

## ارزیابی عملکرد ب‌ث‌ژ به همراه نانو سلنیوم سنتتیک به عنوان تقویت‌کننده در فرمولاسیون واکسن کاندید علیه استافیلوکوکوس اورئوس بر پایه‌ی IsdE در مدل موشی

فاطمه خسروانی پور<sup>۱</sup>، ستاره حقیقت<sup>۲</sup>، محمد حسین یزدی<sup>۳</sup>، سیدمهدی حسن زاده<sup>۴</sup>

### مقاله پژوهشی

### چکیده

**مقدمه:** استافیلوکوکوس اورئوس باعث ایجاد انواع عفونت‌های بیمارستانی و افزایش مرگ و میر ناشی از آن می‌شود. واکسیناسیون، یک روش مناسب برای مقابله با این عفونت‌ها است. آهن، نقش مهمی در پاتوژنز باکتری دارد. همچنین پروتئین IsdE به عنوان ناقل آهن (هم) و کاندید مناسب برای ایمن‌سازی در واکسن بشمار می‌رود. این مطالعه به بررسی اثر عملکرد ب‌ث‌ژ به همراه نانو سلنیوم سنتتیک به عنوان تقویت‌کننده در فرمولاسیون واکسن کاندید علیه استافیلوکوکوس اورئوس بر پایه IsdE و نقش ادجوانتی MF59 می‌پردازد.

**روش‌ها:** پس از بیان پروتئین IsdE توسط IPTG یک میلی‌مولار وستون نیکل جهت تخلیص، با استفاده از ادجوانت MF59 و کوادجوانت‌های ب‌ث‌ژ و نانوسلنیوم سنتتیک، فرمولاسیون کاندید واکسن انجام گرفت، به پنج گروه از موش‌های Balb/C سه دوز با فاصله‌ی دو هفته‌ای به صورت زیر جلدی تزریق شد. با روش الایزا میزان IgG کل و ایزوتایپ‌های IgG1 و IgG2a بررسی شد. موش‌های مورد مطالعه با دوز  $5 \times 10^8$  CFU مورد چالش باکتریایی قرار گرفتند. همچنین میزان بار باکتریایی در ارگان‌های داخلی شمارش شد و میزان بقای حیوانات به مدت ۳۰ روز مورد سنجش قرار گرفت.

**یافته‌ها:** IgG کل و ایزوتایپ‌های IgG1 و IgG2a در همه‌ی گروه‌های دریافت‌کننده‌ی کاندید واکسن نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری داشتند. میزان بار باکتریایی در ارگان‌های داخلی (کبد، کلیه و طحال) و همچنین میزان مرگ و میر موش‌ها در گروه IsdE+MF59+BCG+Nano-selenium نسبت به سایر گروه‌های ایمن شده و گروه کنترل کاهش معنی‌داری را نشان داد.

**نتیجه‌گیری:** نتایج نشان داد که ادجوانت MF59 به همراه کوادجوانت‌های ب‌ث‌ژ و نانوسلنیوم سنتتیک، منجر به افزایش ایمنی همورال علیه عفونت استافیلوکوکوس اورئوس می‌گردد.

**واژگان کلیدی:** پروتئین IsdE؛ MF59؛ ب‌ث‌ژ؛ نانوسلنیوم سنتتیک؛ واکسن کاندید/استافیلوکوکوس اورئوس

**ارجاع:** خسروانی پور فاطمه، حقیقت ستاره، یزدی محمد حسین، حسن‌زاده سیدمهدی. ارزیابی عملکرد ب‌ث‌ژ به همراه نانو سلنیوم سنتتیک به عنوان

تقویت‌کننده در فرمولاسیون واکسن کاندید علیه استافیلوکوکوس اورئوس بر پایه‌ی IsdE در مدل موشی. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۴۰۴؛ ۴۳ (۸۳۱): ۱۱۶۳-۱۱۵۱.

### مقدمه

استافیلوکوکوس اورئوس، کوکسی گرم مثبت و عامل بروز طیف گسترده‌ای از بیماری‌ها، از عفونت‌های ساده‌ی پوستی تا عفونت‌های کشنده نظیر: اوستئومیلیت، آرتريت چرکی، سندروم شوک سمی، اندوکاردیت، پنومونی و باعث مرگ و میر ناشی از این عفونت‌ها می‌شود که با توجه به مقاومت آنتی‌بیوتیکی به انواع آنتی‌بیوتیک‌ها مانند

(پنی‌سیلین، متی‌سیلین، ونکومايسين، جتامايسين، لینزولید) و سوء مصرف آن‌ها، درمان این باکتری پیچیده شده و تاکنون واکسن مؤثری برای آن وجود ندارد (۱). فاکتورهای ویروالانس استافیلوکوکوس اورئوس شامل پروتئین A، کپسول، پروتئین انتقال‌دهنده آهن و سمومی که در بیماری‌زایی آن نقش دارند، می‌باشند (۲). آهن، از عوامل اساسی در بیماری‌زایی و نیازهای فیزیولوژیکی از جمله انتقال اکسیژن و

۱- دانشجوی دکتری، گروه میکروبیولوژی، واحد علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲- دانشیار، گروه میکروبیولوژی، واحد علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۳- دانشیار، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

۴- استادیار، گروه تحقیق و توسعه، مجتمع تحقیقات و تولید، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

نویسنده‌ی مسؤول: ستاره حقیقت: دانشیار، گروه میکروبیولوژی، واحد علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

Email: haghghat.s@iau.ac.ir

متابولیسم همه پاتوژن‌ها می‌باشد، اما به دلیل کمبود آهن آزاد برای رفع محدودیت خود از طریق سیستم‌های جذب آهن متعدد، از منابع آهن میزبان استفاده می‌کنند.

*استافیلوکوکوس اورئوس*، از سیستمی تحت عنوان Iron-responsive surface determinant یا به اختصار (Isd) به عنوان مسیر اصلی جذب هم-آهن از پروتئین‌های میزبان از جمله هموگلوبین و میوگلوبین استفاده می‌کند (۳).

پروتئین (Isd) متشکل از نه عضو شامل ABC IsdA/IsdB/IsdC/IsdH/IsdE/IsdF/IsdG/IsdI و ناقل غشایی است که در داخل و خارج سلولی به صورت متصل گسترش یافته و از طریق غشای باکتری‌های گرم مثبت مسیر انتقال هم در سراسر دیواره سلولی طی می‌شود (۳). پروتئین IsdA در چسبندگی باکتری و انتقال آهن (هم) به IsdB، IsdC که گیرنده‌ی هموگلوبین در این سیستم و بیان آن در محیط‌های کمبود آهن باعث رشد باکتری است و IsdC به عنوان مجرای مرکزی سیستم جذب هم در دیواره سلول واسطه انتقال آهن از IsdA/B/H به سیستم انتقال غشایی IsdE/F می‌باشد و نیز IsdH که در جذب و آزاد سازی (هم) نقش دارد که این پروتئین‌ها با پیوند کووالانسی به مورثین حالت لنگر متصل می‌شوند و از پروتئین‌های سطحی دیواره سلولی هستند، IsdG و IsdI به عنوان آنزیم‌های تجزیه‌کننده‌ی هم در سیتوپلاسم می‌باشند.

همچنین IsdE به قسمت خارجی غشاء سیتوپلاسمی متصل است (۳). IsdE یک پروتئین اتصال‌دهنده و مؤلفه‌ی اصلی برای جذب هم در سیستم (Isd) می‌باشد (۴). پروتئین IsdE به عنوان یکی از ناقلین آهن به داخل سلول و عامل بیماری‌زایی در کاندید واکسن حائز اهمیت می‌باشد. سیستم‌های انتقال آهن در پاتوژن‌های گرم مثبت دیگر از جمله لیستریا مونوسیتوژنز و باسیلوس آنتراکسیس نیز مانند IsdE / استافیلوکوکوس اورئوس عمل می‌کنند (۵). با توجه به شکست واکسن‌های تولید شده بر علیه عفونت‌های استافیلوکوکوس اورئوس در مدل انسانی، استفاده از واکسن نو ترکیب بر پایه چند فاکتور بیماری‌زا و فرموله شده با ادجوانت‌های مؤثرتر امری ضروری به نظر می‌رسد (۶).

ادجوانت‌ها با تحریک انواع خاص از ایمنی و افزایش میزان عرضه آنتی‌ژن با حفظ ساختار آن باعث بهبود سطح پاسخ ایمنی و کاهش مضرات واکسن شده و جزء ضروری واکسن است (۷). ادجوانت‌های مختلفی با مکانیسم‌های متفاوت جهت استفاده در واکسن‌های آزمایشگاهی و تجاری تولید می‌شوند که فروند و آلوم و MF59 جز پرکاربردترین آن‌ها هستند (۸). ادجوانت‌های امولسیون روغنی MF59 اسکوالن طبیعی از کبد کوسه پس از خالص سازی با مشتقات طبیعی و ایمن کاملاً تثبیت شده باعث ایمنی کوتاه مدت می‌شود و در واکسن آنفولانزا توانایی ایمنی‌زایی واکسن را تا ۸۹ درصد بالا برده است (۹).

