

## نانوسلنیوم به عنوان ادجوانت کمکی همراه پروتئین نوترکیب اتولیزین در ساخت واکسن کاندید علیه Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

علیرضا رنجبریان<sup>۱</sup>، ستاره حقیقت<sup>۲</sup>، محمد حسین یزدی<sup>۳</sup>، سپیده اربابی بیدگلی<sup>۴</sup>

### مقاله پژوهشی

### چکیده

**مقدمه:** Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) موجب عفونت‌های متعددی در افراد مستعد می‌شود و با توجه به مقاومت آن به آنتی‌بیوتیک‌ها، عوارض و مرگ و میر بالایی ایجاد می‌کند. این مطالعه با هدف بررسی اثر ادجوانتی نانوذرات سلنیوم (SeNPs) برای تولید واکسنی مؤثر برای پیشگیری و کاهش عوارض MRSA انجام شد.

**روش‌ها:** در ساخت واکسن، از پروتئین اتولیزین نوترکیب که به وسیله IPTG بیان و با استفاده از Ni-NTA کروماتوگرافی تخلیص شد، استفاده گردید. برای افزایش اثربخشی واکسن از ادجوانت SeNPs تولید شده به روش سنتتیک و بیوژنیک، در کنار ادجوانت آلوم استفاده و چهار گروه از موش‌های Balb/c به صورت زیرجلدی در سه دوز مورد تلقیح قرار گرفتند. میزان IgG کل، IgG1 و IgG2a با الایزا بررسی شد. همچنین موش‌های مورد آزمایش با دوز  $5 \times 10^8$  cfu مورد چالش باکتریایی قرار گرفته و میزان بقاء آن‌ها در مدت ۳۰ روز تعیین شد.

**یافته‌ها:** IgG کل در گروه دریافت‌کننده اتولیزین نوترکیب و نانوسلنیوم سنتتیک و گروه دریافت‌کننده اتولیزین نوترکیب و نانوسلنیوم بیوژنیک بالاتر از گروه شاهد بود. IgG1 و IgG2a در دو گروه اشاره شده نسبت به گروه شاهد افزایش نشان داد. همچنین میزان بقاء موش‌های ایمن شده پس از چالش باکتریایی بالاتر از گروه شاهد بود.

**نتیجه‌گیری:** نتایج نشان داد نانوسلنیوم سنتتیک و بیوژنیک به عنوان ادجوانت کمکی همراه با پروتئین اتولیزین نوترکیب، موجب ارتقاء ایمنی همورال در مقابله با MRSA می‌شود.

**واژگان کلیدی:** استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سلین؛ ان-استیل مورامیل ال-آلانین آمیداز؛ سلنیوم؛ نانوذرات؛ واکسن

**ارجاع:** رنجبریان علیرضا، حقیقت ستاره، یزدی محمد حسین، اربابی بیدگلی سپیده. نانوسلنیوم به عنوان ادجوانت کمکی همراه پروتئین نوترکیب اتولیزین در ساخت واکسن کاندید علیه *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۴۰۱؛ ۴۰ (۶۷۸): ۴۸۹-۴۸۱

از عفونت‌های خاص عضو را ایجاد کند که شایع‌ترین آن‌ها پوست و بافت‌های زیر پوستی است و به دنبال آن عفونت‌های تهاجمی مانند استئومیلیت، مننژیت، ذات‌الریه، آبسه‌ی ریه و آمپیم ایجاد می‌شود (۲). با وجود اینکه هنوز MRSA نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های ونکومایسین و لینزولید حساس است اما موردی از باکتری سوپرباگ مقاوم به ونکومایسین با حساسیت بینابینی نیز گزارش شده است که

### مقدمه

باکتری‌های استافیلوکوک اورئوس مقاوم به متی‌سلین *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* (MRSA)، از ایزوله‌های *S. aureus* است که نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های گروه بتالاکتام (پنی‌سیلین، متی‌سیلین، نافی‌سیلین و آگزاسیلین) و سفالوسپورین‌ها مقاوم شده است (۱). MRSA می‌تواند طیف وسیعی

۱- دانشجوی دکتری، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم و فن‌آوری‌های نوین، واحد علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲- دانشیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم و فن‌آوری‌های نوین، واحد علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

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

۴- استاد، گروه سم‌شناسی و فارماکولوژی، دانشکده داروسازی، واحد علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

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

Email: setareh\_haghighat@yahoo.com

ایمنی همورال موش‌ها، مورد بررسی قرار گرفته است. با توجه به اینکه در مطالعات گذشته اثرات این نانوذرات به عنوان ادجوانت کمکی در واکسن علیه MRSA بررسی نشده است، این تحقیق با هدف بررسی اثر ادجوانتی SeNPs در واکسن کاندید علیه MRSA انجام شد.

### روش‌ها

**الف) بیان، تخلیص و تغلیظ پروتئین اتولیزین:** باکتری‌های ترانسفورم شده *E. coli* BL21 حاوی پلاسمید نوترکیب حاوی ژن اتولیزین *S. aureus* Col strain، از تحقیقات قبلی توسط Haghghat و همکاران به این مطالعه اهدا شد (۹). یک کلنی از *E. coli* BL21 حاوی پلاسمید اتولیزین به ۱۰ میلی‌لیتر LB broth (مرک، آلمان) در مجاورت ۱۰ میکرولیتر کانامایسین (سیگما، آلمان) اضافه شد. بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون در  $37^{\circ}\text{C}$ ، ۲ میلی‌لیتر از باکتری‌های ترانسفورم شده در ۱۰ ارلن مجزا حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط LB broth (مرک، آلمان) و ۵۰ میکرولیتر کانامایسین (سیگما، آمریکا) کشت داده شد و بعد از رسیدن به OD مناسب (۰/۶ الی ۰/۴ در طول موج ۶۰۰، ۵۰۰ میکرولیتر ایزوپروپیل بتا-دی-تیوگلاکتوپیرانوزید (IPTG، سیگما، آمریکا) به ارلن‌ها اضافه شد. پس از ۵ ساعت در دمای  $37^{\circ}\text{C}$ ، محتویات هر ارلن به لوله‌ی فالتون ریخته و با دور  $12000 \times g$  برای ۱۰ دقیقه در دمای  $15^{\circ}\text{C}$  سانتریفیوژ و رسوب بعد از جدا کردن از مایع رویی در لوله‌های فالتون درب بسته در  $20^{\circ}\text{C}$  - نگهداری شد. جهت تخلیص پروتئین، هر کدام از لوله رسوب‌ها در ۵ میلی‌لیتر از بافر لیزکننده (حاوی  $100.\text{NaH}_2\text{PO}_4$  میلی‌مولار، Tris.CL، ۱۰ میلی‌مولار و Urea، ۸ میلی‌مولار،  $\text{pH} = 8$ ) حل شد و به مدت ۱۰ دقیقه در دور  $12000 \times g$  سانتریفیوژ شد. به مایع رویی رزین NI-NTA (سیگما آلدریج) اضافه و یک ساعت در دمای اتاق در حال تکان آرام انکوباسیون صورت گرفت و سپس در ستون فیلتردار تخلیص پروتئین ریخته شد. پس از ته‌نشین شدن رزین در ستون، محتویات با ۴ میلی‌لیتر بافر ( $100.\text{NaH}_2\text{PO}_4$  میلی‌مولار، Tris.CL، ۱۰ میلی‌مولار و Urea، ۸ میلی‌مولار،  $\text{pH} = 6.3$ ) شستشو داده شد و سپس ۰/۵ میلی‌لیتر بافر تخلیص ( $100.\text{NaH}_2\text{PO}_4$  میلی‌مولار، Tris.CL، ۱۰ میلی‌مولار و Urea، ۸ میلی‌مولار،  $\text{pH} = 6.5$ ) به ستون اضافه و پروتئین‌ها در میکروتیوب جمع‌آوری شدند و وجود پروتئین با SDS-PAGE تأیید شد. پروتئین‌های جمع‌آوری شده وارد کیسه‌ی دیالیز (۴۳ میلی‌متر ۱۴ کیلو دالتون) شد و بعد از معلق کردن در بافر PBS و تعویض هر ۳ ساعت بافر به مدت ۲۴ ساعت و حذف اوره، اتولیزین تغلیظ شد. پروتئین‌های تغلیظ شده پس از تعیین غلظت با نانودراپ، در دمای  $20^{\circ}\text{C}$  - نگهداری شدند.

