ORIGINAL ARTICLE

Passive Immunity by Recombinant Anti-Methicillin-resistant Staphylococcus aureus ScaF Antibody in Mouse Model

Peyman Avakh Majelan[1],
Mehdi Mahdavi[2],
Mohammad Reza Pourmand[3],
Mohammad Hossein Yazdi[4],
Nima Khoramabadi[5]

[1] MSc in Medical Microbiology, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[2] Assistant Professor, Department of Immunology, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran
[3] Professor, Department of Pathobiology, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[4] Assistant Professor, Department of Research and Development, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran
[5] Assistant Professor, Department of Bacteriology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

(Received December 27, 2016 ; Accepted August 1, 2016)

Abstract

Background and purpose: Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is a community-associated pathogen that is so common in hospitals. Antibiotic resistance and poor clinical outcome provide great reasons for using immunization strategies based on antibodies. The aim of this study was to investigate passive immunity using recombinant anti-MRSA ScaF antibody in a mouse model.

Materials and methods: In this study, the recombinant protein, ScaF was purified through denaturation method. This protein combined with Freund's adjuvant was injected into a rabbit to produce antibody. Then, the antibody produced against ScaF was injected to mice infected by *S. aureus* by two regimens of pre- and after infection treatment. Afterwards, the mortality rate in mice was compared between the control treatment group (vancomycin therapy) and negative control group (non-immune rabbit serum).

Results: Out of 10 mice in two groups of pre- and after infection treatment that received antibody against ScaF antigen 20% and 10% were protected, respectively, that did not show a significant difference compared with non-immune rabbit serum group (negative control).

Conclusion: Passive immunization by antibody cannot play a considerable role in the control of infections caused by *S. aureus*. Therefore, other mechanisms of immune system for the protection against this bacterium including stimulating of cytokine-dependent cell-mediated immunity may be useful in prevention of infections caused by *S. aureus*.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, immunization, ScaF

J Mazandaran Univ Med Sci 2016; 26(143): 20-27 (Persian).

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و ششم شماره ۱۴۳ آذر سال ۱۳۹۵ (۲۷-۲۰)

بررسی ایمنی غیرفعال با آنتی بادی ضد ScaF استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین در مدل موشی

پیمان آوخ ماجلان[۱]
مهدی مهدوی[۲]
محمدرضا پورمند[۳]
محمدحسین یزدی[۴]
نیما خرم آبادی[۵]

چکیده

سابقه و هدف: استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین یکی از پاتوژن‌های شایع بیمارستانی و اکتسابی از جامعه است. مقاومت آنتی بیوتیکی و پیامدهای درمانی نامناسب دلایل زیادی جهت استفاده از راهبردهای ایمنی مبتنی بر آنتی‌بادی‌ها را فراهم کرده است. هدف از این مطالعه، بررسی ایمنی غیرفعال با آنتی‌بادی ضد ScaF استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین در مدل موشی بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، پروتئین نوترکیب ScaF با روش دناتوراسیون تخلیص گردید. این پروتئین به همراه ادجوانت فروند جهت تولید آنتی‌بادی به خرگوش تزریق شد. در ادامه آنتی‌بادی تولید شده علیه پروتئین ScaF با دو رژیم مختلف به‌صورت درمانی قبل و بعد ازعفونت به موش‌های آلوده به استافیلوکوکوس اورئوس تزریق گردید و مرگ و میر موش‌ها به مدت ۱۴ روز در مقایسه با گروه کنترل درمانی (ونکومایسین) و گروه کنترل منفی (سرم خرگوش غیر ایمن) ثبت گردید.

یافته‌ها: موش‌های دریافت کننده آنتی‌بادی ضد آنتی‌ژن ScaF در دو گروه با رژیم‌های درمانی قبل و بعد از عفونت به ترتیب موجب زنده ماندن ۲۰ و ۱۰ درصد از ۱۰ سر موش مورد مطالعه گردید که در مقایسه با گروه دریافت کننده سرم خرگوش غیر ایمن (کنترل منفی) اختلاف معنی‌داری را نشان نداد ($p>۰/۰۱$).