MF59 در مقایسه با ادجوانت آلوم در واکسن‌های هپاتیت B، آنفولانزای H5N1 و کزاز و دیفتی با القای سریع سیتوکین‌های التهابی IL-5 و IL-6 اثر کمک ادجوانتی بهتری را نشان داده است (۱۰). همچنین در فرمولا سیون کاندید واکسن علیه استافیلوکوکوس اورئوس ادجوانت‌های MF59 و فروند به همراه پروتئین IsdE سبب افزایش تولید سیتوکین‌هایی مانند IL2/IL17/IL4/ IFN $\gamma$  / TNF- $\alpha$  شده است (۴). این ادجوانت سلول‌های عرضه‌کننده آنتی‌ژن (APCs) از جمله ماکروفاژها، سلول‌های دندریتیک و سلول‌های B را در محل تزریق جذب می‌کند و متعاقباً سیگنال‌های فعال‌سازی ایمنی را به سلول‌های T، لنفوسیت و سلول‌های B منتقل می‌کند و با تأثیر بر آنتی‌بادی‌های IgG و تحریک CD4 و هدایت پاسخ سلول T به سمت تولید سیتوکین‌های مناسب باعث القاء پاسخ‌های سلول‌های T و B در حافظه‌ی طولانی مدت و افزایش ایمنی همورال می‌باشد (۱۰).

ادجوانت ب‌ث‌ژ که به دو فرم (ایترادرمال و ایترواسکولار) تولید می‌شود که از ایزوله بسیار بیماری‌زای میکوباکتریوم بویس با پاساژ طولانی به فرم غیر بیماری‌زا گرفته شده است و از کم خطرترین واکسن‌های مورد استفاده برای پیشگیری ۸۰ درصدی در نوزادان می‌باشد (۱۱). ب‌ث‌ژ به عنوان ادجوانت در واکسن‌های ترکیبی نظیر فلج اطفال (دهانی) و HBV باعث القای اختصاصی سیتوکین‌های مؤثر شده است (۱۲). ب‌ث‌ژ با ایجاد ایمنی سلولی (Th1) باعث ترشح INF $\gamma$  و تحریک ماکروفاژها و افزایش سطح MHC II و در نهایت منجر به ترشح IL-12 می‌شود (۱۳).

امروزه مطالعات مختلفی در سراسر دنیا در جهت افزایش کارایی ب‌ث‌ژ به همراه نانوذرات مختلف در حال انجام است. در مطالعه‌ی حاضر علاوه بر ب‌ث‌ژ از نانوذرات سلنیوم جهت بهبود عملکرد ب‌ث‌ژ در کاندید واکسن علیه استافیلوکوکوس اورئوس استفاده شد. با توجه به اینکه ادجوانت ب‌ث‌ژ همانند نانوسلنیوم سنتتیک باعث القای ایمنی سلولی می‌شود لذا همپوشانی این دو ادجوانت سبب ایجاد پاسخ ایمنی مؤثرتری در واکسن خواهد شد.

نانوذرات با محافظت از آنتی‌ژن‌های داخلی خود در برابر شرایط سخت نظیر پایین بودن pH و فعالیت آنزیم‌ها و نمک‌های صفراوی تحت عنوان ادجوانت کمکی نقش مهمی در اثربخشی واکسن ایفا می‌کنند. در واکسن‌های خوراکی و داخل بینی مؤثر هستند و در طیف وسیعی از کاربردهای پزشکی مورد مطالعه قرار گرفته‌اند (۱۴). نانوذره سلنیوم در دوزهای پایین جهت کاهش میزان سمیت در واکسن‌های مختلف برای بالا بردن سطح پاسخ ایمنی کمک می‌کند (۱۵).

مطالعات نشان دادند که نانو سلنیوم سنتتیک، فعالیت ضد باکتریایی در برابر پاتوژن‌های حیاتی انسانی از جمله استافیلوکوکوس اورئوس و سودوموناس آئروژینوزا داشته است (۱۶). با توجه به اینکه در مطالعات

گذشته، تأثیر ب‌ث‌ژ به عنوان ادجوانت کمکی به همراه نانو سلنیوم سنتتیک در واکسن کاندید علیه /ستافیلوکوکوس/ اورئوس بررسی نشده است، لذا در این بررسی به طور همزمان اثرات کوادجوانت‌های ب‌ث‌ژ و نانوذرات سلنیوم سنتتیک و ادجوانت MF59 در ترکیب فرمولا سین واکسن کاندید بر پایه پروتئین نوترکب IsdE در القاء بهتر پاسخ ایمنی همورال و تعدیل پاسخ‌های ایمنی طی چالش باکتریایی در مدل موشی ارزیابی قرار گرفت. همچنین میزان IgG کل و ایزو تایپ‌های IgG1، IgG2a مورد بررسی قرار گرفت و در پایان میزان بار باکتریایی اندام‌های داخلی موش‌ها و میزان بقاء یک ماهه به صورت روزانه مورد سنجش قرار گرفت.

### روش‌ها

#### الف) تولید پروتئین نوترکب IsdE:

جهت انجام این مطالعه، باکتری ترانسفورم شده *E.coli* BL21 حاوی پلاسمید ژن IsdE-PET24a که حاوی توالی کدکننده پروتئین نوترکب IsdE/ستافیلوکوکوس/ اورئوس است، از طرف خانم دکتر حقیقت در اختیار این پژوهش قرار گرفت (۴).

ابتدا باکتری *E.coli* BL21 حاوی پلاسمید ژن IsdE-PET24a به ۵ سی‌سی محیط کشت مایع LB براث (مرک آلمان) به همراه ۵ میکرولیتر آنتی‌بیوتیک کانامایسین (سیگما آلمان) (۵۰ mg/ml) اضافه شد. سپس کشت شبانه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شد. پس از گذشت ۲۴ ساعت برای بیان پروتئین IsdE، یک میلی‌لیتر باکتری *E.coli* حاوی پلاسمید مورد نظر (از کشت روز قبل) به یک ارلن حاوی ۱۰۰ سی‌سی محیط LB استریل و ۱۰۰ میکرولیتر آنتی‌بیوتیک کانامایسین، اضافه شد و ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شد، زمانی که باکتری به کدورت کشت (OD) حدود ۰/۶ الی ۰/۴ در طول موج ۶۰۰ نانومتر) رسید، ۱۰۰ میکرولیتر IPTG (فرمتاز، آمریکا) ۱ میلی‌مولار برای القای پروتئین به ارلن اضافه و بر روی انکوباتور شیکر در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. ۴ ساعت پس از القاء، محتویات را در دو فالكون ۵۰ سی‌سی استریل ریخته و با دور  $1300 \times g$  به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد و رسوب به دست آمده پس از جدا کردن از مایع رویی در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

**ب) تخلیص و تغلیظ پروتئین نوترکب:** با استفاده از روش دنا تراسیون و شیب pH، تخلیص پروتئین نوترکب انجام شد. به منظور تخلیص پروتئین، ۵۰ میلی‌لیتر از رسوب به دست آمده از محیط کشت حاوی باکتری‌های القاء شده در ۵ میلی‌لیتر از بافر لیزکننده حاوی NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>، ۱۰۰ میلی‌مولار، Tris.HCL، ۱۰ میلی‌مولار و Urea، ۸ میلی‌مولار با pH = ۸ حل شد و با دور

$1300 \times g$  به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ سپس به لوله فالكون استریل منتقل شد. به مایع رویی ۵۰۰ میلی‌لیتر رزین Ni-NTA (سیگما آلدريج) اضافه شد و در دمای اتاق به مدت یک ساعت روی دستگاه شیکر قرار گرفت. سپس به ستون کروماتوگرافی منتقل شد و پس از رسوب رزین در ستون، شستشوی دو مرحله‌ای با بافر شستشو (۶/۴ pH =) و هر بار ۴ میلی‌لیتر، انجام شد، جهت تخلیص، ۵۰۰ میکرولیتر از بافر تخلیص با pH = ۴/۵ به ستون اضافه و فرایند تخلیص انجام شد. جهت تأیید نمودن پروتئین نوترکب از SDS-PAGE (۱۲ درصد) استفاده شد. سپس فرایند دیالیز پروتئین به منظور حذف اوره انجام شد، بطوری‌که کیسه دیالیز حاوی محلول‌های پروتئین جمع‌آوری شده بصورت معلق در بافر PBS به مدت ۲۴ ساعت و تعویض هر ۲ ساعت بافر، قرار گرفت و حذف اوره و تغلیظ پروتئین IsdE انجام شد. سپس غلظت پروتئین با استفاده از دستگاه نانو درآپ و تست برادفورد تعیین شد (۴).

#### ج) تولید نانو سلنیوم سنتتیک:

برای سنتز نانو سلنیوم، به ۵/۲ میلی‌مولار دی‌اکسید سلنیوم (مرک، آلمان) در حال هم زدن (با همزن مغناطیسی) اسید اسکوربیک در محیط آبی (۵/۲ میلی‌متر) را به آرامی اضافه و بعد از ایجاد واکنش مخلوط فوق، سانتریفیوژ و سپس با آب مقطر سه مرتبه شستشو داده شد. در نهایت محلول یک میلی‌گرم در میلی‌لیتر نانو سلنیوم سنتتیک در PBS تولید شد که با تغییر رنگ محلول واکنش‌دهنده از سفید روشن به رنگ قرمز روشن درآمد. با سانتریفیوژ با دور  $1300 \times g$  به مدت ۳۰ دقیقه نانو پارتنیکل‌های سلنیوم جداسازی و در میکروتیوپ‌های ۱/۵ میلی‌لیتری در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (۱۷، ۱۸).

#### د) تعیین مشخصات ذرات نانو سلنیوم:

قطر ذرات نانو سلنیوم تولید شده (سنتتیک) در محلول آبی به وسیله DLS مشخص شد. شرایط کار با دستگاه طول موج لیزر ۷۸۰ نانومتر، ضریب شکست آب ۱/۳۳ در دمای اتاق انجام شد. ۰/۱ میلی‌لیتر از محلول نانو پارتنیکل سلنیوم به ۲ میلی‌لیتر آب دیونیزه اضافه و در دمای ۲۵ درجه در کوت دستگاه (DLS) قرار گرفت و خوانش انجام شد.