یک زنگ خطر در خصوص آینده‌ی درمان این نوع از باکتری‌ها می‌باشد (۳).

از آن‌جا که *S. aureus* را نمی‌توان همیشه با استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های معمول کنترل کرد، برای مقابله با این بیماری راه‌کارهای دیگری مورد نیاز است (۴). در طول دهه‌ی گذشته، علاقه به فناوری واکسیناسیون برای پیشگیری و درمان بیماری به طور مداوم افزایش یافته است (۵). واکسن‌های مختلف علیه MRSA با استفاده از پروتئین‌های مختلف میکروارگانیسم ساخته و بر روی حیوانات و در پاره‌ای موارد بر روی انسان آزمایش شده‌اند، اما اکثر آن‌ها در ایجاد ایمنی مؤثر با شکست مواجه شدند. نشان داده شده است که پروتئین‌های سطحی به عنوان فاکتورهای حیاتی برای کلونیزاسیون و بیماری‌زایی *S. aureus* در نظر گرفته می‌شوند. بنابراین، آنتی‌ژن‌های لنگردار دیواره‌ی سلولی به عنوان کاندیدهای بالقوه واکسن *S. aureus* توصیه شده است (۶).

اتولیزین (N-Acetylmuramoyl-L-alanine Amidase) یکی از پروتئین‌های سطحی *S. aureus* است که علاوه بر خاصیت آنزیمی که دارد، دارای خاصیت چسبندگی بوده و موجب اتصال میکروارگانیسم به سطح پلیمر، دفع پروتئین‌های سیتوپلاسمی، تشکیل بیوفیلم و جدا شدن سلول دختر پس از تقسیم سلولی می‌شود (۷، ۸). مطالعات اخیر اهمیت اتولیزین را در بیماری‌زایی این باکتری و ایجاد ایمنی محافظتی در برابر عفونت‌های استافیلوکوکوس اورئوس نشان می‌دهد (۶، ۹).

از سایر اجزاء واکسن می‌توان به ادجوانت‌ها اشاره کرد که موجب ارتقاء پاسخ ایمنی می‌شوند. ادجوانت آلوم یک ادجوانت سنتی است که اصولاً در ترکیبات تعدادی از واکسن‌ها استفاده می‌شود. تحقیقات نشان داده که استفاده از نانوذرات (NPs) به عنوان کمک ادجوانت می‌تواند اثرات مشخصی در ارتقاء بیشتر سیستم ایمنی، ایجاد حفاظت در موجود زنده و اثربخشی واکسن‌ها داشته باشد (۱۰، ۱۱). نانوذرات توانایی افزایش سیستم ایمنی در برابر میکروارگانیسم‌ها و محافظت از آنتی‌ژن‌های درون آن‌ها را در برابر شرایط سخت مانند pH پایین، نمک‌های صفراوی و فعالیت آنزیمی به عنوان کمک ادجوانت در ساخت واکسن دارند (۱۲، ۱۳).

یکی از نانوذراتی که اثرات فعالیت کمکی آن‌ها در ارتقاء عملکرد واکسن شناخته شده است، نانوذرات سلنیوم (SeNPs) می‌باشد (۱۴). این نانوذرات خواص یون‌های سلنیوم را در ارتقاء سیستم ایمنی دارند اما به دلیل ماهیت نانوذره، در دوزهای پایین و در نتیجه سمیت کمتر قابل استفاده می‌باشند (۱۵، ۱۶). در این مطالعه اثرات واکسن حاوی پروتئین نوترکیب اتولیزین به همراه SeNPs تولید شده به دو روش سنتتیک و بیوزنیک در مجاورت با ادجوانت آلوم و نقش آن‌ها در

**د) تعیین مشخصات ذرات نانو سلنیوم:** برای تعیین اندازه‌ی ذرات با استفاده از پراکندگی نور دینامیکی (DLS)، قطر و بار سطحی ذرات نانوسلنیوم تولید شده در محلول آبی مشخص شد (Malvern Zetasizer). طول موج لیزر ۷۸۰ نانومتر، ضریب شکست آب ۱/۳۳ و در دمای اتاق). جهت این بررسی ۰/۱ میلی‌لیتر از محلول نانویار تیکل سلنیوم به ۲ میلی‌لیتر آب دیونیزه اضافه می‌شود و در دمای اتاق در کوت دستگاه قرار گرفته و خوانش انجام شد. برای مشخص شدن شکل ذرات تولید شده از میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) استفاده شد.

**ه) فرمولاسیون واکسن:** به منظور فرمول‌بندی واکسن، پروتئین نوترکیب اتولیزین در ادجوانت آلوم (هیدروکسید آلومینیوم تهیه شده از مؤسسه تحقیقات سرم و واکسن‌سازی رازی) فرموله شد. آلوم و اتولیزین (۴/۵ میلی‌لیتر اتولیزین در ۴۰۰ میکرولیتر آلوم) به مدت یک ساعت بر روی همزن مغناطیسی (۳۰۰ دور در دقیقه) در حالت هم زدن و دمای اتاق باهم ترکیب و در ادامه نانوسلنیوم به ترکیب اضافه و هم زدن به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق ادامه پیدا کرد و فرمولاسیون واکسن با PBS تنظیم شد. در انتها هر ۲۰۰ میکرولیتر واکسن حاوی، ۱۰ میکروگرم اتولیزین نوترکیب و ۱۰۰ میکروگرم SeNPs بود.