استنتاج: ایمنی‌زایی غیر فعال با استفاده از آنتی‌بادی نمی‌تواند به تنهایی نقش به‌سزایی در کنترل عفونت ناشی از استافیلوکوکوس اورئوس داشته باشد. لذا با توجه به مکانیسم‌های دیگر سیستم ایمنی برای محافظت علیه این باکتری می‌توان از تحریک سایتوکاین‌های وابسته به ایمنی سلولی و موثر برای پیشگیری از بروز عفونت‌های ناشی از باکتری استافیلوکوکوس اورئوس استفاده نمود.

واژه های کلیدی: استافیلوکوکوس اورئوس، ایمونیزاسیون، پروتئین نوترکیب

مقدمه

استافیلوکوکوس‌اورئوس یکی از مهم‌ترین پاتوژن‌هایی می‌باشد که باعث باکتریمی، منتژیت، اندوکاردیت و استئومیلیت می گردد(۱). مقاومت‌های روزافزون استافیلوکوکوس اورئوس به آنتی‌بیوتیک‌های رایج، منجر به این شده که محققین به دنبال روش‌های جدید جهت درمان این باکتری باشند(۳،۲).

مولف مسئول: محمدرضا پورمند – تهران: دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده بهداشت، گروه پاتوبیولوژی E-mail: pourmand@gmail.com
۱. کارشناسی ارشد میکرب شناسی پزشکی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
۲. استادیار، گروه ایمونولوژی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
۳. استاد، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
۴. استادیار، گروه توسعه و تحقیقات، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
۵. استادیار، گروه باکتریولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
تاریخ دریافت : ۱۳۹۴/۱۰/۶ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۱۳۹۴/۱۱/۳ تاریخ تصویب : ۱۳۹۴/۵/۱۱

درسال‌های اخیر، دانشمندان سعی در پیشبرد و توسعه ایمونوتراپی در جهت ریشه‌کنی عفونت‌های ناشی از استافیلوکوکوس اورئوس را هدف قرار کرده‌اند، اما تاکنون این امر محقق نشده است(۴). تاکنون از آنتی‌بادی به عنوان یکی از ارکان ایمنی هومورال، در بسیاری از ایمونوتراپی‌ها به عنوان عامل درمانی علیه عفونت‌های ناشی از استافیلوکوکوس اورئوس استفاده شده است که می‌توان به آنتی‌بادی تولید شده علیه کپسول سروتیپ ۵ و ۸ (۵)، کلامپینگ فاکتور A (۶) و همولیزین(۷) آلفا اشاره کرد که به عنوان عامل تداخل در پاتوژنز باکتری در نظر گرفته شده‌اند. تا به امروز آنتی‌ژن‌های مختلفی به‌عنوان کاندید واکسن برای ایمنوتراپی در برابر استافیلوکوکوس اورئوس مورد ارزیابی قرار گرفته است. از جمله آنتی ژن‌هایی که به عنوان کاندید ایمونوتراپی در نظر گرفته می‌شود، می‌توان به خانواده پروتئینی Sca یا Staphylococcal conserved antigens اشاره نمود که دارای ۹ آنتی‌ژن به نام‌های ScaA-I می‌باشد. خانواده پروتئینی Sca در دوگونه استافیلوکوکوس وجود داشته و با توجه به ترازبندی آمینواسیدی، این آنتی‌ژن‌ها دارای مناطق حفاظت شده‌ای می‌باشند که کاندید مناسبی برای واکسن تلقی می‌گردند که هنوز مطالعات ایمنوژنیسیته بر روی این آنتی‌ژن‌ها صورت نگرفته است(۹،۸). با توجه به حضور آنتی‌ژن ScaF در اکثر ایزوله‌های بالینی(۱۰) و هم‌چنین عدم مطالعات ایمونوژنیسیته بر روی خانواده Sca، هدف از این مطالعه ارزیابی پاسخ ایمنی هومورال به آنتی ژن ScaF در کنترل عفونت استافیلوکوکوس اورئوس در مدل موشی می‌باشد.

مواد و روش ها

تهیه و تایید سویه استاندارد

سویه استاندارد COL موجود در مرکز تحقیقات اورولوژی بیمارستان سینا با روش‌های متداول بیوشیمیایی از قبیل رشد در محیط مانیتول سالت آگار، کوآگولاز و DNase به علاوه آنتی بیوگرام با دیسک سفوکسیتین، مورد تایید قرار گرفت و تا روز تلقیح در محیط Tryptic Soy Broth (TSB)، در یخچال نگه‌داری شد.