جهت آنالیز مورفولوژی نانو ساختارها از میکروسکوب الکترونی روبشی (SEM) استفاده شد.

#### ه) فرمولاسیون واکسن:

جهت فرمولاسیون کاندید واکسن، پروتئین نوترکب IsdE خالص شده با دوز ۲۰ میکروگرم با ادجوانت MF59 به نسبت ۵۰:۵۰ V/V در شرایط ورتکس با دور ۲۰۰۰ rpm به مدت زمان ۳۰ دقیقه به خوبی مخلوط شد تا یک امولسیون پایدار ایجاد شود، پس از

تمام حفرات غیر از بلانک ریخته سپس ۱۰۰ میکرولیتر IgG کوئزوگه با HRP (سیگما، ایالات متحده آمریکا) به تمام چاهک‌ها اضافه شد و پس از گرماگذاری به مدت ۹۰ دقیقه در ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و بار شستشو، ۱۰۰ میکرولیتر از سویسترای TMB به چاهک‌ها اضافه و پلیت‌ها ۳۰-۲۰ دقیقه در محیط تاریک گرماگذاری شد. برای متوقف نمودن واکنش به حفرات اسید سولفوریک ۲ نرمال اضافه شد و بلافاصله در طول موج ۴۵۰ نانومتر، جذب نوری به وسیله‌ی دستگاه الایزایدر (Stat FAX 4200, USA) قرائت شد.

### ح) سنجش میزان ایزوتیپ‌های IgG2a, IgG1:

سطح ایزو تایپ‌های IgG2a, IgG1 با روش الایزا، مطابق دستورالعمل کیت الایزای شرکت سیگمای آلمان ارزیابی شد و کلیه‌ی مراحل که در بخش سنجش تیتراژ آنتی‌بادی گفته شد، برای تعیین غلظت ایزوتایپ آنتی‌بادی‌ها نیز در این قسمت به‌طور کامل انجام گردید.

### ط) چالش باکتریایی:

سه هفته بعد از آخرین تزریق جهت ارزیابی میزان بقای موش‌های مورد مطالعه، به همی‌گروه‌های موشی به صورت داخل صفاقی (IP) از دوز کشنده‌ی استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین سویه COL strain به میزان ۰/۵ میلی‌لیتر با کشندگی LD50 (CFU  $5 \times 10^8$ ) تزریق و میزان مرگ و میر موش‌ها در بازه‌ی زمانی ۳۰ روزه ثبت گردید.

### ی) بار باکتریایی در ارگان‌های داخلی:

۳ روز بعد از آلودگی موش‌ها با دوز عفونی و کشنده، از هر گروه ۴ موش به صورت تصادفی انتخاب و به صورت نخاعی بی‌هوش شدند و تحت شرایط استریل کبد، کلیه و طحال خارج شد و سپس هموژن گردید و میزان بار باکتریایی هر کدام از ارگان‌های (کبد، کلیه و طحال) در رقت‌های ۱۰، ۱۰۰ و ۱۰۰۰ ارزیابی شد و شمارش تعداد کلنی‌های رشد یافته بر اساس واحد CFU/gram tissue رقت در هر گروه انجام گردید.

نتایج نمونه‌ها بر اساس تجزیه و تحلیل داده‌های آماری با نرم‌افزار GraphPad Prism 10 آنالیز شد. داده‌های کمی به صورت میانگین (سه تکرار) و انحراف استاندارد و داده‌های کیفی به صورت نمودار فراوانی و درصد خلاصه شد. برای توزیع نرمال در نتایج کمی، از آزمون آنالیز واریانس (Two-way ANOVA) و T-test با سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ استفاده شد.

### یافته‌ها

**الف) تخلیص پروتئین نوترکب:** بالاترین سطح بیان پروتئین نوترکب IsdE، بر اساس آنالیز SDS-PAGE پس از ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد با القای IPTG یک میلی‌مولار پدیدار

این مرحله، کوادجوانت ب‌ثژ (تهیه شده از انستیتو پاستور تهران) و کوادجوانت نانو سلنیوم سنتتیک به این فرمولا سیون ۱ اضافه گردید و فرایند مخلوط شدن به مدت ۳۰ دقیقه در دور rpm ۱۰۰۰ ادامه یافت. میزان تزریق به ازای هر موش ۲۰۰ میکرولیتر در نظر گرفته شد، که حاوی ۲۰ میکروگرم آنتی‌ژن و ۱۰۰ میکروگرم از ادجوانت و کوادجوانت می‌باشد.

**و) بر سی درون‌تنی:** تعداد ۸۰ سر موش Balb/C ماده، ۶ تا ۸ هفته‌ای از انستیتو پاستور کرج تهیه شد. کلیه آزمون‌ها در کمیته‌ی اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی (IR.IAU.AEC.1403.015) تأیید شد. موش‌ها به مدت یک هفته جهت عادت به شرایط محیط (آب و غذای مخصوص و دوره‌های منظم ۱۲ ساعته روشنایی/ تاریکی و تحت دمای محیط) در قفس‌های مجزای حیوان خانه به تعداد معین به صورت تصادفی تقسیم و نگهداری شدند. موش‌ها در پنج گروه (هر گروه ۱۶ سر موش) جهت تزریق مطابق فرمول زیر تقسیم‌بندی شدند:

گروه ۱: پروتئین IsdE+MF59

گروه ۲: پروتئین IsdE+MF59 + نانو سلنیوم سنتتیک

گروه ۳: پروتئین IsdE+MF59 + ب‌ثژ

گروه ۴: پروتئین IsdE+MF59 + ب‌ثژ + نانو سلنیوم سنتتیک

گروه ۵: PBS

تزریق زیر جلدی با ترکیب پروتئین نوترکب IsdE به عنوان آنتی‌ژن و ادجوانت MF59 و کوادجوانت‌های ب‌ثژ به همراه نانو سلنیوم سنتتیک به عنوان تقویت‌کننده سه بار هر کدام با فواصل ۲ هفته‌ای انجام شد.

۲ هفته بعد از آخرین تزریق بو سیله‌ی پیپت پاستور خونگیری از سینوس چشم (رترواوریبال) گروه‌های موشی انجام گرفت و در نهایت با استفاده از سانتریفیوژ ( $1000 \times g$ , ۱۰ دقیقه) سرم‌های موشی جدا شده و در فریزر -۲۰ درجه‌ی سانتی‌گراد برای سنجش و بررسی ایمنی همورال نگهداری شد.

### ز) سنجش میزان Total IgG (کل):

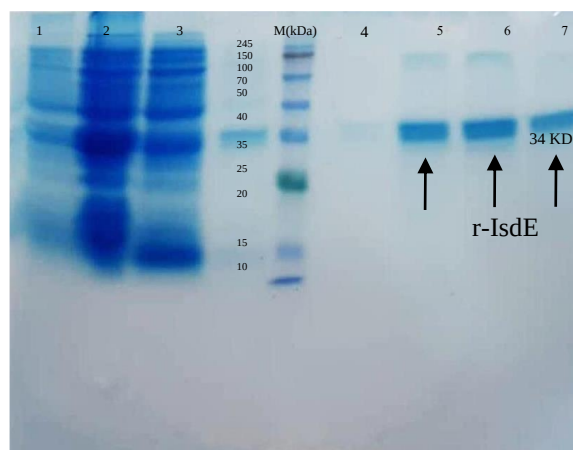
سنجش آنتی‌بادی‌های اختصاصی IgG کل و IgG2a, IgG1 بر روی سرم موش‌ها توسط کیت الایزا انجام شد. غلظت ۱۰۰ میکرولیتر از IsdE با PBS، ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تنظیم شد و در چاهک‌های ۹۶ خانه‌ای (گرینر، آلمان) کوت و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد گرماگذاری شد. پلیت‌ها ۳ بار با بافر PBS حاوی ۰/۰۵ درصد توئین ۲۰ (سامچون، کره جنوبی) شستشو و سپس بافر مسدودکننده PBS حاوی ۲ درصد شیر خشک بدون چربی و ۰/۰۵ درصد توئین ۲۰ داخل تمام حفرات ریخته شد و پلیت‌ها برای یک ساعت در ۳۷ درجه گرماگذاری شدند. پس از شستشو، ۱۰۰ میکرولیتر از سرم موش رقیق شده از رقت (۱/۲۵\_۱/۳۲۰۰) به

نانوذرات سلنیوم دارای سطح کروی هستند و DLS نشان داد که اندازه‌ی متوسط ذرات کمتر از ۱۰۰ نانومتر با ضریب توزیع (PDI) کمتر از ۰/۵ است. بار سطحی نانوذرات سلنیوم سنتز شده  $22 \pm 2$ - تعیین شد (شکل ۲).

**ج) سنجش IgG کل:** در نتایج ارزیابی IgG کل سرم بین همه‌ی گروه‌های موشی ایمن شده (IsdE+MF59+BCG، IsdE+MF59+Nano-selenium، IsdE+MF59+BCG+Nano-selenium) تفاوت معنی‌داری وجود دارد ( $P < 0/0001$ ).