**و) بررسی درون‌تنی:** موش‌های ۶ الی ۸ هفته‌ای ماده BALB/c از مؤسسه‌ی سرم‌سازی رازی خریداری و به حیوان‌خانه منتقل شدند. موش‌ها به مدت ۱ هفته جهت عادت کردن به شرایط محیطی، در آزمایشگاه نگهداری شدند (دسترسی کامل به آب و غذا، ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی). سپس موش‌ها به صورت رندوم به چهار گروه ۱۰-تایی برای تزریق واکسن مطابق گروه‌بندی زیر تقسیم شدند:

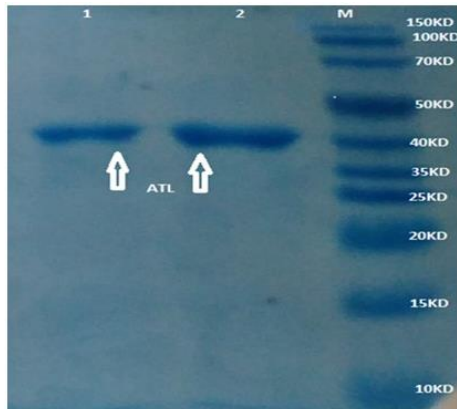
- گروه ۱: پروتئین اتولیزین + ادجوانت آلوم + نانوسلنیوم سنتتیک  
گروه ۲: پروتئین اتولیزین + ادجوانت آلوم + نانوسلنیوم بیونیک  
گروه ۳: پروتئین اتولیزین + ادجوانت آلوم  
گروه ۴: PBS

تزریق به صورت زیرجلدی طبق گروه‌بندی فوق به صورت سه تزریق هر کدام با فاصله‌ی دو هفته انجام شد. دو هفته بعد از آخرین تزریق از گروه‌های مختلف، نمونه‌گیری و سرم با استفاده از سانتریفیوژ (۱۰،۰۰۰ × g، ۱۰ دقیقه) جدا و در فریز  $^{\circ}\text{C} -20$  نگهداری شد.

**ز) سنجش ایمنی همورال:** برای تعیین وجود آنتی‌بادی‌های اختصاصی در سرم موش‌ها از الایزا استفاده شد. غلظت اتولیزین با PBS، ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تنظیم و در چاهک پلیت‌های ۹۶ خانه (گرینر، آلمان) کوت و به مدت یک شب در دمای  $^{\circ}\text{C} 4$

**ب) ساخت نانوسلنیوم بیونیک:** کشت تازه (ATCC 8014) *Lactobacillus plantarum* سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران) به ۱۰ ml محیط کشت اختصاصی لاکتوباسیل‌ها (MRS) اضافه و بعد از انکوباسیون یک شب (۱۶ ساعت) در انکوباتور شیکردار (۲۰۰rpm) در  $^{\circ}\text{C} 37$ ، به محیط محلول اکسید سلنیوم (مرک، آلمان) اضافه تا غلظت نهایی به  $200\text{mg/l}$  رسید و مجدد ۷۲ ساعت در  $^{\circ}\text{C} 37$  انکوبه شد. بعد از اینکه رنگ محیط کاملاً قرمز شد به فالکون‌های ۵۰ میلی‌لیتری منتقل و سانتریفیوژ شد ( $4000 \times g$ ، ۱۰ دقیقه) تا سلول‌ها و نانوذرات از محیط کشت کاملاً جدا شدند. محلول رویی دور ریخته شده و رسوب حاصل با محلول کلریدسدیم (۰/۹ درصد) و سانتریفیوژ کردن به مدت ۱۰ دقیقه و دور  $4000 \times g$  شستشو داده شد (دو بار). در ادامه برای شکستن سلول‌ها، رسوب را به یک هاون چینی تمیز و سرد منتقل و کم کم به آن نیتروژن مایع اضافه تا کاملاً یخ زد. با استفاده از هاون، رسوب یخ زده را سائیده تا یک پودر کاملاً نرم و یکنواخت تولید و با دستگاه اولتراسونیک (W 100، ۵ دقیقه)، سونیکه شد. محتویات حاصل شده سه بار در بافر Tris-HCl (pH 8.3) حاوی (۱ درصد) SDS و سه بار با آب مقطر به وسیله‌ی سانتریفیوژ ( $10,000 \times g$ ، ۱۰ دقیقه) شستشو و در انتها رسوب حاصل در آب مقطر به صورت سوسپانسیون درآمد. برای جداسازی نانوذرات سلنیوم از باقیمانده‌ی سلولی در یک سری لوله آزمایش، ۴ میلی‌لیتر از سوسپانسیون فوق را ریخته و به آن ۲ میلی‌لیتر اکتیل الکل (مرک، آلمان) اضافه شد. درب لوله‌ها را محکم بسته و به شدت همزده تا دو فاز آلی و آبی کاملاً باهم مخلوط شوند. سپس سانتریفیوژ ( $2000 \times g$ ، ۵ دقیقه) و به مدت ۲۴ ساعت در  $^{\circ}\text{C} 4$  قرار گرفت تا دوباره دو فاز به آرامی از هم جدا شود. بعد از گذشت این مدت نانوذرات سلنیوم تولید شده در فاز آبی در ته لوله‌ها دیده می‌شوند و بقیه‌ی ناخالصی‌ها در فاز بالایی (فاز آلی) تجمع پیدا می‌کنند. به آرامی فاز آلی دور ریخته و نانو ذرات باقیمانده در ته لوله به ترتیب با کلروفرم، اتانول ۷۰ درجه و آب مقطر شسته شدند. در نهایت سوسپانسیون نانوذرات خالص شده در یخچال ( $^{\circ}\text{C} 4$ ) نگهداری شد (۱۷).

**ج) ساخت نانوسلنیوم سنتتیک:** جهت سنتز نانوذرات سلنیوم، محلول ۵/۲ میلی‌مولار دی اکسید سلنیوم (مرک، آلمان) تهیه و سپس محلول اسید اسکوربیک در محیط آبی (۵/۲ میلی‌متر) به آرامی به دی اکسید سلنیوم در حال هم زدن (با همزن مغناطیسی، ۳۰۰ دور در دقیقه) اضافه شد. پس از واکنش، مخلوط سانتریفیوژ و سه بار با آب مقطر دو بار تقطیر شسته شد ( $10,000 \times g$ ، ۱۰ دقیقه). سرانجام، یک محلول ثابت از Se NPs (۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) در PBS استریل تهیه و برای استفاده‌ی بعدی در دمای  $^{\circ}\text{C} 4$  نگهداری شد (۱۸).