تخلیص پروتئین نوترکیب

پلاسمید نوترکیب pET-21a/*scaf* به‌وسیله ترانسفورماسیون شوک حرارتی به داخل میزبان بیانی origami اشریشیا کلی انتقال یافت. بعد از ارزیابی بیان پروتئین در مدت ۴ ساعت بعد از القا، تخلیص پروتئین با روش دناتوراسیون و حذف اوره بر روی ستون نیکل به این شکل صورت پذیرفت که بافر لیز حاوی اوره ۸ مولار به رسوب سلول‌های القا شده اضافه و مایع رویی حاصل از سانتریفوژ با رزین نیکل مخلوط گردیده و سپس ستون حاوی رزین نیکل با بافرهای حاوی شیب کاهشی اوره شستشو داده شدند و در نهایت پروتئین ها با اضافه کردن محلول ایمیدازول جمع آوری گردیدند. بعد از تعیین غلظت با روش اسپکتروفوتومتری در ۲۸۰ نانومتر و بررسی کمی و کیفی با روش SDS-PAGE، در ۸۰- درجه سلسیوس تا زمان استفاده نگهداری شدند.

ایمونیزاسیون خرگوش جهت تولید آنتی بادی پلی کلونال

ابتدا ۲ خرگوش سفید نیوزیلندی با وزن تقریبی ۲kg از انستیتو پاستور کرج تهیه شد. خرگوش ها با پروتئین نوترکیب با دوز ۵۰۰µg همراه با ادجوانت کامل فروند به شکل زیرپوستی واکسینه شدند. خرگوش‌ها ۱۴ و ۲۸ روز پس از اولین تزریق واکسن، یادآور خود را همراه با ادجوانت ناقص فروند دریافت کردند. برای ایجاد سرم هیپرایمیون، ۲ هفته پس از آخرین تزریق، ۱۰۰µg از پروتئین‌های نوترکیب به شکل داخل وریدی به هر کدام از حیوانات تزریق شد تا عیار آنتی‌بادی افزایش یابد. ۷۲ ساعت پس از این تزریق، از خرگوش‌ها خونگیری (قلبی) به عمل آمد. سرم‌ها پس از جداسازی در ۲۰°C- نگهداری شدند. برای تهیه ایمونوگلوبولین ها (IgG) از سرم خرگوش و حذف برخی ناخالصی‌ها، محلول پروتئینی با سولفات آمونیوم ۳۵ درصد رسوب داده شد.

آزمایش الایزا

بدین‌منظور مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت ۱۰ میکروگرم آنتی‌ژن ScaF در هر چاهک الایزا (اکستراژن، کره) اضافه شده و به مدت یک شب در ۴ درجه سلسیوس قرار گرفت. سپس چاهک‌ها سه بار با بافر سالین حاوی ۰/۰۵ درصد توین ۲۰ شستشو داده شدند. بعد از شستشو، مقدار ۳۰۰ میکرولیتر از بافر مسدودکننده حاوی بافر نمکی فسفات- توین و ۵ درصد سرم آلبومین گاوی به مدت ۲ ساعت داخل هر چاهک انکوبه گردید. بعد از شستشو، ۱۰۰ میکرولیتر سرم خرگوشی از رقت ۱:۱۰۰ تا ۱:۲۰۴۸۰۰ تهیه و به هر چاهک اضافه گردید و در ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه شد. سپس چاهک‌ها با بافر شستشو دهنده، شستشو داده و بعد ۱۰۰ میکرولیتر از رقت ۱:۱۰۰۰۰ آنتی‌بادی کونژوگه با پراکسیداز (سیگما، آمریکا) به هر چاهک اضافه و ۱/۵ ساعت در ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه شد. بعد از چندین مرحله شستشو، ۱۰۰ میکرولیتر از معرف رنگزای TMB (انستیتو رازی، ایران) و در خاتمه به هر چاهک مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از اسید سولفوریک ۱ نرمال (مرک، آلمان) برای توقف واکنش اضافه گردید و جذب نوری در ۴۵۰ نانومتر قرائت گردید.