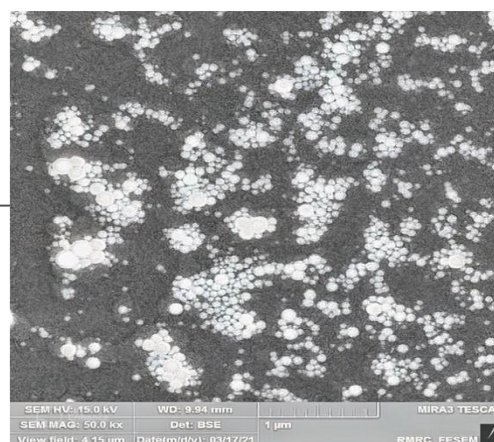
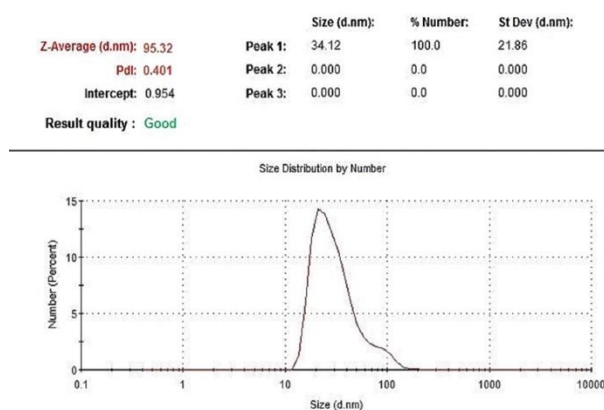
در مقایسه با گروه کنترل (PBS) از رقت ۱/۲۵ تا رقت ۱/۸۰۰ افزایش معنی‌داری وجود دارد ( $P < 0/0001$ ). در سطح IgG کل تا رقت ۱/۸۰۰ بین گروه دریافت‌کننده‌ی IsdE+MF59+BCG+Nano-selenium و گروه دریافت‌کننده‌ی IsdE+MF59+BCG تفاوت معنی‌داری مشاهده شد ( $P = 0/0008$ ). در گروه IsdE+MF59+BCG+Nano-selenium تا رقت ۱/۴۰۰ نسبت به گروه IsdE+MF59+Nano-selenium افزایش معنی‌دار مشاهده شد ( $P < 0/0001$ ). گروه IsdE+MF59+BCG+Nano-selenium نسبت به گروه IsdE+MF59+BCG تا رقت ۱/۴۰۰ اختلاف معنی‌داری نشان داد ( $P = 0/0012$ ). بین گروه دریافت‌کننده‌ی IsdE+MF59+BCG و گروه IsdE+MF59+Nano-selenium تا رقت ۱/۴۰۰ اختلاف معنی‌دار است ( $P < 0/0001$ ). بین گروه IsdE+MF59 و گروه IsdE+MF59+Nano-selenium از رقت ۱/۵۰ تا رقت‌های ۱/۴۰۰ تفاوت معنی‌داری مشاهده نشده است ( $P = 0/9233$ ). در سطح IgG کل از رقت ۱/۸۰۰ تا رقت ۱/۳۲۰۰ در هیچ یک از گروه‌های ایمن شده در مقایسه با یکدیگر اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ( $P < 0/9999$ ) (شکل ۳).

شد. بعد از بیان پروتئین نوترکیب IsdE، تخلیص آن‌ها با استفاده از ستون آگارز Ni-NTA بر اساس کروماتوگرافی جذبی انجام پذیرفت و نتایج بر روی ژل SDS-PAGE وزن تقریبی پروتئین نوترکیب تخلیص شده را ۳۴ کیلو دالتون نشان داد. نتایج سنجش پروتئین نوترکیب IsdE پس از تخلیص در شکل ۱ مشخص شده است.

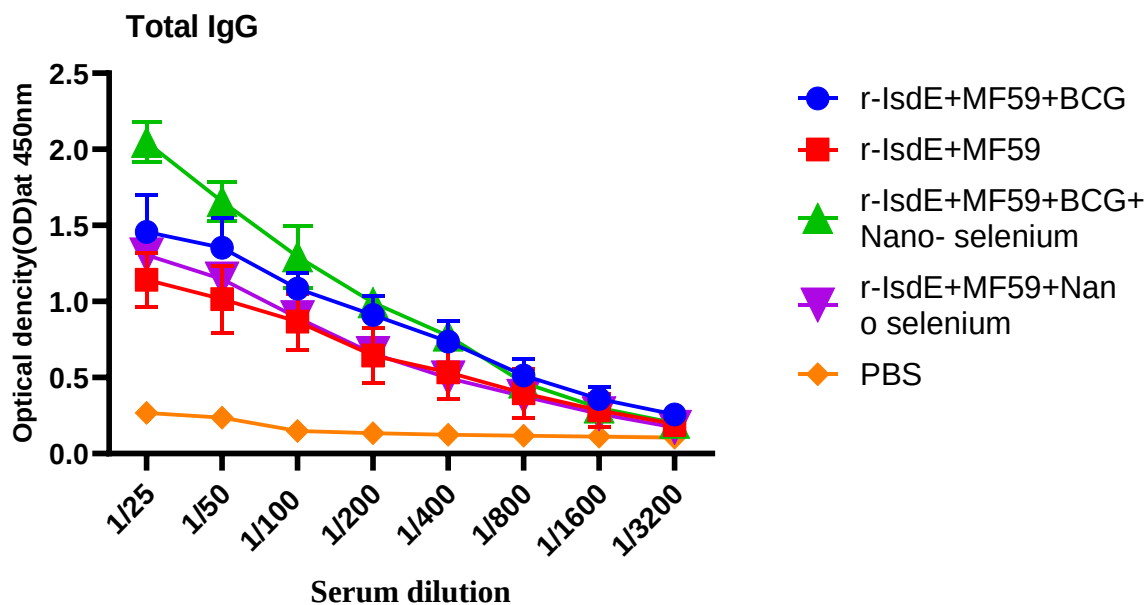


شکل ۱. سنجش پروتئین نوترکیب (r-IsdE) با وزن ۳۴ کیلو دالتون بر روی ژل ۱۲ درصد SDS-PAGE. ستون ۱ قبل از القا، ستون ۲ و ۳ پس از القای ۴ ساعته، ستون (M) سایز مارکر، ستون ۴ شستشو با بافر شستشوی چاهک. ستون ۵ و ۶ پروتئین تخلیص شده IsdE با ستون کروماتوگرافی Ni-NTA و ستون ۷ نشان‌دهنده‌ی پروتئین نوترکیب IsdE پس از فرایند دیالیز می‌باشد. فلش‌ها نشان‌دهنده‌ی r-IsdE هستند.

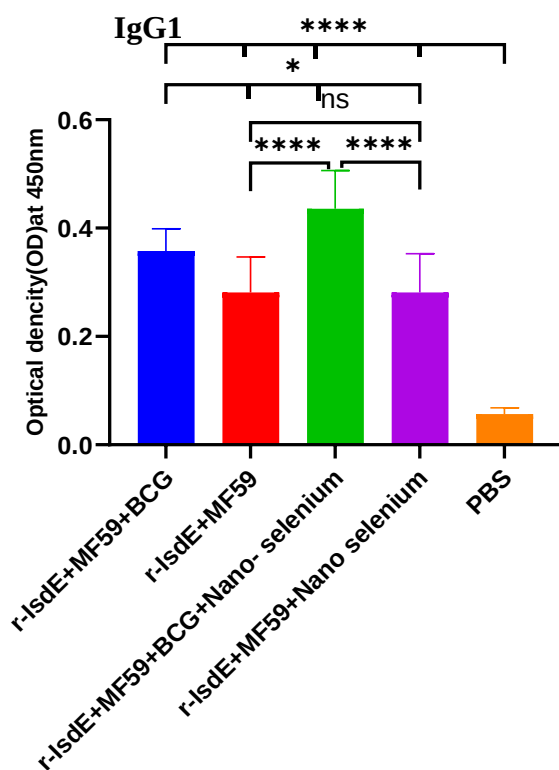
**ب) تعیین مشخصات نانو ذره سلنیوم:** شکل و اندازه‌ی نانوذره سنتز شده با استفاده از میکروسکوب الکترونی روبشی (SEM) و پراکندگی نوری دینامیکی (DLS) اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد که



شکل ۲. تعیین شکل و سایز نانوذرات سلنیوم با استفاده از میکروسکوب الکترونی روبشی (SEM) و پراکندگی نوری دینامیکی (DLS).



شکل ۳. تیتراسیون IgG آنتی‌بادی‌های ضد IsdE. سرم‌های گروه‌های مختلف رقیق شده (۱/۲۵ تا ۱/۳۲۰۰) و تست الایزا انجام شد. گروه دریافت‌کننده کاندید واکسن IsdE+MF59+BCG+Nano-selenium بالاترین میانگین پاسخ IgG کل را از خود نشان داد (n = ۱۰).



شکل ۴. میزان ایزوتایپ IgG1 سرم موش‌های هر گروه با استفاده از آنتی‌بادی ضد IgG1 و آنتی‌بادی ثانویه کونژوگه در سه تکرار با روش الایزا (OD = ۴۵۰ nm) آنالیز شد (n = ۱۰).

#### د) سنجش ایزو تاپ‌های IgG1 و IgG2a: ارزیابی ایزوتایپ

IgG1 در بین تمامی گروه‌های واکسینه شده نسبت به گروه کنترل PBS، افزایش معنی‌داری وجود دارد ( $P < ۰/۰۰۰۱$ ). بین گروه دریافت‌کننده IsdE+MF59+BCG+Nano-selenium و IsdE+MF59+BCG نسبت به گروه‌های IsdE+MF59 و IsdE+MF59+Nano-selenium افزایش معنی‌داری مشاهده شد به ترتیب ( $P = ۰/۰۴۵۷$ )، ( $P < ۰/۰۰۰۱$ ) و ( $P < ۰/۰۰۰۱$ ). همچنین داده‌ها نشان می‌دهد بین گروه دریافت‌کننده IsdE+MF59+BCG و IsdE+MF59+Nano-selenium گروه‌های IsdE+MF59 و IsdE+MF59+Nano-selenium در سطح IgG1 اختلاف معنی‌دار است به ترتیب ( $P = ۰/۰۴۹۸$ ) و ( $P = ۰/۰۴۹۴$ ). اما بین گروه دریافت‌کننده سطح IgG1 اختلاف معنی‌داری مشاهده نشده است ( $P > ۰/۰۹۹۹۹$ ) (شکل ۴).