شکل ۱. سنجش پروتئین نوترکیب اتولیزین در ژل. SDS-(12% w/v) PAGE ژل با رنگ آبی درخشان Coomassie G-۲۵۰ رنگ آمیزی شد. نمونه‌ها بعد از ۵ دقیقه جوشانده و در بافر SDS بارگذاری شدند. ستون ۱، اتولیزین خالص شده از ستون کروماتوگرافی با رزین Ni-NTA، ستون ۲، پروتئین اتولیزین پس از دیالیز. ستون M، نشانگر اندازه‌ی پروتئین استاندارد. پروتئین اتولیزین نوترکیب با فلش نشان داده شده است.

نشان داد که SeNPs دارای سطح کروی هستند و DLS نشان داد که اندازه‌ی متوسط ذرات کمتر از ۱۰۰ نانومتر با ضریب توزیع (PDI) کمتر از ۰/۵ می‌باشد. بار سطحی نانوذرات SeNPs‌های سنتز شده به میزان  $2 \pm 23$  - تعیین شد (جدول ۱، شکل ۲).

جدول ۱. مقایسه‌ی شکل، اندازه و پتانسیل زتای نانوسلنیوم‌های تولید شده

نوع نانوسلنیوم تولید شده	شکل ذرات	اندازه‌ی ذرات	پتانسیل زتا
سنتتیک	کروی	۹۳/۸۷	-۲۴
بیوزنیک	کروی	۹۵/۳۲	-۲۲

ج) سنجش *IgG* کل: دو هفته بعد از تزریق آخرین دوز واکسن، سرم موش‌های هر چهار گروه برای سنجش میزان *IgG* کل بررسی شد. برای این مهم از تمام سرم‌ها ۱۲ رقت تهیه (۱/۲۵ الی ۱/۵۱۲۰۰) و میزان *IgG* کل با استفاده از روش الایزا سنجیده شد. میانگین میزان *IgG* کل در موش‌های دریافت‌کننده‌ی اتولیزین + آلوم + نانوسلنیوم سنتتیک از رقت ۱/۲۵ الی ۱/۵۱۲۰۰ به طور معنی‌داری بالاتر از گروه شاهد (موش‌های دریافت‌کننده‌ی PBS) بود ( $P < 0/0001$ ) الی  $P = 0/0228$ . همچنین میانگین میزان *IgG* کل در موش‌های دریافت‌کننده‌ی اتولیزین + آلوم + نانوسلنیوم بیوزنیک از رقت ۱/۲۵ الی ۱/۸۰۰ به طور معنی‌دار بالاتر از گروه شاهد بود ( $P = 0/0002$ ) الی  $P = 0/0411$ . نتایج *IgG* کل در گروه دریافت‌کننده‌ی اتولیزین + آلوم در مقایسه با گروه شاهد از رقت ۱/۲۵ الی ۱/۸۰۰ معنی‌دار بود

انکوبه شد. پلیت‌ها سه بار با بافر (PBS حاوی ۰/۰۵ درصد توین ۲۰) شستشو و سپس از بافر مسدودکننده (PBS حاوی ۲ درصد شیر بدون چربی و ۰/۰۵ درصد توین ۲۰) استفاده و در  $37^{\circ}\text{C}$  به مدت یک ساعت انکوبه شدند. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از سرم موش رقیق شده (۱/۲۵ الی ۱/۵۱۲۰۰) به چاهک‌ها اضافه و به مدت ۹۰ دقیقه در  $37^{\circ}\text{C}$  درجه انکوبه شدند. در ادامه چاهک‌ها ۵ بار شستشو شدند. *IgG* ضد موش کونزوگه با HRP (سیگما، ایالات متحده آمریکا) به چاهک‌ها اضافه و بعد از انکوباسیون در  $37^{\circ}\text{C}$  به مدت ۹۰ دقیقه، چاهک‌ها ۵ بار شسته و محلول رنگ‌زا به آن‌ها اضافه شد (ترامتیل بنزیدین). بعد از انکوباسیون در تاریکی و دمای اطاق به مدت ۳۰ دقیقه، محلول متوقف کننده ( $2\text{N H}_2\text{SO}_4$ ) به چاهک‌ها اضافه و با استفاده از الایزا ریدر (StatFax 4200) در طول موج ۴۵۰ نانومتر OD هر چاهک سنجش شد. علاوه بر این، ساب کلاس *IgG1* و *IgG2a* با روش الایزا و مطابق دستورالعمل کیت مورد ارزیابی قرار گرفت (goat anti-mouse *IgG1*, *IgG2a*, Sigma, St. Louis, USA).

ح) چالش میکروبی: دو هفته بعد از آخرین تزریق واکسن، ۰/۵ میلی‌لیتر از *S.aureus* COL strain مقاوم به متی‌سیلین ( $5 \times 10^8 \text{CFU}$ ) و کشندگی LD50 به صورت داخل صفاقی به موش‌های هم‌هی گروه‌ها تزریق و میزان زنده ماندن موش‌ها به صورت روزانه تا یک ماه بررسی شد.

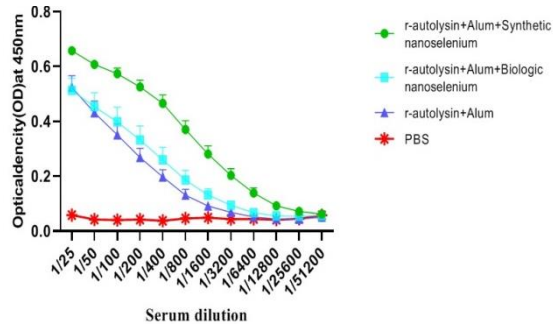
جهت آنالیز آماری از نرم‌افزار Graphpad prism 8 استفاده شد. نتایج کمی بر اساس میانگین سه بار تکرار آنالیز شدند. جهت نتایج کمی دارای توزیع نرمال از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه (One-Way ANOVA) و t-test با سطح معنی‌دار کمتر از ۰/۰۵ استفاده شد.

## یافته‌ها

الف) بیان و تخلیص پروتئین اتولیزین: تجزیه و تحلیل SDS-PAGE نشان داد که بیشترین مقدار پروتئین نوترکیب اتولیزین *E. Coli* BL21 (DE3)، با القای ۱ میلی‌مولار IPTG در دمای  $37^{\circ}\text{C}$  به مدت ۵ ساعت تولید شد. خالص‌سازی پروتئین تحت شرایط دناتوراسیون توسط رزین Ni-NTA به وسیله‌ی کروماتوگرافی انجام و اندازه‌ی محصول پروتئین تخلیص و تغلیظ شده تقریباً ۴۳ کیلو دالتون بود. نتایج سنجش پروتئین نوترکیب اتولیزین بعد از تخلیص و تغلیظ در شکل ۱ مشخص شده است.

ب) تعیین مشخصات ذرات نانوسلنیوم: شکل و اندازه‌ی SeNPs تولید شده به ترتیب با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) و پراکندگی نور دینامیکی (DLS) اندازه‌گیری شد (SEM, Malvern Zetasizer).