چالش حیوانات

به منظور سنجش و مقایسه میزان مرگ و میر گروه‌های موش ایمن شده با آنتی‌بادی نسبت به گروه‌های موشی غیر ایمن، گروه‌های تجربی با دوز 10^8 CFU سویه COL استافیلوکوکوس اورئوس آلوده گردیدند. میزان مرگ و میر موش‌ها به مدت ۱۴ روز مداوم، هر روز و در ضمن بعد از چالش مورد بررسی قرار گرفت.

تجویز آنتی بادی

اثر درمانی آنتی‌بادی‌های IgG اختصاصی ضد ScaF علیه عفونت ناشی از استافیلوکوکوس اورئوس توسط ایمنی‌زایی غیر فعال ارزیابی شد. بدین ترتیب که گروه‌بندی دسته‌های موشی شامل ۱۰ سر موش ماده ۷ هفته‌ای در گروه‌های زیر بودند:

گروه ۱: IgG اختصاصی ضد ScaF به صورت پروفیلاکسی (۴ ساعت قبل از عفونت و دو روز بعد از عفونت)، چالش با سویه استاندارد COL.

گروه ۲: IgG اختصاصی ضد ScaF به صورت درمانی (۲۴ ساعت بعد از عفونت)، چالش با سویه استاندارد COL.

گروه ۳: IgG سرم نرمال خرگوشی (گروه کنترل منفی) به صورت پروفیلاکسی، چالش با سویه استاندارد COL.

گروه ۴ : IgG سرم نرمال خرگوشی (گروه کنترل منفی) به صورت درمانی، چالش با سویه استاندارد COL.

گروه ۵: گروه شاهد (کنترل درمانی ونکومایسین)، چالش با سویه استاندارد COL.

آنتی بادی اختصاصی ضد ScaF از طریق تزریق داخل صفاقی به حجم نهایی ۱۰۰ میکرولیتر با به کارگیری دو روش مختلف (پروفیلاکسی و درمانی) مورد ارزیابی قرار گرفت. تجویز IgG سرم نرمال خرگوشی همانند رژیم درمانی بالا صورت گرفت. گروه کنترل درمانی تا سه روز بعد از عفونت، هر روز مقدار 15mg/kg ونکومایسین (هوسپیرا، آمریکا) به صورت تجویز داخل صفاقی دریافت نمودند.

اصول اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی

این پژوهش مطابق با استانداردها و پروتکل های کمیته تحقیق و اخلاق حیوانات (CARE) صورت پذیرفت. هم چنین مرگ موش های زنده مانده بعد از ۱۴ روز با استفاده از روش محفظه CO_2 انجام گرفت.

آنالیز آماری داده ها

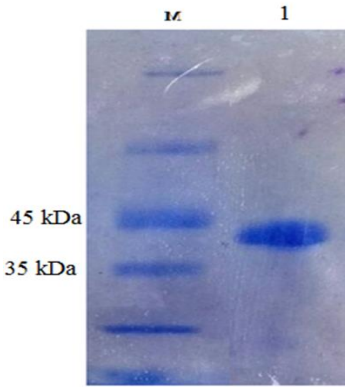
جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم افزار SPSS 21 استفاده شد. برای آنالیز داده‌های کمی از آزمون آنالیز

واریانس یک طرفه، روش LSD و آزمون Kaplan–Meier به منظور آنالیز مرگ و میر با سطح معنی‌دار $p< ۰/۰۵$ استفاده شد. نمودارها با نرم افزار Graphpad Prism آنالیز گردید.

یافته ها

تخلیص پروتئین نوترکیب

نتایج حاصل از روش غلظت کاهشی اوره بر روی ستون نیکل کروماتوگرافی، جمع‌آوری و جدا شدن صحیح پروتئین نوترکیب در محلول ایمیدازول را نشان می‌دهد که بررسی SDS-PAGE حاکی از تخلیص این پروتئین با وزن تقریبی ۴۰ کیلو دالتون می‌باشد (تصویر شماره ۱).