ارزیابی ایزوتایپ IgG2a در بین تمامی گروه‌های واکسینه شده نسبت به گروه کنترل PBS) افزایش معنی‌داری را نشان داد ( $P < ۰/۰۰۰۱$ ). بین گروه دریافت‌کننده IsdE+MF59+BCG+Nano-selenium نسبت به گروه‌های IsdE+MF59+BCG و IsdE+MF59+Nano-selenium و IsdE+MF59+BCG اختلاف معنی‌داری وجود دارد ( $P = ۰/۰۰۱۵$ )، ( $P < ۰/۰۰۰۱$ )، ( $P = ۰/۰۲۴۱$ ).



گروه IsdE+MF59+Nano-selenium نسبت به گروه IsdE+MF59 میزان باکتری کمتری دیده شد ( $P = 0/0041$ ).

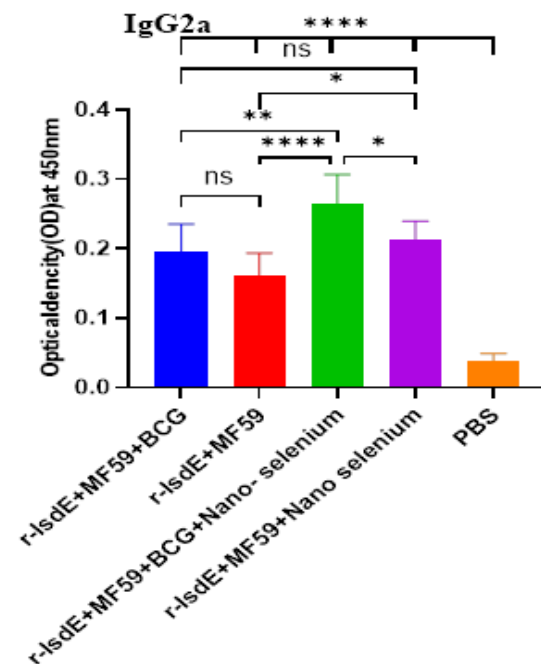
نتایج بررسی در ارگان کبد نشان داد، بین گروه‌های واکسینه شده IsdE+MF59+BCG) IsdE+MF59+Nano-selenium) IsdE+MF59+BCG+Nano-selenium و IsdE+MF59) با گروه کنترل بار باکتری کمتری وجود دارد به ترتیب ( $P < 0/0001$ ،  $P < 0/0001$ ،  $P < 0/0001$ ).

همچنین در ارگان کبد بین گروه IsdE+MF59+BCG+Nano-selenium و گروه IsdE+MF59 کاهش بار باکتری دیده می‌شود ( $P = 0/0265$ ). بین گروه IsdE+MF59+BCG و IsdE+MF59 نیز بار باکتریایی کاهش یافت ( $P = 0/0299$ ). در گروه IsdE+MF59+Nano-selenium نسبت به گروه IsdE+MF59 میزان باکتری کمتری دیده شد ( $P = 0/0280$ ).

بررسی ارگان طحال نشان داد، گروه‌های واکسینه شده IsdE+MF59+BCG) IsdE+MF59+Nano-selenium) IsdE+MF59+BCG+Nano-selenium و IsdE+MF59) نسبت به گروه کنترل کاهش بار باکتریایی را نشان داد به ترتیب ( $P < 0/0001$ ،  $P < 0/0001$ ،  $P < 0/0001$ ). همچنین بین گروه IsdE+MF59+BCG+Nano-selenium و IsdE+MF59+BCG) با گروه IsdE+MF59 میزان باکتری کمتری دیده شد ( $P = 0/0025$ ). بین گروه IsdE+MF59+BCG و IsdE+MF59 نیز بار باکتریایی کاهش یافت ( $P = 0/0027$ ). در گروه IsdE+MF59+Nano-selenium نسبت به گروه IsdE+MF59 نیز بار باکتریایی کمتری وجود دارد ( $P = 0/0026$ ). اما بین گروه دریافت کننده IsdE+MF59+BCG+Nano-selenium و IsdE+MF59+BCG) با گروه IsdE+MF59+BCG+Nano-selenium و IsdE+MF59+BCG) بین گروه IsdE+MF59+BCG و IsdE+MF59+BCG+Nano-selenium مشاهده نشد ( $P > 0/9999$ ) (شکل ۶).

با توجه به نتایج، اثرمحافظتی ب‌ث‌ژ و نانوسلنیوم در گروه‌های IsdE+MF59+BCG و IsdE+MF59+BCG+Nano-selenium و IsdE+MF59+Nano-selenium در هر سه ارگان کلیه، کبد و طحال مشاهده شد. در نتیجه‌ی پاکسازی بهتر این ارگان‌ها را توسط استفاده از این دو کوادجوانت همراه با آنتی‌ژن و ادجوانت نشان داد که این امر نشان‌دهنده‌ی افزایش قدرت القا فرایند اپسونوفاگوسیتوزیس و کارایی کاندید واکسن می‌باشد. با توجه به اینکه گروه IsdE+MF59 نسبت به گروه کنترل در هر سه ارگان مذکور اثر محافظتی در برابر باکتری نشان داد، اما نسبت به ترکیبات دیگر تأثیر کمتری در پاکسازی توسط MF59 تنها مشاهده شد.

همچنین بین گروه دریافت‌کننده IsdE+MF59+BCG و گروه‌های دریافت‌کننده IsdE+MF59+Nano-selenium و IsdE+MF59 در سطح IgG2a تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد ( $P = 0/8312$ ). اما بین گروه دریافت‌کننده IsdE+MF59+Nano-selenium و گروه IsdE+MF59 در سطح IgG2a افزایش معنی‌داری مشاهده شده است ( $P = 0/0314$ ) (شکل ۵).



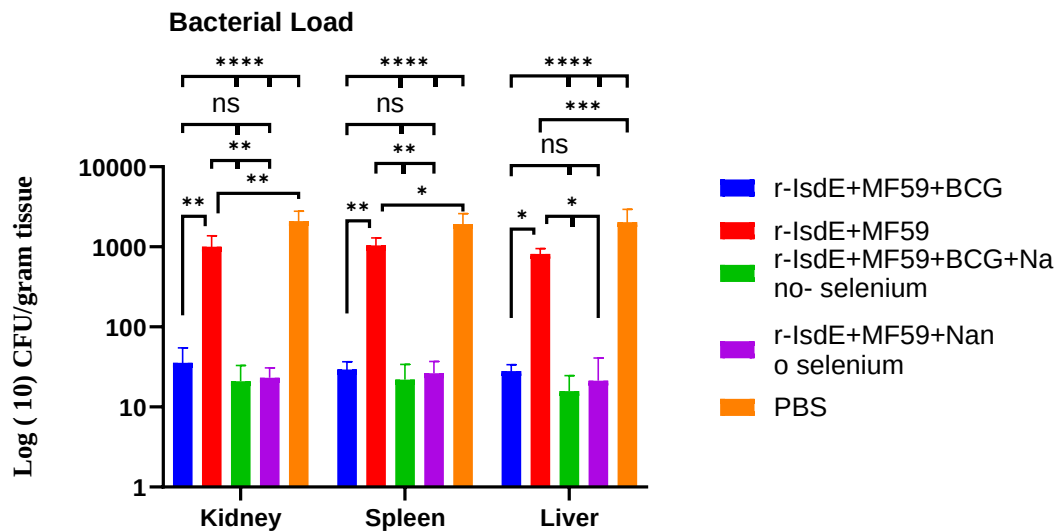
شکل ۵. میزان ایزوتایپ IgG2 سرم موش‌های هر گروه با استفاده از آنتی‌بادی ضد IgG1 و آنتی‌بادی ثانویه کونژوگه در سه تکرار با روش الایزا (OD = ۴۵۰ nm) آنالیز شد ( $n = 10$ ).