اتولیزین + آلوم + نانوسلنیوم بیوژنیک به طور معنی‌داری مقادیر IgG2 بالاتری نسبت به گروه دریافت‌کننده‌ی گروه شاهد داشتند (به ترتیب  $P = 0/0001$ ,  $P = 0/0218$ ).

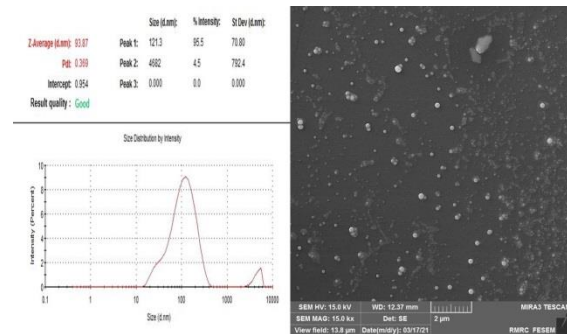


شکل ۳. تیتراسیون آنتی‌بادی‌های ضد اتولیزین. سرم‌های گروه‌های مختلف رقیق شده (۱/۲۵ تا ۱/۵۱۲۰۰) و الیزا انجام شد. گروه ایمن شده با اتولیزین + آلوم + نانوسلنیوم سنتتیک بالاترین میانگین پاسخ IgG کل را در برابر سایر گروه‌های تجربی نشان می‌دهد ( $n = 10$ ).

میزان IgG2a در گروه دریافت‌کننده‌ی اتولیزین + آلوم + نانوسلنیوم سنتتیک به طور معنی‌داری بالاتر از گروه دریافت‌کننده‌ی اتولیزین + آلوم بود ( $P = 0/0067$ )؛ ولی میانگین IgG2a در بین موش‌های دریافت‌کننده‌ی اتولیزین + آلوم + نانوسلنیوم بیوژنیک و موش‌های دریافت‌کننده‌ی اتولیزین + آلوم اختلاف معنی‌داری نداشت ( $P = 0/9999$ ). همچنین میانگین IgG2a در گروه موش‌های دریافت‌کننده‌ی اتولیزین + آلوم + نانوسلنیوم سنتتیک به طور معنی‌داری بالاتر از گروه دریافت‌کننده‌ی اتولیزین + آلوم + نانوسلنیوم بیوژنیک بود ( $P = 0/0055$ ) و موش‌های دریافت‌کننده‌ی اتولیزین + آلوم دارای مقادیر بیشتری از این زیرکلاس در مقایسه با موش‌های گروه شاهد بودند ( $P < 0/0181$ ) (شکل ۴.ب).

**میزان زنده ماندن:** دو هفته بعد از آخرین تزریق واکسن و انجام چالش میکروبی با دوز عفونی از استرین COL ( $5 \times 10^8$  CFU)، بررسی میزان زنده ماندن موش‌ها به صورت روزانه در بازه‌ی زمانی یک ماهه نشان داد که میزان زنده ماندن در گروه دریافت‌کننده‌ی اتولیزین + آلوم + نانوسلنیوم سنتتیک ۸۰ درصد و در گروه دریافت‌کننده‌ی اتولیزین + آلوم + نانوسلنیوم بیوژنیک ۷۰ درصد نسبت به گروه شاهد بود ( $P < 0/005$ ). میزان زنده ماندن در گروه دریافت‌کننده‌ی اتولیزین + آلوم ۵۰ درصد محاسبه شد که دارای اختلاف معنی‌داری نسبت به گروه شاهد بود ( $P < 0/001$ ). نتایج این بررسی نشان داد که میزان مرگ و میر در گروه دریافت‌کننده‌ی واکسن (۲۰ درصد در گروه دریافت‌کننده‌ی نانوسلنیوم سنتتیک و ۳۰ درصد در گروه دریافت‌کننده‌ی نانوسلنیوم بیوژنیک) نسبت به گروه شاهد

( $P = 0/002$  الی  $P = 0/0471$ ). همچنین گروه دریافت‌کننده‌ی اتولیزین + آلوم + نانوسلنیوم سنتتیک در رقت‌های ۱/۲۵ الی ۱/۲۵۶۰۰ ( $P = 0/0197$  الی  $P = 0/0382$ ) در مقایسه با گروه دریافت‌کننده‌ی اتولیزین + آلوم معنی‌دار بود. میانگین IgG کل در هیچ گروه دریافت‌کننده‌ی اتولیزین + آلوم + نانوسلنیوم بیوژنیک در هیچ رقتی دارای اختلاف معنی‌داری با گروه دریافت‌کننده‌ی اتولیزین + آلوم نبود (شکل ۳).



شکل ۲. تعیین شکل و سایز ذرات نانوسلنیوم با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) و پراکندگی نور دینامیکی (DLS)

(د) سنجش زیرکلاس‌های IgG2a و IgG1 از آنجایی که IgG1 در ارتباط با پاسخ Th2 و IgG2a در ارتباط با پاسخ Th1 می‌باشد، جهت ارزیابی سیستم ایمنی این دو زیرکلاس از IgG در موش‌های دریافت‌کننده‌ی واکسن بررسی شدند. موش‌های گروه دریافت‌کننده‌ی اتولیزین + آلوم + نانوسلنیوم سنتتیک و گروه دریافت‌کننده‌ی اتولیزین + آلوم + نانوسلنیوم بیوژنیک به طور معنی‌داری مقادیر بالاتری نسبت به گروه دریافت‌کننده‌ی PBS (گروه شاهد) داشتند ( $P < 0/0001$ ). همچنین میزان IgG1 در گروه دریافت‌کننده‌ی اتولیزین + آلوم + نانوسلنیوم سنتتیک به طور معنی‌داری بالاتر از گروه دریافت‌کننده‌ی اتولیزین + آلوم بود ( $P = 0/0006$ )؛ ولی میانگین IgG1 در بین موش‌های دریافت‌کننده‌ی اتولیزین + آلوم + نانوسلنیوم بیوژنیک و موش‌های دریافت‌کننده‌ی اتولیزین + آلوم اختلاف معنی‌داری نداشت ( $P = 0/9988$ ). همچنین میانگین IgG1 در گروه موش‌های دریافت‌کننده‌ی اتولیزین + آلوم + نانوسلنیوم سنتتیک به طور معنی‌داری بالاتر از گروه دریافت‌کننده‌ی اتولیزین + آلوم + نانوسلنیوم بیوژنیک بود ( $P = 0/001$ ) و موش‌های دریافت‌کننده‌ی اتولیزین + آلوم دارای مقادیر بیشتری از این زیرکلاس در مقایسه با موش‌های گروه شاهد بودند ( $P < 0/0001$ ) (شکل ۴.الف).