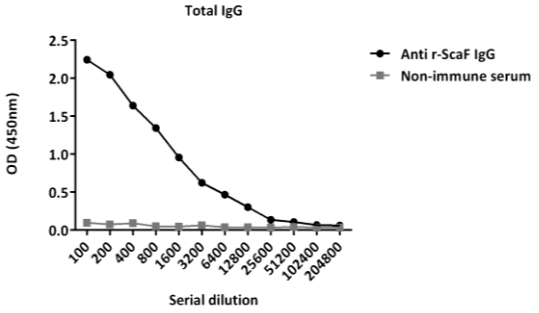
تصویر شماره ۱: ژل SDS-PAGE ۱۲ درصد. پروتئین نوترکیب تخلیص شده؛ (M) مارکر پروتئینی؛ چاهک ۱: پروتئین تخلیص شده

نتایج سنجش IgG توتال خرگوشی

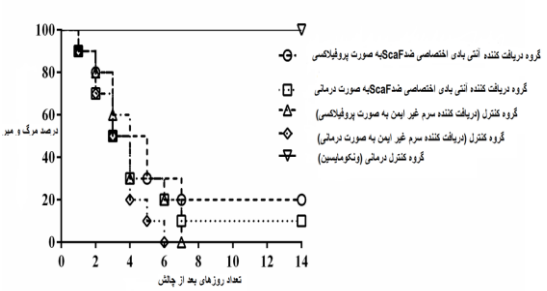
با توجه به آنالیز آماری، سرم‌های دریافت‌کننده آنتی‌ژن به همراه ادجوانت فروند اختلاف معنی داری را در مقابل سرم های غیر ایمن نشان می‌دهد ($p =۰/۰۰۰$) (نمودار شماره ۱).

محافظت در برابر سویه کشنده

میزان مرگ و میر موش‌ها به مدت ۱۴ روز مداوم بعد از چالش، مورد بررسی قرار گرفت. بقای حیوانات در مقایسه بین گروه کنترل منفی و گروه ایمن شده با آنتی‌بادی بین گروه‌های مختلف با رژیم‌های درمانی، هیچ اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ($p=۰/۴۴۷$ و $p=۰/۳۷۹$) (نمودار شماره ۲).



نمودار شماره۱: جذب نوری اندازه‌گیری شده IgG توتال سرم خرگوشی تولید شده در میان کنش با پروتئین نوترکیب ScaF پوشاننده کف پلیت الایزا



نمودار شماره ۲: میزان مرگ و میر بین گروه های مختلف موشی دریافت کننده آنتی بادی تولید شده ضد آنتی ژن ScaF با سویه COL در مقایسه با گروه کنترل درمانی وگروه کنترل منفی

بحث

طیف گسترده بیماری‌های ناشی از استافیلوکوکوس اورئوس به همراه توانایی کسب مقاومت آنتی‌بیوتیکی منجر به بروز مشکلاتی برای مقابله با این باکتری شده است(۱۲،۱۱). ایمنی هومورال یکی از ارکان سیستم ایمنی در ریشه‌کنی عفونت‌ها تلقی می‌گردد. در برخی از عفونت‌ها، سیستم ایمنی هومورال به تنهایی کارایی لازم در مواجه با عفونت را ندارد. برای مثال در بیماران دارای نقص سیستم ایمنی هومورال که در ابتلا به عفونت‌هایی ناشی از باکتری‌هایی نظیر استرپتوکوک

پنومونیه حساس می‌باشند، به عفونت‌های ناشی از استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم می‌باشند(۱۴،۱۳). هم‌چنین در برخی از مطالعات نشان داده شد که افرادی که دچار نقص در B سل‌ها و مشکل در تولید آنتی‌بادی می‌باشند، به عفونت استافیلوکوکوس اورئوس حساس نمی‌باشند(۱۶،۱۵). در مطالعه‌ای که روی حیوانات آزمایشگاهی انجام گرفت، به وضوح نشان داده شد که موش‌های دارای نقص در B سل‌ها، در مواجه با دوز عفونت‌زای باکتری استافیلوکوکوس اورئوس، اثرات حفاظت بخشی را نشان دادند(۱۷). بنابراین با توجه به مطالعات فوق‌الذکر، ایمنی هومورال نمی‌تواند نقش کلیدی در ریشه‌کنی عفونت ناشی از استافیلوکوکوس اورئوس را ایفا نماید که این مسئله هم‌خوانی با نتایج آزمایشگاهی این مطالعه دارد که نشان‌دهنده عدم حفاظت بخشی بر موش‌های آلوده بوده است. از سوی دیگر درمان با استفاده از آنتی‌بادی نمی‌تواند تا حد ممکن اثربخش باشد، چرا که در این گونه ایمنی‌زایی، از یک آنتی ژن تک جزئی استفاده می‌گردد که به تنهایی نمی‌تواند منجر به اثرات حفاظتی گردد(۱۸).