#### ه) بار باکتریایی در ارگان‌های داخلی (کبد، کلیه، طحال):

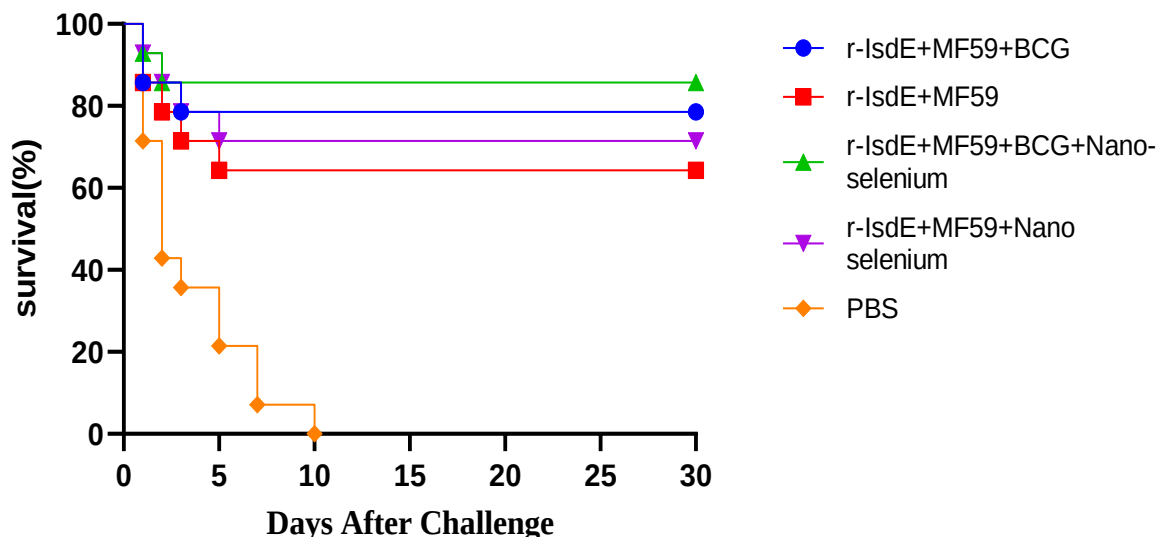
۳ روز بعد از آلودگی با دوز عفونی، از هر گروه ۴ موش بصورت تصادفی انتخاب، سپس کبد، کلیه و طحال در شرایط استریل زیر هود خارج شده و پس از کشت، میزان بار باکتریایی در ارگان‌های مذکور سنجیده شد. نتایج میزان بار باکتریایی در ارگان کلیه، همه‌ی گروه‌های واکسینه شده (IsdE+MF59+BCG، IsdE+MF59+Nano-selenium، IsdE+MF59+BCG+Nano-selenium و IsdE+MF59) نسبت به گروه کنترل کاهش بار باکتریایی را نشان داد به ترتیب ( $P < 0/0001$ ،  $P < 0/0001$ ،  $P < 0/0001$ ،  $P = 0/0011$ ). بین گروه دریافت‌کننده IsdE+MF59+BCG+Nano-selenium و IsdE+MF59+BCG) با گروه IsdE+MF59+BCG+Nano-selenium و IsdE+MF59+BCG) بین گروه IsdE+MF59+BCG و IsdE+MF59+BCG+Nano-selenium مشاهده نشد ( $P > 0/9999$ ) (شکل ۶).

IsdE+MF59+Nano-IsdE+MF59+BCG selenium  
IsdE+MF59 selenium  
۷۱، ۷۸ و ۶۴ درصد نسبت به گروه کنترل در طی ۳۰ روز مشاهده شد ( $P < 0/0001$ ). این نتایج سطح بالایی از حفاظت اختصاصی ایمنی گروه‌های کاندید واکسن را در برابر مدل باکتریایی عفونت را در مقایسه با گروه کنترل از خود نشان می‌دهد (شکل ۷).

ی) میزان بقاء در گروه های تجربی: میزان مرگ و میر گروه‌های موشی به مدت ۳۰ روز مداوم بعد از چالش میکروبی مورد بررسی قرار گرفت. همانطور که پیش‌بینی می‌شد، ۷۱ درصد از موش‌هایی که PBS دریافت کرده بودند، در طول دو روز بعد از چالش مردند.  
در گروه‌های اصلی واکسن IsdE+MF59+BCG+Nano-



شکل ۶. میانگین تعداد باکتری‌ها در ارگان‌های داخلی (کبد، کلیه و طحال) موش‌ها در گروه‌های دریافت‌کننده کاندید واکسن و گروه کنترل. نتایج به صورت میانگین تعداد باکتری‌ها در ارگان‌ها به صورت خطای استاندارد نشان داده شده است. گروه‌های دریافت‌کننده کاندید واکسن با گروه کنترل یعنی دریافت‌کننده PBS از نظر آماری مقایسه شده‌اند.



شکل ۷. نتایج میزان بقای حیوانات در گروه‌های دریافت‌کننده کاندید واکسن در مقایسه با گروه کنترل بعد از چالش میکروبی با سویه COL Strain استافیلوکوکوس اورئوس و بررسی ۳۰ روزه آنها را نشان می‌دهد.



## بحث

افزایش بیماری‌های عفونی و مرگ و میر ناشی از مصرف بی‌رویه آنتی‌بیوتیک‌ها و مقاومت دارویی در سراسر جهان استفاده از انواع ترکیبات ضد باکتریایی به خصوص واکسن‌های مؤثر بر علیه پاتوژن‌ها را اجتناب‌ناپذیر کرده است. روند رو به رشد عفونت‌های باکتری / استافیلوکوکوس / اورئوس مقاوم به متی‌سیلین در بین باکتری‌های گرم مثبت نیاز به روشی جدید برای پیشگیری از بیماری را نشان می‌دهد. بنابراین استفاده از پروتئین‌های نوترکیب با توانایی القای پاسخ ایمنی در ساختار کاندید واکسن جهت پیشگیری از عفونت‌های / استافیلوکوکوس / اورئوس متداول شده است (۱۹).

کاندید آنتی‌ژنی واکسن در این مطالعه، علیه / استافیلوکوکوس / اورئوس، پروتئین نوترکیب IsdE (ناقل آهن) است. این فاکتور پروتئینی در انتقال آهن به باکتری برای بیماری‌زایی حائز اهمیت می‌باشد.

در مطالعات گذشته، از سیستم Isd و انواع آن به عنوان تنظیم‌کننده‌ی سطح آهن و کاندید جهت ایمن‌سازی در واکسن استفاده شده است. Delfani و همکاران، با ارزیابی بروی نقش پروتئین نوترکیب جدید IsdB در / استافیلوکوکوس / اورئوس، نشان دادند که ایمن‌سازی موش‌های آزمایشگاهی با پروتئین نوترکیب clfA-IsdB-Hlg باعث برانگیختگی آنتی‌بادی‌های خاص بر علیه آنتی‌ژن و افزایش فاگوسیتوز توسط ماکروفاژها و کاهش بار باکتریایی شده است (۲۰).

در همین راستا Vahdani و همکاران در سال ۲۰۲۱ دریافتند که بیان پروتئین نوترکیب IsdE در سیستم / شرشیاکلی BL21 و استفاده از IsdE در فرمولا سیون‌های مختلف کاندید واکسن / استافیلوکوکوس / اورئوس مقاوم، موجب افزایش سطح آنتی‌بادی و توتال IgG و ایزوتاپ‌های (IgG1 و IgG2a) شد (۴).

با توجه به اینکه IsdE قادر به ایجاد پاسخ‌های آنتی‌بادی می‌باشد، لذا در این مطالعه از پروتئین نوترکیب IsdE به عنوان آنتی‌ژن جهت ایمن‌سازی در کاندید واکسن علیه / استافیلوکوکوس / اورئوس استفاده شد.

کاربرد ادجوانت‌ها در واکسن به منظور افزایش ایمنی‌زایی علیه آنتی‌ژن‌ها و کاهش میزان آنتی‌ژن مورد نیاز در واکسن، همچنین افزایش سرعت و دوام پاسخ ایمنی مؤثر است. همچنین ادجوانت‌ها بر عملکرد و تعداد آنتی‌بادی و افزایش میل ترکیبی آن‌ها با آنتی‌ژن در واکسن نیز نقش دارند (۷). مطالعات گذشته نشان داده است که پاسخ همزمان ایمنی سلولی و همورال، بیشترین تأثیر ایمنی را بر علیه عفونت / استافیلوکوکوس / اورئوس ایجاد می‌کند (۲۱). بنابراین فرمولاسیون کاندید واکسن در این مطالعه نیز با توجه به همین موضوع مورد بررسی قرار گرفته است.

ادجوانت MF59 در بیش از ۳۰ کشور جهان در فرمولاسیون واکسن‌های مجاز گنجانده شده است (۹).

ادجوانت MF59 و تحریک ماکروفاژها و ترشح انواع کموکاین‌ها باعث افزایش سطح کیفی و کمی پاسخ ایمنی در برابر پاتوژن‌ها می‌شود (۱۰، ۲۲).

در مطالعه‌ی Vahdani و همکاران، نشان داده شد که استفاده از ادجوانت MF59 در واکسن علیه / استافیلوکوکوس / اورئوس مقاوم باعث افزایش قدرت ایمنی سلولی و همورال می‌شود (۴).

ب‌ثژ، جهت افزایش ایمنی مؤثر با تحریک ماکروفاژها، لنفو سیت (T) و سلول‌های NK تحت عنوان کوادجوانت در واکسن مورد استفاده قرار گرفته است. بیشتر مطالعات گذشته، بر عملکرد ب‌ثژ در افزایش پاسخ Th1 برای تحریک بهتر سیستم ایمنی به عنوان ادجوانت تأکید دارند (۱۳) که نشان‌دهنده‌ی توانایی ب‌ثژ در القای ایمنی همورال می‌باشند.

نانوذرات سلنیوم (SeNPs) نیز با تقویت سیستم ایمنی به ویژه ایمنی سلولی و افزایش میزان IgG کل منجر به بهبود عملکرد واکسن می‌شود (۲۳). در مطالعه‌ای که توسط Mavandadnejad و همکاران انجام شد، مشخص گردید که تزریق ترکیب واکسن شامل مخلوط نانو سلنیوم‌های استخراج شده از مایکوباکتریوم بوریس با HBS-Ag، باعث افزایش سطح آنتی‌بادی کل و IgG2a در مدل موشی می‌شود (۲۴). مطالعه‌ی حاضر نیز جهت سنجش ایمنی همورال و تأثیر ترکیب پروتئین نوترکیب IsdE و ادجوانت MF59 و کوادجوانت‌های ب‌ثژ و نانو سلنیوم سنتتیک در مدل‌های موشی انجام شد.

نتایج حاصل از این بررسی نشان داد که میزان IgG کل و IgG1 و IgG2a در همه‌ی گروه‌های کاندید واکسن یعنی IgG2a+MF59+BCG، IgG2a+MF59+BCG+Nano- selenium و IgG2a+MF59+BCG+Nano- selenium در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی‌داری بالاتر بود. که در نتیجه نقش مؤثر ترکیب این فرمولاسیون در ایجاد پاسخ ایمنی همورال را نشان داد. با توجه به اینکه افزایش پاسخ آنتی‌بادی‌ها شاخص پاسخ ایمنی است، لذا IgG1 معیار پاسخ Th2 و IgG2a معیاری برای پاسخ Th1 محسوب می‌شود (۲۵).