در خصوص زیرکلاس IgG2a موش‌های گروه دریافت‌کننده‌ی اتولیزین + آلوم + نانوسلنیوم سنتتیک و گروه دریافت‌کننده‌ی

اتولیزین از جمله عوامل بیماری‌زایی باکتری و یکی از کاندیدهای آنتی‌ژنی برای ساخت واکسن بر علیه MRSA می‌باشد (۶).

در مطالعه‌ای که توسط Haghghat و همکاران در سال ۲۰۱۷ انجام شد، استفاده از اتولیزین در ترکیب واکسن موجب تقویت ایمنی همورال و افزایش سطح آنتی‌بادی و کاهش میزان باکتری در اندام‌های داخلی موش‌ها شد (۹).

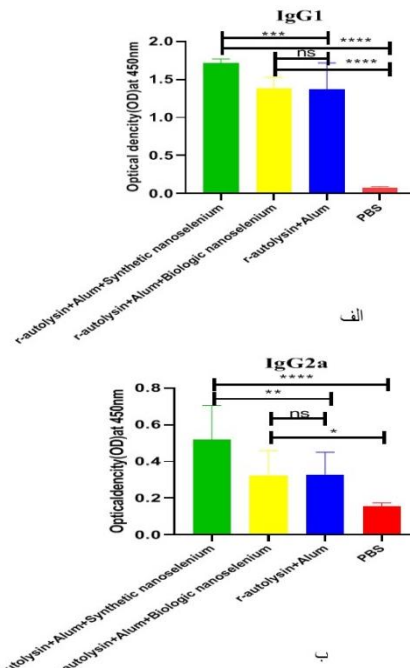
همچنین Kalali و همکاران در سال ۲۰۱۹ از IgG تولید شده بر علیه اتولیزین جهت ارتقاء پاسخ ایمنی غیر فعال استفاده کردند (۶). با توجه به توانایی اتولیزین در ایجاد پاسخ‌های آنتی‌بادی، در این بررسی پروتئین نوترکیب اتولیزین به عنوان آنتی‌ژن برای ساختار واکسن کاندید علیه MRSA اختصاص داده شد و ایجاد آنتی‌بادی تولید شده بر علیه آن، مدنظر قرار گرفت.

انتخاب ادجوانت برای ساخت واکسن گامی کلیدی برای افزایش ایمنی‌زایی و تحریک ایمنی ذاتی است که منجر به ایجاد پاسخ حفاظتی مناسب می‌شود (۱۲). مطالعات گذشته نشان داده است که بهترین اثربخشی بر علیه عفونت *S.aureus* زمانی ایجاد می‌شود که پاسخ ایمنی همورال و سلولار به صورت توأم وجود داشته باشد (۲۰). یعنی همزمان، میزان آنتی‌بادی، اینترفرون گاما و Th1 افزایش نشان دهد که این موضوع مبنای فورمولاسیون واکسن در این بررسی قرار گرفته است (۱۴). از آنجایی که ادجوانت آلوم نمی‌تواند ایمنی سلولار را به تنهایی تحریک کند، استفاده از نانوپارتیکل‌ها به عنوان ادجوانت کمکی برای افزایش پاسخ‌های ایمنی در مرکز توجه محققان واکسن قرار دارد (۱۰، ۱۱، ۲۱). نانوپارتیکل‌های سلنیوم (SeNPs) به عنوان یک ادجوانت، توانایی ارتقاء قابل توجهی از پارامترهای سیستم ایمنی به خصوص ایمنی سلولار را دارند (۲۲). همچنین SeNPs به عنوان ادجوانت موجب افزایش میزان IgG کل می‌شود (۲۳).

در تحقیقی که توسط Eid و همکاران در سال ۲۰۱۹ انجام شد، مشخص گردید که تزریق زیرجلدی SeNPs موجب افزایش میزان IgM و IgG در خرگوش‌ها می‌شود (۲۴). در این مطالعه تأثیر ترکیب پروتئین اتولیزین *S.aureus* و SeNPs به عنوان ادجوانت کمکی در کنار ادجوانت سنتی آلوم، صرفاً بر ایمنی همورال در مدل‌های موشی بررسی شد.

این بررسی نشان داد که میانگین میزان IgG کل، در موش‌های دریافت‌کننده‌ی اتولیزین + آلوم + نانوسلنیوم سنتتیک به طور معنی‌داری بالاتر از گروه شاهد و گروه اتولیزین + آلوم بود (از رقت ۱/۲۵ الی ۱/۲۵۶۰۰) و از آنجایی که نانو سلنیوم بیوژنیک صرفاً تا رقت ۱/۸۰۰ با گروه شاهد اختلاف معنی‌داری نشان داد و نسبت به گروه دریافت‌کننده‌ی اتولیزین + آلوم هیچ اختلاف معنی‌داری ایجاد نکرد، در نتیجه نانوسلنیوم سنتتیک به طور مؤثرتر و قوی‌تری نسبت به

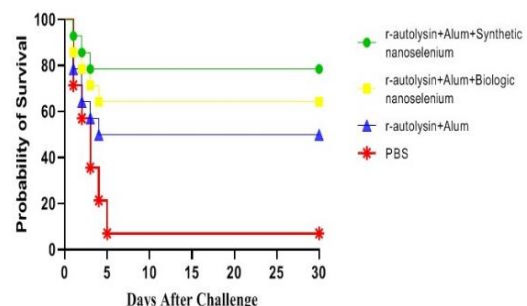
(۱۰۰ درصد) دارای اختلاف معنی‌دار ( $P < 0.005$ ) می‌باشد (شکل ۵).



شکل ۵: میزان ایزوتیپ‌های IgG1 (الف) و IgG2a (ب) در گروه‌های مورد آزمایش. سرم هر موش با استفاده از آنتی‌بادی‌های ضد IgG1 و IgG2a و آنتی‌بادی ثانویه کونژوگه در سه تکرار با روش الایزی غیرمستقیم آنالیز شد (میانگین  $\pm$  انحراف معیار، OD ۴۵۰nm،  $n = 10$ )

## بحث

MRSA موجب انواع عفونت بیمارستانی بوده و یکی از علل مرگ و میر در بیماران بستری می‌باشد و آنجایی که به آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم شده است، ارائه‌ی راهکاری مانند واکسن و ایمنی محافظتی به جای درمان با آنتی‌بیوتیک‌ها لازم می‌باشد (۱۹).