استافیلوکوکوس اورئوس دارای فاکتورهای ویرولانس متعددی می‌باشد که به‌عنوان عوامل ضد ایمنی هومورال نقش ایفا می‌کنند، لذا منجر به بی‌پاسخی B سل‌ها و عدم عملکرد آنتی‌بادی‌ها می‌گردند(۲۰،۱۹). بنابراین با توجه به آزمایش صورت گرفته در این مطالعه، انتخاب آنتی ژن به صورت تک جزئی، نمی‌تواند عامل غلبه بر این باکتری باشد. در ایمنی غیر فعال با استفاده از آنتی‌بادی، شاید تا حدودی از شدت بیماری کاسته شود، ولی به طور کامل عفونت از بین نمی‌رود. هم‌چنین احتمال شیوع مجدد عفونت وجود دارد، در حالی که در ایمنی فعال با استفاده از دوزهای یادآور و همکاری توام سلول‌های سیستم ایمنی، می‌توان از بروز بیماری پیشگیری کرد(۲۲،۲۱). با توجه به نتایج به دست آمده از این آزمایش، ایمنی غیرفعال نمی‌تواند به طور موثری در برابر حفاظت از این باکتری نقش داشته باشد، لذا می‌توان از طریق ایمنی فعال و افزایش سایتوکاین‌های وابسته به ایمنی سلولی از قبیل IFN-γ و اینترلوکین ۱۷، به مصونیت ناشی از عفونت این باکتری دست یافت(۲۳). در این مطالعه، افزایش تیتر آنتی‌بادی مشاهده شد، ولی اثربخش بودن آن تایید نگردید که می‌توان این گونه نتیجه گرفت که افزایش تیتر آنتی‌بادی علیه آنتی ژن مدنظر نمی تواند دلیلی بر قدرت حفاظت بخشی بر علیه عفونت باشد. با توجه به این مطالعه و آن چه که تاکنون در مطالعات برخی دیگر از دانشمندان صورت پذیرفته است(۲۳)، تمامی اثرات حفاظتی علیه استافیلوکوکوس اورئوس بر اساس ایمنی غیر فعال، با شکست مواجه گردید. هر چند که مطالعاتی مبتنی بر اثر حفاظتی درمان با آنتی‌بادی وجود دارد(۶،۵) که منجر به اختلاف نظرهایی در این زمینه گشته است. لذا با توجه به مطالعه صورت گرفته می‌توان این‌گونه نتیجه‌گیری کرد که ایمنی غیرفعال نسبت به ایمنی فعال از درجه اهمیت کم‌تری در از بین بردن عفونت‌های ناشی از استافیلوکوکوس اورئوس دارا می‌باشد. لذا برای پیشگیری و درمان عفونت‌های ناشی از این باکتری می‌توان با استفاده از تزریق دوزهای یادآور آنتی ژن و ایجاد سلول‌های خاطره‌ای به عنوان ایمنی فعال به جای تزریق مستقیم آنتی‌بادی (ایمنی غیر فعال) تا حد ممکن از بروز عفونت ناشی از آن جلوگیری کرد.

سپاسگزاری

این تحقیق با حمایت معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی تهران با شماره طرح ۲۶۵۷۶ صورت گرفته است.

References

1. Klevens RM, Morrison MA, Nadle J, Petit S, Gershman K, Ray S, et al. Invasive

methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in the United States. JAMA 2007; 298(15): 1763-1771.

