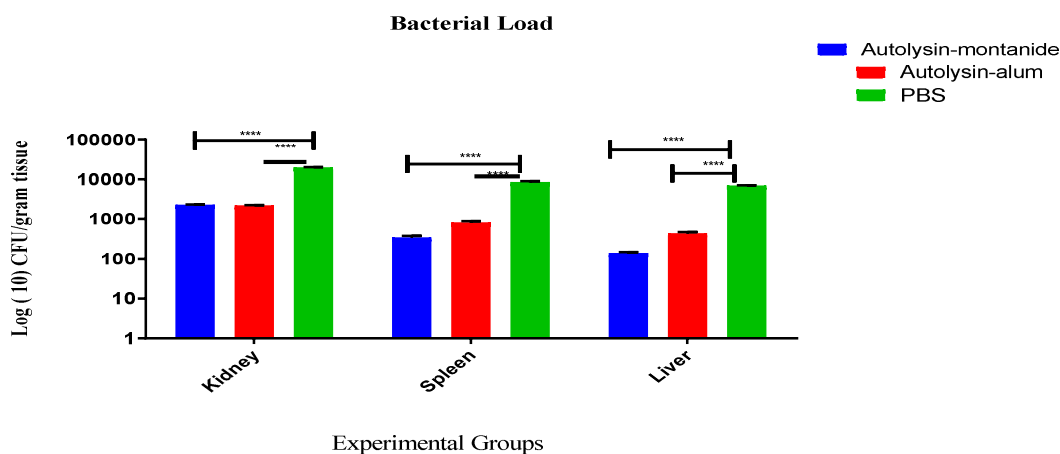
بین گروه دریافت کننده فرمولاسیون اتولیزین-آلوم نسبت به گروه‌های دریافت کننده PBS در سطح IgG2a افزایش معنی داری مشاهده شد (p=۰/۰۳). همچنین بین گروه دریافت کننده فرمولاسیون اتولیزین-مونتانا نسبت به

طول ۲ روز بعد از چالش مردند. در گروه‌های 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 باکتریایی عفونت نشان می‌دهند (نمودار ۷).

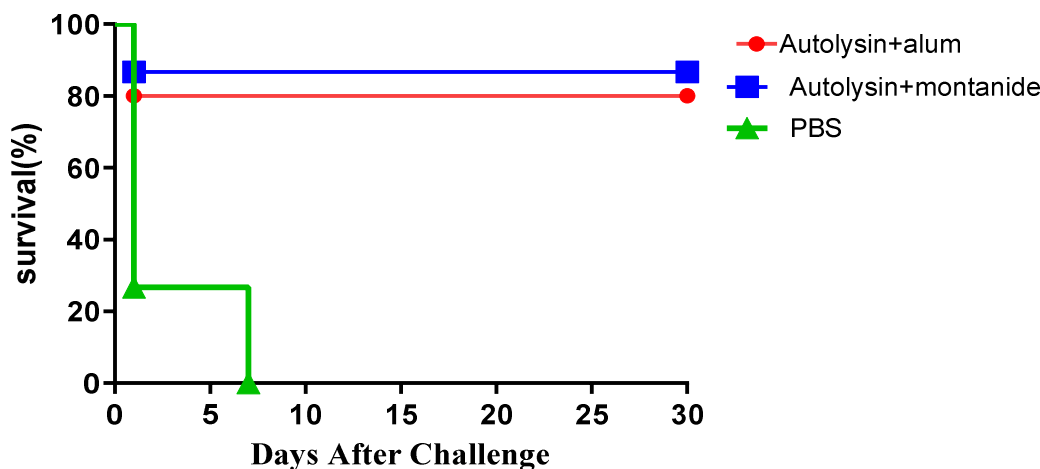
### بحث

در این مطالعه از مولکول اتولیزین به عنوان کاندید واکسن استفاده شد و پاسخ آنتی بادی ضد اتولیزین را در مقابل عفونت های تجربی مورد بررسی قرار دادیم. همچنین در این مطالعه

آنتی ژن با دو ادجوانت آلوم و مونتاناید 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 (۱۴، ۱۵). 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



نمودار ۶. میانگین تعداد باکتری‌ها در بافت ارگان‌های موش‌های ایمن و غیر ایمن (نتایج به صورت میانگین تعداد باکتری‌ها در اندام‌ها به صورت خطی استاندارد نشان داده شده است).



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

موجب تقویت پاسخ های ایمنی ذاتی بوسیله تحریک B سل ها و متعاقب آن تولید پلاسما سل های تولید کننده آنتی بادی شده است. در نتیجه با تولید آنتی بادی های تام به طور معنی- دار در این گروه های واکسن تجربی می توان دریافت که آنتی بادی ها به ویژه ایمنوگلوبولین (IgM) با فعال کردن کمپلمان در سیتولیز و نوترالیزاسیون عفونت استافیلوکوکی نقش موثر داشته است. در مطالعه ای که توسط Haghghat و همکارانش در سال ۲۰۱۷ انجام گرفت، مشاهده شد فرمولاسیون اتولیزین با ادجوانت فروند موجب تقویت پاسخ ایمنی همورال، افزایش سطح آنتی بادی، کاهش میزان باکتری در ارگان های داخلی و افزایش بقای موش ها در برابر دوز کشنده MRSA شد، که نتایج حاصله با مطالعات آنها هم خوانی داشت (۱۰).