شکل ۵: مقایسه‌ی درصد زنده ماندن در گروه‌های مختلف موش‌ها بعد از چالش میکروبی با استرین *col/استافیلوکوک اورئوس* و بررسی روزانه به مدت ۳۰ روز ( $n = 10$ )

در پایان روز ۳۰ بعد از چالش میکروبی با MRSA افزایش یافت. در همین راستا مطالعه‌ی Bagherzadeh و همکاران که نشان داد، اتولیزین می‌تواند میزان بقاء موش‌ها را در مواجهه با MRSA افزایش دهد (۲۰)، تأییدکننده‌ی نتایج این بررسی بود. همچنین دریافت صرفاً اتولیزین و نبود نانوسلنیوم در ترکیب واکسن، میزان زنده ماندن را به ۵۰ درصد کاهش داد که نشان می‌دهد استفاده از نانوسلنیوم در کنار اتولیزین اثر محافظتی واکسن را بیشتر کرده است. طبق نتایج حاصل، گروه دریافت‌کننده‌ی ادجوانت نانوسلنیوم سنتتیک ۱۰ درصد نسبت به گروه دریافت‌کننده‌ی نانوسلنیوم بیژنیک بقاء بیشتری را تجربه کردند که به اثر محافظتی بیشتر نانوسلنیوم سنتتیک در ترکیب واکسن کاندید علیه MRSA اشاره می‌کند (شکل ۵) که به دلیل افزایش IgG و ساب‌کلاس‌های آن و همچنین ارتقاء ایمنی سلولی می‌باشد.

### نتیجه‌گیری

این مطالعه نشان داد که استفاده از اتولیزین در ساخت واکسن موجب ارتقاء سیستم ایمنی موش‌ها بر علیه عفونت MRSA می‌شود و چنانچه از نانوسلنیوم به عنوان ادجوانت کمکی در ساختار واکسن استفاده شود سیستم ایمنی به نحو مؤثرتر تقویت خواهد شد. همچنین نتایج این بررسی مشخص کرد که ادجوانت کمکی نانوسلنیوم سنتتیک در ارتقاء ایمنی همورال نقش مؤثرتری نسبت به نانوسلنیوم بیژنیک دارد.

### تشکر و قدردانی

این مقاله برگرفته از پایان‌نامه‌ی مقطع دکتری رشته‌ی زیست‌شناسی گرایش میکروبیولوژی (کد ۱۸۰۷۹۸۱۰۱۸/۲۲۵۳۰۵) بود که با کد اخلاق IR.IAU.PS.REC.1399.235 در دانشگاه علوم پزشکی آزاد واحد تهران تصویب و با امکانات دانشکده‌ی داروسازی و دانشکده‌ی علوم و فناوری‌های نوین انجام شد که به این وسیله تشکر به عمل می‌آید.

نوع بیژنیک موجب ایجاد پاسخ ایمنی همورال گشته است (شکل ۳). IgG1 شاخصی برای پاسخ Th2 (۲۵) و IgG2a شاخصی برای پاسخ Th1 می‌باشد. یافته‌ها نشان داد که میزان IgG1 و IgG2a در موش‌های ایمن شده با پروتئین‌های سطحی *S.aureus* و ادجوانت‌های مختلف، دارای سطوح بالاتری می‌باشد (۲۶).

همچنین Mavandadnejad و همکاران نشان دادند که استفاده از نانوسلنیوم در ترکیب واکسن، موجب ارتقاء و IgG2a در مدل‌های موشی می‌شود (۲۷). افزایش IgG1 علیه عفونت *S.aureus* موجب فعال شدن کمپلمان، اپسونیزاسیون، خنثی‌سازی و فرایند ADCC می‌شود که در پاک‌سازی این میکروارگانیسم از بدن نقش دارد (۲۸) همچنین Dos Santos و همکاران ارتباط بین IgG2a و کاهش بار باکتری *S.aureus* را نشان دادند (۲۹).

Varshney و همکاران به نقش مؤثر IgG2a در محافظت موش‌ها در مقابل انترتوکسین *S.aureus* اشاره کرده‌اند (۳۰). در این بررسی IgG1 و IgG2a موش‌های هر دو گروهی که در ترکیب واکسن خود ادجوانت کمکی نانوسلنیوم دریافت کرده بودند به طور معنی‌داری بالاتر نسبت به گروه شاهد بود. اما صرفاً گروه دریافت‌کننده‌ی نوع سنتتیک ادجوانت کمکی نانوسلنیوم به طور معنی‌داری IgG1 و IgG2a بالاتری نسبت به گروه دریافت‌کننده‌ی اتولیزین + آلوم داشتند که نشان‌دهنده‌ی ایجاد پاسخ ایمنی همورال مؤثر و افزایش Th1 و Th2 توسط ترکیب اتولیزین و نانوسلنیوم سنتتیک به عنوان آنتی‌ژن و ادجوانت کمکی می‌باشد که بیانگر پاک‌سازی بهتر *S.aureus*، بقاء بیشتر جاندار و عوارض کمتر عفونت در استفاده از ادجوانت کمکی نانوسلنیوم سنتتیک در واکسن کاندید علیه MRSA می‌باشد (شکل ۴).

در همین رابطه نتایج این بررسی نشان داد که میزان بقاء موش‌های دریافت‌کننده‌ی واکسن حاوی اتولیزین و ادجوانت کمکی نانوسلنیوم ۷۰ الی ۸۰ درصد در مقایسه با گروه شاهد (صفر درصد)

### References

1. Watkins RR, Holubar M, David MZ. Antimicrobial resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to newer antimicrobial agents. *Antimicrob Agents Chemother* 2019; 63(12): e01216-19.
2. Algammal AM, Hetta HF, Elkelish A, Alkhalifah DHH, Hozzein WN, El-Saber Batiha G, et al. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): one health perspective approach to the bacterium epidemiology, virulence factors, antibiotic-resistance, and zoonotic impact. *Infect Drug Resist* 2020; 13: 3255-65.
3. Cong Y, Yang S, Rao X. Vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* infections: A review of case updating and clinical features. *J Adv Res* 2020; 21: 169-76.
4. Parker D. A live vaccine to *Staphylococcus aureus* infection. *Virulence* 2018; 9(1): 700-702.
5. Rappuoli R, Pizza M, Del Giudice G, De Gregorio E. Vaccines, new opportunities for a new society. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014; 111(34): 12288-93.
6. Kalali Y, Haghghat S, Mahdavi M. Passive immunotherapy with specific IgG fraction against autolysin: analogous protectivity in the MRSA infection with antibiotic therapy. *Immunol Lett* 2019; 212: 125-31.
7. Houston P, Rowe SE, Pozzi C, Waters EM, O'Gara JP. Essential role for the major autolysin in the fibronectin-binding protein-mediated *Staphylococcus*