2. Ohadian Moghadam S, Pourmand MR, Aminharati F. Biofilm formation and antimicrobial resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from burn patients, Iran. J Infect Dev Ctries 2014; 8(12): 1511-1517.
3. Spellberg B, Daum R. Development of a vaccine against *Staphylococcus aureus*. Semin Immunopathol 2012; 34(2): 335-348.
4. Schaffer AC, Lee JC. Vaccination and passive immunisation against *Staphylococcus aureus*. Int J Antimicrob Agents 2008; 32(suppl): S71-S78.
5. Rupp ME, Holley HP, Lutz J, Dicpinigaitis PV, Woods CW, Levine DP, et al. Phase II, randomized, multicenter, double-blind, placebo-controlled trial of a polyclonal anti-*Staphylococcus aureus* capsular polysaccharide immune globulin in treatment of *Staphylococcus aureus* bacteremia. Antimicrob Agents Chemother 2007; 51(12): 4249-4254.
6. DeJonge M, Burchfield D, Bloom B, Duenas M, Walker W, Polak M, et al. Clinical trial of safety and efficacy of IHN-A21 for the prevention of nosocomial staphylococcal bloodstream infection in premature infants. J Pediatr 2007; 151(3): 260-265. e1.
7. Kennedy AD, Wardenburg JB, Gardner DJ, Long D, Whitney AR, Braughton KR, et al. Targeting of alpha-hemolysin by active or passive immunization decreases severity of USA300 skin infection in a mouse model. J Infect Dis 2010; 202(7): 1050-1058.
8. Pourmand MR, Foster S. A novel bioinformatic approach for staphylococcal vaccine development. Tehran University Medical Journal (TUMJ) 2006; 64(6): 19-26.
9. Menbari S, Pourmand M, Shirazi MH, Mardani N. Cloning and Sequencing ofsacol a novel gene from *Staphylococcus aureus*. Iran J Med Microb 2008; 2(1): 9-14.
10. Pourmand MR, Salami E, Mehrabadi JF, Hadadi A, Mashhadi R. Bioinformatic and In-vitro Characterization of scaF as a Novel Gene for Identification of *Staphylococcus aureus* Isolates. J Mazandaran Univ Med Sci 2014; 24(116): 52-57.
11. Sakoulas G, Moellering RC. Increasing antibiotic resistance among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. Clin Infect Dis 2008; 46(Suppl 5): S360-S367.
12. Pourmand MR, Memariani M, Hoseini M, Yazdchi SB. High prevalence of sea gene among clinical isolates of *Staphylococcus aureus* in Tehran. Acta Medica Iranica 2009; 47(5): 357-361.
13. Bruton OC. Agammaglobulinemia. Pediatrics 1952; 9(6): 722-728.
14. Winkelstein JA, Marino MC, Lederman HM, Jones SM, Sullivan K, Burks AW, et al. X-linked agammaglobulinemia: report on a United States registry of 201 patients. Medicine (Baltimore) 2006; 85(4): 193-202.
15. Holland SM. Chronic granulomatous disease. Clin Rev Allerg Immu 2010; 38(1): 3-10.
16. Roos D, Kuhns DB, Maddalena A, Roesler J, Lopez JA, Ariga T, et al. Hematologically important mutations: X-linked chronic granulomatous disease (third update). Blood Cells Mol Dis 2010; 45(3): 246-265.
17. Spellberg B, Ibrahim AS, Yeaman MR, Lin L, Fu Y, Avanesian V, et al. The antifungal vaccine derived from the recombinant N terminus of Als3p protects mice against the bacterium *Staphylococcus aureus*. Infect Immun 2008; 76(10): 4574-4580.

18. Bagnoli F, Bertholet S, Grandi G. Inferring reasons for the failure of *Staphylococcus aureus* vaccines in clinical trials. Front Cell Infect Microbiol 2012; 2: 16.
19. Serruto D, Rappuoli R, Scarselli M, Gros P, van Strijp JA. Molecular mechanisms of complement evasion: learning from staphylococci and meningococci. Nature Reviews Microbiology 2010; 8(6): 393-399.
20. Atkins KL, Burman JD, Chamberlain ES, Cooper JE, Poutrel B, Bagby S, et al. S. aureus IgG-binding proteins SpA and Sbi: host specificity and mechanisms of immune complex formation. Mol Immunol 2008; 45(6): 1600-1611.
21. Proctor RA. Is there a future for a *Staphylococcus aureus* vaccine? Vaccine 2012; 30(19): 2921-2927.
22. Hermos CR, Yoong P, Pier GB. High Levels of Antibody to Panton-Valentine Leukocidin Are Not Associated with Resistance to *Staphylococcus aureus*—Associated Skin and Soft-Tissue Infection. Clin Infect Dis 2010; 51(10): 1138-1146.
23. Zhang BZ, Hua YH, Yu B, Lau CCY, Cai JP, Zheng SY, et al. Recombinant ESAT-6-like proteins provoke protective immune responses against invasive *Staphylococcus aureus* disease in a murine model. Infect Immun 2015; 83(1): 339-345.