در پایان می توان این گونه نتیجه گرفت که با افزایش تولید توتال آنتی بادی ها (که شامل تمامی ایزوتایپ های آنتی بادی می شود) ایمنی همورال با تمام عملکردهای بیولوژیک خود از جمله نوترالیزاسیون به وسیله مکانیسم ADCC، سیتولیز پاتوژن ها با تحریک موثر کمپلمان و اپسونیزاسیون پاتوژن ها برای عملکرد بهتر سلول های فاگوسیت کننده توانسته به طور موثری در پاک سازی عفونت های استافیلوکوکی ایفای نقش کند. در این میان اما، ادجوانت روغنی مونتانا با قدرت بیشتری نسبت به آوم توانسته پاسخ های ایمنی همورال را در قالب تولید آنتی بادی توتال ایجاد کند. مطالعات نشان داده اند که ادجوانت روغنی مونتانا با افزایش تیترا 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 مونتانا با ISA71VG می تواند میزان آنتی بادی و متعاقب آن پاسخ ایمنی سلولی را افزایش دهد. سایر مطالعات نیز این مطلب را تصدیق می کنند که ادجوانت روغنی مونتانا با 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 مونتانا با دریافت کردند، نسبت به گروه PBS افزایش معنی داری را در سطح IgG1 نشان دادند. در مطالعه ای، Gupta و همکارانش نشان دادند که ادجوانت آوم و ترکیبات آن (آلومینیوم هیدروکسید و آلومینیوم فسفات) پاسخ ایمنی سلولی را به سمت Th2 می برد و تولید آنتی بادی IgG1 را افزایش می دهد (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).

استفاده شد. مطالعات متعددی نشان داده که مونتانا با ISA-266 توانایی القاء پاسخ های ایمنی همورال و سلولی را دارد (۱۶، ۱۷). در این مطالعه همچنین از مونتانا با ISA-266 استفاده شد، زیرا در کنترل عفونت استافیلوکوک هم ایمنی همورال و هم ایمنی سلولی نقش دارد.

از آنجایی که افزایش بیان سایتوکاین ها شاخصی از نوع الگوی پاسخ سیستم ایمنی است، می توان از سایتوکاین ها به عنوان شاخص هایی جهت شیفت پاسخ ایمنی متعاقب واکسن ها استفاده کرد (۱۸). IFN- $\gamma$  شاخص ایمنی سلولی و IL-4 شاخص ایمنی همورال است، به طوری که نسبت IFN- $\gamma$  به IL-4 یک شاخص برای تعادل پاسخ های Th1 به Th2 است (۱۸، ۱۹) از سوی دیگر مطالعات متعددی نشان می دهند که IL-4 با افزایش آنتی بادی و IFN- $\gamma$  با تحریک سیستم ایمنی سلولی در کنترل و پاک سازی عفونت های استافیلوکوک نقش دارد (۲۰). اما باید به این موضوع توجه داشت که در محیط *in vivo* یک سایتوکاین نمی تواند نمایان گر نوع پاسخ ایمنی ایجاد شده علیه عامل پاتوژن باشد، بلکه یک شبکه سایتوکاینی است که نوع پاسخ ایمنی را تعیین می کند (۲۱). در مطالعه حاضر نتایج حاصل از IFN- $\gamma$  نشان داد که در این پروفایل سایتوکاینی تفاوت چندانی بین گروه های دریافت کننده واکسن مشاهده نشد. در IL-4 نیز بین گروه های دریافت کننده واکسن تفاوت واضحی مشاهده نشد. به طوری که Campbell و همکارانش طی مطالعه ای که روی سلول های تک هسته ای خون کودکان مبتلا به درماتیت اتوپیک ناشی از استافیلوکوک اورئوس انجام دادند، علی رغم افزایش پاسخ تکثیری، کاهش معنی دار IFN- $\gamma$  و افزایش معنی دار IL-4 را نسبت به گروه کنترل گزارش کردند (۲۲).

در نهایت نتایج سایتوکاین ها نشان داد که همه گروه های دریافت کننده واکسن توانایی القاء IL-4 و IFN- $\gamma$  را داشته اند، که در این گروه ها این اختلاف با گروه PBS معنی دار بود.

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

همچنین در تمامی رقت ها، گروه کاندید واکسن اتولیزین + آوم در مقایسه با PBS افزایش معنی داری را در سطح توتال آنتی بادی نشان داد. این نتایج نشان می دهد که در گروه های تجربی کاندید واکسن، به ویژه گروه واکسن اتولیزین-مونتانا با و گروه واکسن اتولیزین-آوم، با افزایش سطح توتال آنتی بادی



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 بار میکروبی در اندام‌های داخلی و از سوی دیگر با افزایش سطح پاسخ‌های حفاظتی که منجر به افزایش بقاء شده است، می‌تواند گزینه مناسبی به عنوان کاندید واکسن علیه عفونت‌های استافیلوکوک 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 افزایش دهد. 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.

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 بار میکروبی نشان داد که استفاده از واکسن کاندید اتولیزین-آلوم و اتولیزین-مونتانا می‌توانست 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 مونتانا در کاهش بار میکروبی در ارگان‌های داخلی شده است. همچنین، در این مطالعه چالش میکروبی نشان داد که واکسن اتولیزین-آلوم و اتولیزین-مونتانا منجر به بقاء ۸۰ تا ۸۶ درصدی

#### REFERENCES

- Dajani AS, Gray ED, Wannamaker L.W. Bactericidal substance from Staphylococcus aureus: Biological properties. *J Exp Med* 1970; 131: 1004-1015.
- Kalali Y, Haghigat 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.
- 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.
- Foster S.J, Molecular characterization and functional analysis of the major autolysin of Staphylococcus aureus 8325/4. *J Bacteriol* 1995; 177: 5723-5725.
- Haghigat 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.
- Oshida T, 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.
- 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.
- Ingavale S, Van Wamel W, Cheung A. Characterization of RAT, an autolysin regulator in Staphylococcus aureus. *Mol microbial* 2003; 48: 1451-1466.

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. Haghghat 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 inducing 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- $\gamma$ ) 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.