- aureus biofilm phenotype. *Infect Immun* 2011; 79(3): 1153-65.
8. Pasztor L, Ziebandt AK, Nega M, Schlag M, Haase S, Franz-Wachtel M, et al. Staphylococcal major autolysin (Atl) is involved in excretion of cytoplasmic proteins. *J Biol Chem* 2010; 285(47): 36794-803.
  9. Haghghat S, Siadat SD, Sorkhabadi SMR, Sepahi AA, Mahdavi M. Cloning, expression and purification of autolysin from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: potency and challenge study in Balb/c mice. *Mol Immunol* 2017; 82: 10-8.
  10. Barnowski C, Kadzioch N, Damm D, Yan H, Temchura V. Advantages and limitations of integrated flagellin adjuvants for HIV-based nanoparticle B-cell vaccines. *Pharmaceutics* 2019; 11(5): 204.
  11. Vijayan V, Mohapatra A, Uthaman S, Park I-K. Recent advances in nanovaccines using biomimetic immunomodulatory materials. *Pharmaceutics*. 2019; 11(10): 534-61.
  12. Marques Neto LM, Kipnis A, Junqueira-Kipnis AP. Role of metallic nanoparticles in vaccinology: implications for infectious disease vaccine development. *Front Immunol* 2017; 8: 239-49.
  13. Vanamala K, Tatiparti K, Bhise K, Sau S, Scheetz MH, Rybak MJ, et al. Novel approaches for the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: Using nanoparticles to overcome multidrug resistance. *Drug Discov Today* 2021; 26(1): 31-43.
  14. Mahdavi M, Mavandadnejad F, Yazdi MH, Faghfuri E, Hashemi H, Homayouni-Oreh S, et al. Oral administration of synthetic selenium nanoparticles induced robust Th1 cytokine pattern after HBs antigen vaccination in mouse model. *J Infect Public Health* 2017; 10(1): 102-9.
  15. Shakibaie M, Shahverdi AR, Faramarzi MA, Hassanzadeh GR, Rahimi HR, Sabzevari O. Acute and subacute toxicity of novel biogenic selenium nanoparticles in mice. *Pharm Biol* 2013; 51(1): 58-63.
  16. 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.
  17. Yazdi MH, Masoudifar M, Varastehmoradi B, Mohammadi E, Kheradmand E, Homayouni S, et al. Effect of oral supplementation of biogenic selenium nanoparticles on white blood cell profile of BALB/c mice and mice exposed to X-ray radiation. *Avicenna J Med Biotechnol* 2013; 5(3): 158-167.
  18. Modrzejewska-Sikorska A, Konował E, Klapiszewski 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.
  19. Søre NH, Jensen NV, Jensen AL, Koch J, Poulsen SS, Pier GB, et al. Active and passive immunization against *Staphylococcus aureus* periprosthetic osteomyelitis in rats. *In Vivo* 2017; 31(1): 45-50.
  20. Bagherzadeh M, Haghghat S, Mahdavi M. Evaluation of humoral and cellular immunity of recombinant autolysin protein *Staphylococcus aureus* in mouse model. *Medical Science* 2021; 31(2): 146-55.
  21. Kye YC, Park SM, Shim BS, Firdous J, Kim G, Kim HW, et al. Intranasal immunization with pneumococcal surface protein A in the presence of nanoparticle forming polysorbitol transporter adjuvant induces protective immunity against the *Streptococcus pneumoniae* infection. *Acta Biomater* 2019; 90: 362-72.
  22. Han HW, Patel KD, Kwak JH, Jun SK, Jang TS, Lee -H, et al. Selenium nanoparticles as candidates for antibacterial substitutes and supplements against multidrug-resistant bacteria. *Biomolecules* 2021; 11(7): 1028.
  23. Raahati Z, Bakhshi B, Najari-Peerayeh S. Selenium nanoparticles induce potent protective immune responses against vibrio cholerae WC vaccine in a mouse model. *Journal of Immunology Research* 2020; 2020: 1-12.
  24. Eid SY, El-Zaher HM, Emara SS, Farid OA-H, Michael MI. Nano selenium treatment effects on thyroid hormones, immunity and antioxidant status in rabbits. *World Rabbit Science* 2019; 27(2): 93-100.
  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. 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 Nanobiotechnology* 2018; 12(1): 57-63.
  28. 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.
  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 *Staphylococcus aureus*: a comparative study between mice lineages. *Braz J Med Biol Res* 2018; 51(5): 6773-85.
  30. Varshney AK, Wang X, Aguilar JL, Scharff MD, Fries BC. Isotype switching increases efficacy of antibody protection against staphylococcal enterotoxin B-induced lethal shock and *Staphylococcus aureus* sepsis in mice. *mBio* 2014; 5(3): e01007-14.



## Selenium Nanoparticles as a Co-adjuvant with Autolysin Recombinant Protein in the Development of a Vaccine Candidate Against Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus*

Alireza Ranjbariyan<sup>1</sup>, Setareh Haghghat<sup>2</sup>, Mohammad Hossein Yazdi<sup>3</sup>,  
Sepideh Arbabi-Bidgoli<sup>4</sup>

### Original Article

#### Abstract

**Background:** Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) causes various infections in susceptible individuals who are resistant to antibiotics, resulting in high morbidity and mortality rates. This study aimed to investigate the adjuvant effect of selenium Nanoparticles (SeNPs) for the purpose of developing an effective vaccine to prevent and reduce the complications of MRSA.

**Methods:** Autolysin recombinant protein, expressed by IPGD and purified by Ni-NTA chromatography was used to develop the vaccine. Together with alum adjuvant, SeNPs produced in two synthetic and biogenic forms were used as a co-adjuvant to increase the vaccine's efficacy. Four groups of BALB/c mice were subcutaneously injected with three doses of different vaccine combinations. In order to evaluate humoral immunity, the ELISA test was used to measure total IgG, IgG1, and IgG2a levels. The 30-day survival rate of experimental mice was recorded after they were exposed to a bacterial challenge test of MRSA ( $1.5 \times 10^8$  CFU).

**Findings:** In both groups receiving autolysin recombinant protein with synthetic SeNPs and with biogenic SeNPs, total IgG were higher than the control group. Compared to the control group, IgG1 and IgG2a increased more in the two previously mentioned groups. After the bacterial challenge test, the survival rate of vaccinated mice was higher than that of the control group.

**Conclusion:** The results showed that, as a co-adjuvant, synthetic and biogenic SeNPs in combination with autolysin recombinant protein could improve the humoral immune system against MRSA.

**Keywords:** Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*; N-Acetylmuramoyl-L-alanine Amidase; Selenium; Nanoparticles; Vaccines

**Citation:** Ranjbariyan A, Haghghat S, Yazdi MH, Arbabi-Bidgoli S. Selenium Nanoparticles as a Co-adjuvant with Autolysin Recombinant Protein in the Development of a Vaccine Candidate Against Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus*. J Isfahan Med Sch 2022; 40(678): 481-9.

1- PhD Student, Department of Microbiology, Faculty of Advanced Sciences and Technology, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran

2- Associate Professor, Department of Microbiology, Faculty of Advanced Sciences and Technology, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran

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

4- Professor, Department of Toxicology and Pharmacology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran

**Corresponding Author:** Setareh Haghghat, Associate Professor, Department of Microbiology, Faculty of Advanced Sciences and Technology, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran; Email: setareh\_haghghat@yahoo.com