نتایج حاضر در تأیید مطالعات گذشته می‌باشد که افزایش سطح IgG1 و IgG2a در مدل موش‌های دریافت‌کننده کاندید واکسن با پروتئین‌های سطحی / استافیلوکوکوس / اورئوس و ادجوانت‌های مختلف را نشان داد (۲۶).

مقایسه‌ی نتایج این مطالعه و مطالعات گذشته، القای هر دو بازوی ایمنی Th1 و Th2 و بخصوص ایمنی همورال را توسط پروتئین IsdE، تأیید کرد.

در این زمینه O'Hagan و همکاران نشان دادند که استفاده از ادجوانت MF59 در واکسن آنفلوآنزا توانایی افزایش پاسخ سلولی و

همورال را دارد (۹).

نتایج ما همراستا با مطالعات گذشته، استفاده از MF59 برای تحریک مؤثر ایمنی همورال و سلولی در فرمولاسیون واکسن را اثبات می‌کند. همچنین مطالعات نشان دادند که در عفونت / ستافیلوکوکوس اورئوس، افزایش سطح IgG1 با فعال سازی کمپلمان و خشتی سازی و اپسونیزاسیون باعث کاهش بار باکتریایی می‌شود (۲۷).

نتایج حاصل از این بررسی پارامترهای IgG کل و IgG1 در مطالعه ما نشان داد که در سطح IgG کل بین گروه IsdE+MF59+BCG و گروه IsdE+MF59+BCG نیز بین گروه IsdE+MF59+BCG و گروه‌های IsdE+MF59+Nano-selenium و IsdE+MF59 نشان افزایش معنی‌دار بود که این نتایج همراستا با مطالعه‌ای است که در آن نشان دادند که ب‌ث‌ژ به عنوان کمکی در واکسن کاندید علیه لیشمانیوز، با کاهش میزان بار ارکان‌های کبد و طحال موش‌های مبتلا به عفونت قادر به حفاظت موش‌ها در برابر لیشمانیوز می‌باشد (۲۸).

با توجه به پژوهش‌های گذشته و مطالعه‌ای حاضر می‌توان گفت که کوادجوانت ب‌ث‌ژ، با اثر القایی قوی بر بازوی ایمنی Th2 و همچنین سایر پارامترهای ایمنی، باعث تحریک ایمنی غیر اختصاصی در برابر انواع پاتوژن‌ها و پاکسازی میکروارگانیسم‌ها از اندام‌های داخلی می‌شود، همچنین با اثر همپوشانی بر روی نانو سلنیوم سنتتیک نقش کمکی مؤثرتری را در ایجاد پاسخ ایمنی ایفا می‌کند.

نتایج این بررسی نشان داد که ادجوانت نانو سلنیوم اثرات کمک‌کننده‌ای بر بهبود پاسخ سیستم ایمنی و افزایش تیتراژ آنتی‌بادی دارد، همراستا با این نتایج، Ranjbariyan و همکاران در سال ۲۰۲۳ نشان دادند که استفاده از کوادجوانت نانو سلنیوم سنتتیک و اتولیزین نو ترکیب در واکسن کاندید علیه MRSA، باعث افزایش سطح IgG کل، IgG1 و IgG2a و ایجاد پاسخ ایمنی همورال شد (۱۷). طبق نتایج این بررسی پارامترهای ایمنی توسط ترکیب IsdE، ب‌ث‌ژ، نانو سلنیوم و MF59، سطح بالایی از Th1 و Th2 را نشان دادند که بیانگر القاء پاسخ ایمنی همورال می‌باشد که این امر موجب کاهش عفونت و پاکسازی بهتر باکتری / ستافیلوکوکوس اورئوس و در نهایت بقاء جان‌دار می‌شود.

در بررسی نتایج دیگر این مطالعه، مشخص شد که در میزان بار باکتریایی ارگان‌های داخلی (کبد، کلیه و طحال) همه‌ی گروه‌های واکسینه شده نسبت به گروه کنترل، کاهش معنی‌دار مشاهده شده است. که مطابق با این نتایج Dos Santos و همکاران در نشان دادند که بین افزایش IgG2a با کاهش بار باکتریایی در / ستافیلوکوکوس اورئوس، رابطه‌ی مستقیم وجود دارد (۲۹) که با توجه به نتایج مذکور، کاهش بار باکتریایی در این مطالعه نیز به دلیل افزایش سطح Th1 و متعاقباً IgG2a مشاهده شده است.

همچنین در این رابطه نتایج این مطالعه نشان داد که میزان مرگ و میر موش‌های دریافت‌کننده‌ی ترکیب واکسن با IsdE و ادجوانت MF59 و کوادجوانت‌های ب‌ث‌ژ و نانو سلنیوم سنتتیک، در پایان مدت زمان ۳۰ روزه به دلیل افزایش سطح آنتی‌بادی‌های اختصاصی، بین ۶۴ تا ۸۵ درصد نسبت به گروه کنترل (صفر درصد) کاهش یافت. نکته‌ی حائز اهمیت در این بررسی این است که گروه دریافت‌کننده‌ی کاندید واکسن که شامل هر سه ادجوانت کمکی بود با افزایش تولید آنتی‌بادی سطح بالایی از ایمنی را در برابر باکتری می‌نشان داد. بطوریکه گروه (IsdE+MF59+BCG+Nano-selenium) ۷ درصد نسبت به گروه IsdE+MF59+BCG و ۱۴ درصد نسبت به گروه IsdE+MF59+Nano-selenium میزان بقاء بالاتری داشته است که این نتایج تأیید می‌کند که نبود هر کدام از فاکتورها در گروه‌های کاندید واکسن باعث کاهش میزان بقاء در گروه‌های موشی شده است به طوری که این ادجوانت‌ها با کاهش بار میکروبی در ارگان‌های داخلی و افزایش سطح پاسخ محافظتی گزینه‌ی مناسبی بر علیه عفونت ناشی از / ستافیلوکوکوس اورئوس می‌باشند.

با توجه به افزایش سطح IgG2a در این گروه نسبت به سایر گروه‌های تجربی به نظر می‌رسد، پاسخ‌های Th1 بیشتری در این گروه ایجاد شده باشد. سنجش سایتوکاین‌های IL-4 و INF- $\gamma$  می‌توانست به قضاوت دقیق‌تر شکل‌گیری الگوی پاسخ Th1/Th2 کمک نماید، که این از محدودیت‌های مطالعه می‌باشد. اگرچه افزایش IgG2a با سطح INF- $\gamma$  مرتبط می‌باشد و تا حدودی می‌تواند تأییدکننده‌ی الگوی پاسخ Th1 می‌باشد.

در همین راستا در مطالعه‌ی Ranjbariyan و همکاران در سال ۲۰۲۳ به نقش نانو سلنیوم سنتتیک و تأثیر محافظتی آن در کاندید واکسن علیه MRSA به بقای ۸۰ درصدی موش‌ها پس از چالش میکروبی اشاره کردند (۱۷) که در مقایسه با پژوهش‌های دیگر، قدرت القاء فرایند اپسونوفاگوسیتوزیس را نشان می‌دهد.

در مطالعه‌ی دیگری Vahdani و همکاران در سال ۲۰۲۱ نشان دادند، که ایمن سازی با پروتئین نو ترکیب IsdE به همراه ادجوانت MF59 می‌تواند در کاندید واکسن علیه / ستافیلوکوکوس اورئوس مقاوم، میزان بقاء در موش‌ها را افزایش دهد (۴). این مطالعات تأییدکننده‌ی نتایج مطالعه حاضر در اثر محافظتی نانو سلنیوم سنتتیک و ب‌ث‌ژ و MF59 و در نهایت افزایش پاکسازی میکروارگانیسم‌ها از ارگان‌ها و افزایش احتمالی بقاء می‌باشد، همچنین پروتئین IsdE نیز باعث افزایش کارایی واکسن بر علیه باکتری / ستافیلوکوکوس اورئوس می‌شود. می‌توان نتیجه گرفت که افزایش سطح آنتی‌بادی کل و IgG1 و IgG2a باعث افزایش اپسونوفاگوسیتوز و کاهش بار باکتریایی شده که در پیشگیری از عفونت‌های / ستافیلوکوکوس اورئوس نقش دارد.

علیه /ستافیلوکوکوس اورئوس می‌باشد.

### تشکر و قدردانی

این مقاله برگرفته از پایان نامه‌ی مقطع دکتری تخصصی میکروبیولوژی با کد ۱۶۲۳۹۱۱۵۸ بود که در دانشگاه علوم پزشکی آزاد واحد تهران تصویب شد. در این پژوهش از امکانات آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشکده علوم نوین و حیوان‌خانه‌ی دانشکده‌ی داروسازی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم پزشکی تهران استفاده شد که بدین‌وسیله تشکر به عمل می‌آید.

### نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج در این پژوهش مشخص شد که پروتئین نوترکیب IsdE در کاندید واکسن علیه /ستافیلوکوکوس اورئوس باعث افزایش پاسخ ایمنی در موش‌ها می‌شود و نتایج این مطالعه مشخص کرد که استفاده از ادجوانت MF59 و کوادجوانت‌های ب‌ث‌ و نانوسلنیوم سنتتیک در کاندید واکسن باعث افزایش سطح پاسخ‌های ایمنی همورال و در نهایت بهبود کارآیی ساختار کاندید واکسن خواهد شد. کاهش بار باکتریایی و بقای موش‌های واکسینه شده نیز بیانگر تاثیر مثبت پروتئین نوترکیب و ادجوانت‌های فرموله شده در این واکسن بر

### References

- Cheung GYC, Bae JS, Otto M. Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus*. *Virulence* 2021; 12(1): 547-69.
- Jenul C, Horswill AR. Regulation of *Staphylococcus aureus* virulence. *Microbiol Spectr* 2019;7(2):10.1128/microbiolspec. gpp3-0031-2018.
- Zapotoczna M, Heilbronner S, Speziale P, Foster TJ. Iron-regulated surface determinant (Isd) proteins of *Staphylococcus lugdunensis*. *J Bacteriol* 2012; 194(23): 6453-67.
- Vahdani Y, Faraji N, Haghighat S, Yazdi MH, Mahdavi M. Molecular cloning and immunogenicity evaluation of IsdE protein of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* as vaccine candidates. *Microb Pathog* 2021; 157: 104953.
- Grigg JC, Vermeiren CL, Heinrichs DE, Murphy ME. Heme coordination by *Staphylococcus aureus* IsdE. *J Biol Chem* 2007; 282(39): 28815-22.
- Fowler Jr VG, Proctor RA. Where does a *Staphylococcus aureus* vaccine stand? *Clin Microbiol Infect* 2014; 20 Suppl 5(0 5): 66-75.
- Rojo-Montejo S, Collantes-Fernández E, Regidor-Cerrillo J, Rodríguez-Bertos A, Prenafeta A, Gomez-Bautista M, et al. Influence of adjuvant and antigen dose on protection induced by an inactivated whole vaccine against *Neospora caninum* infection in mice. *Vet Parasitol* 2011; 175(3-4): 220-9.
- Singh M, O'Hagan D. Advances in vaccine adjuvants. *Front Immunol* 1999; 17(11): 1075-81.
- O'Hagan DT, Ott GS, Nest GV, Rappuoli R, Giudice GD. The history of MF59® adjuvant: a phoenix that arose from the ashes. *Expert Rev Vaccines* 2013; 12(1): 13-30.
- Ko E-J, Kang S-M. Immunology and efficacy of MF59-adjuvanted vaccines. *Hum Vaccin Immunother* 2018; 14(12): 3041-5.
- Cable J, Srikanthiah P, Crowe Jr JE, Pulendran B, Hill A, Ginsberg A, et al. Vaccine innovations for emerging infectious diseases—a symposium report. *Ann N Y Acad Sci* 2020; 1462(1): 14-26.
- Ota MO, Vekemans J, Schlegel-Haueter SE, Fielding K, Sanneh M, Kidd M, et al. Influence of *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin on antibody and cytokine responses to human neonatal vaccination. *J Immunol* 2002; 168(2): 919-25.
- Franco AR, Peri F. Developing new anti-tuberculosis vaccines: focus on adjuvants. *Cells*. 2021;10(1):78.
- Marques Neto LM, Kipnis A, Junqueira-Kipnis AP. Role of metallic nanoparticles in vaccinology: implications for infectious disease vaccine development. *Front Immunol* 2017; 8: 239.
- Yazdi MH, Mahdavi M, Varastehmoradi B, Faramarzi MA, Shahverdi AR. The immunostimulatory effect of biogenic selenium nanoparticles on the 4T1 breast cancer model: an in vivo study. *Biol Trace Elem Res* 2012; 149(1): 22-8.
- Ananth A, Keerthika V, Rajan MR. Synthesis and characterization of nano-selenium and its antibacterial response on some important human pathogens. *Current Science* 2019; 116(2): 285-90.
- Ranjbariyan A, Haghighat S, Yazdi MH, Arbabi Bidgoli S. Synthetic selenium nanoparticles as co-adjuvant improved immune responses against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *World J Microbiol Biotechnol* 2023; 39(1): 16.
- Modrzejewska-Sikorska A, Konował E, Kłapiszewski Ł, Nowaczyk G, Jurga S, Jesionowski T, et al. Lignosulfonate-stabilized selenium nanoparticles and their deposition on spherical silica. *Int J Biol Macromol* 2017; 103: 403-8.
- Patterson J, Kagina BM, Gold M, Hussey GD, Muloiwa R. Comparison of adverse events following immunisation with acellular and whole-cell pertussis vaccines: A systematic review. *Vaccine* 2018; 36(40): 6007-16.
- Delfani S, Mohabati Mobarez A, Imani Fooladi AA, Amani J, Emaneini M. Protection of mice against *Staphylococcus aureus* infection by a recombinant protein ClfA-IsdB-Hlg as a vaccine candidate. *Med Microbiol Immunol* 2016; 205: 47-55.
- Bagherzadeh M, Haghighat S, Mahdavi M. Evaluation of humoral and cellular immunity of recombinant autolysin protein *Staphylococcus aureus* in mouse model [in Persian]. *Medical Science Journal of Islamic Azad University* 2021; 31(2): 147-55.
- Mosca F, Tritto E, Muzzi A, Monaci E, Bagnoli F, Iavarone C, et al. Molecular and cellular signatures of

- human vaccine adjuvants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105(30): 10501-6.
23. Han H-W, Patel KD, Kwak J-H, Jun S-K, Jang T-S, Lee S-H, et al. Selenium nanoparticles as candidates for antibacterial substitutes and supplements against multidrug-resistant bacteria. *Biomolecules* 2021; 11(7): 1028.
  24. Mavandadnejad F, Yazdi MH, Hassanzadeh SM, Mahdavi M, Faramarzi MA, Pazoki-Toroudi H, et al. Biosynthesis of SeNPs by *Mycobacterium bovis* and their enhancing effect on the immune response against HBs antigens: an in vivo study. *IET Nanobiotechnol* 2018; 12(1): 57-63.
  25. Mohammadi Y. Evaluation of the immunogenicity and efficacy of a chimeric OMP25–OMP31 antigen in BALB/c mice. *Vet Med Sci* 2021; 7(5): 2008-14.
  26. Paydarnia N, Mansoori B, Esmaili D, Kazemi T, Aghapour M, Hajiasgharzadeh K, et al. *Helicobacter pylori* recombinant CagA regulates Th1/Th2 balance in a BALB/c murine model. *Adv Pharm Bull* 2020; 10(2): 264-70.
  27. 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(3): 387-98.
  28. Smrkovski LL, Larson CL. Effect of treatment with BCG on the course of visceral leishmaniasis in BALB/c mice. *Infect Immun* 1977; 16(1): 249-57.
  29. Dos Santos D, Muniz I, Queiroz A, Pereira I, Souza M, Lima L, et al. Individual variation is the key to the development of a vaccine against *S taphylococcus aureus*: a comparative study between mice lineages. *Braz J Med Biol Res* 2018; 51(5): e6773.

## Evaluation of the Performance of BCG with Synthetic Nano Selenium as a Booster in the Formulation of a Vaccine Candidate Against *Staphylococcus Aureus* Based on IsdE in a Mouse Model

Fatemeh Khosravanipour<sup>1</sup>, Setareh Haghighat<sup>2</sup>, Mohammad Hossein Yazdi<sup>3</sup>,  
Seyed Mehdi Hassanzadeh<sup>4</sup>

### Original Article

### Abstract

**Background:** *Staphylococcus aureus* causes various hospital-acquired infections and contributes to increased mortality. Vaccination is an effective method to combat these infections. Iron plays an essential role in bacterial pathogenesis. The IsdE protein, an iron (heme) transporter, is a promising vaccine development candidate. This study investigates the effect of BCG performance along with synthetic nano selenium as a booster in formulating a candidate vaccine against *Staphylococcus aureus* based on IsdE protein and the role of MF59 adjuvant.

**Methods:** After expressing the IsdE protein using IPTG, a one-millimolar nickel column was used for purification. The vaccine formulation, incorporating the adjuvants MF59, BCG, and synthetic nano-selenium, was prepared and administered subcutaneously in three doses, with two-week intervals, to five groups of Balb/C mice. The levels of total IgG and IgG1 and IgG2a isotypes were measured using ELISA. The mice were challenged with a bacterial dose of  $5 \times 10^8$  CFU. The bacterial load in internal organs was counted, and animal survival was monitored for 30 days.

**Findings:** Total IgG and the IgG1 and IgG2a isotypes showed a significant increase in all groups receiving the vaccine candidate compared to the control group. The bacterial load in internal organs (liver, kidneys, and spleen) and the mortality rate in the IsdE+MF59+BCG+Nano-selenium group were significantly reduced compared to the other immunized and control groups.

**Conclusion:** The results demonstrated that the adjuvant MF59, BCG, and synthetic nano-selenium boosters enhance humoral immunity against *Staphylococcus aureus* infection.

**Keywords:** IsdE protein, MF59, BCG vaccine, synthetic nano-selenium, *Staphylococcus aureus* vaccine

**Citation:** Khosravanipour F, Haghighat S, Yazdi MH, Hassanzadeh SM. Evaluation of the Performance of BCG with Synthetic Nano Selenium as a Booster in the Formulation of a Vaccine Candidate Against *Staphylococcus Aureus* Based on IsdE in a Mouse Model. J Isfahan Med Sch 2025; 43(831): 1151-63.

1- PhD student, Department of Microbiology, TeMS.C., Islamic Azad University, Tehran, Iran.

2- Associate Professor, Department of Microbiology, TeMS.C., Islamic Azad University, Tehran, Iran.

3- Associate Professor, Biotechnology Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

4- Assistant Professor, R&D Department, Research & Production Complex, Pasteur Institute of Iran, Tehran.

**Corresponding Author:** Setareh Haghighat, Associate Professor, Department of Microbiology, TeMS.C., Islamic Azad University, Tehran, Iran; Email: haghighat.s@iau.ac.ir