Production and Evaluation of Anti-Mouse Polyclonal Antibody Against Enterotoxin B of Staphylococcus Aurous

Zeinab Najmi[1, 2], Soheil Ghasemi[1], Rohollah Ghalandari[3], Fattah Sotoudehnejad Nematalahi[1*]

[1]Department of Biology, School of Basic Sciences, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
[2]Shefa Neuroscience Research Center, Khatam Alanbia Hospital, Tehran, Iran
[3]Faculty of Chemistry and Chemical Engineering, Malek Ashtar University, Tehran, Iran

Article Info:

Received: **30 Sep 2019** ***Revised:*** **13 Nov 2019** ***Accepted*****: 20 Nov 2019**

ABSTRACT

Introduction: Staphylococcus aureus is an important microorganism that causes the development of various diseases in humans by secretion of factors that are known as supra-antigen of staphylococci. Enterotoxin B of Staphylococcus aureus is a bacterial antigen responsible for food poisoning in humans. To produce the corresponding polyclonal antibody, an antigen is injected into a susceptible animal and the serum of antibody content is extracted. Bacterial superantigens are potent T cell activators that can have acute or chronic effects on the central nervous system. This study aimed to develop a mouse polyclonal antibody againstenterotoxin B of Staphylococcus aureus. ***Materials and Methods:*** The Bradford method was used to determine protein concentration. For evaluation and identification of the antigen, the samples were transferred onto a nitrocellulose membrane by SDS-PAEG gel and analyzed by western blot analysis. Mice immunization was performed at intervals of zero, two, and four weeks using intraperitoneal injection. Antibody titer was measured in antisera isolated from the animal by the ELISA method. ***Results:*** Different concentrations of protein (0-32 µg) with different adsorption were calculated with the formula y = 0.0279x + 0.1222. There was no excess protein in the acrylamide gel. In the western blot analysis, the resulting bands represent complete conformance with the standard sample and are free from any unwanted protein. The results of the ELISA test were significant for the secretion of the second time at $p < 0.05$. In the double diffusion test, there was a bond between the control and the antigen. ***Conclusion:*** Prepared toxoid has completely lost its fecundity and therefore could be used to immunize and produce polyclonal antibodies against enterotoxin B of Staphylococci.

Key words:

1. Staphylococcus
2. Antibodies
3. Central Nervous System

***Corresponding Author:** Fattah Sotoudehnejad Nematalahi

E-mail: *fattah212@gmail.com*

تولید و بررسی آنتی‌بادی پلی‌کلونال موشی علیه انتروتوکسین B استافیلوکوکوس اورئوس

زینب نجمی[۱،۲]، سهیل قاسمی[۱]، روح ا... قلندری[۳]، فتاح ستوده نژاد نعمت اللهی[۱*]

[۱]گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

[۲]مرکز تحقیقات علوم اعصاب شفا، بیمارستان خاتم‌الانبیاء، تهران، ایران

[۳]دانشکده شیمی و مهندسی شیمی، دانشگاه مالک اشتر، تهران، ایران

اطلاعات مقاله:

دریافت: ۸ مهر ۱۳۹۸ **اصلاحیه:** ۲۲ آبان ۱۳۹۸ **پذیرش:** ۲۹ آبان ۱۳۹۸

چـــــکیده

مقدمه: استافیلوکوک اورئوس یک میکروارگانیسم مهم است که با ترشح فاکتورهایی که به‌عنوان سوپر آنتی‌ژن استافیلوکوک شناخته می‌شوند، باعث ایجاد بیماری‌های مختلف در انسان می‌شود. انتروتوکسین B استافیلوکوکوس اورئوس یک آنتی‌ژن باکتریایی است که مسئول مسمومیت غذایی در انسان می‌باشد. برای تولید آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال، آنتی‌ژن مربوطه به یک حیوان حساس تزریق می‌شود و سرم محتوی آنتی‌بادی از آن استخراج می‌شود. سوپر آنتی‌ژن‌های باکتری که فعال‌کنندهٔ سلول‌های T قوی هستند می‌توانند بر روی سیستم عصبی مرکزی اثرات حاد یا مزمن داشته باشند. این تحقیق با هدف تولید آنتی‌بادی پلی‌کلونال موشی علیه انتروتوکسین B استافیلوکوکوس اورئوس انجام شده است. ***مواد و روش‌ها:*** برای تعیین غلظت پروتئین از روش بردفورد استفاده شد. برای ارزیابی و شناسایی آنتی‌ژن، نمونه‌ها از ژل SDS-PAEG بر روی غشاء نیترو سلولزی انتقال داده شد و توسط وسترن بلات آنالیز صورت گرفت. ایمن‌سازی موش‌ها در فواصل صفر، دو هفته و چهار هفته به صورت تزریق داخل صفاقی انجام شد. تیتر آنتی‌بادی در آنتی‌سرم جدا شده از حیوان به روش الایزا اندازه‌گیری شد. ***یافته‌ها:*** غلظت‌های مختلف پروتئین (۳۲-۰ میکروگرم) با جذب‌های مختلف با فرمول y=۰/۰۲۷۹ x + ۰/۱۲۲۲ محاسبه شد. در ژل آکریل آمید پروتئین باند اضافه دیده نشد. در تجزیه و تحلیل وسترن بلات باندهای حاصل همگی بیانگر تطابق کامل با نمونه استاندارد بوده و عاری از هر گونه پروتئین ناخواسته بود. نتایج آزمایش الایزا در نوبت دوم در $P<0/05$ معنی‌دار بود. در آزمایش دابل دیفیوژن بین نمونهٔ شاهد و آنتی‌ژن باند وجود داشت. ***نتیجه‌گیری:*** توکسوئید تهیه شده خاصیت کشندگی خود را به طور کامل از دست داده و بنابراین می‌تواند برای ایمن‌سازی و تولید آنتی‌بادی پلی‌کلونال علیه انتروتوکسین B استافیلوکوکوس استفاده شود.

کلید واژه‌ها:

۱. استافیلوکوکوس
۲. آنتی‌بادی
۳. سیستم عصبی مرکزی

* **نویسنده مسئول:** فتاح ستوده نژاد نعمت اللهی

آدرس الکترونیکی: *fattah212@gmail.com*

مقدمه

باکتری استافیلوکوکوس اورئوس یکی از شایع‌ترین علت‌های مسمومیت غذایی است. استافیلوکوکوس اورئوس طیف گسترده‌ای از اگزوپروتئین‌ها و توکسین‌های پروتئینی را تولید می‌نماید که در روند بیماریزایی باکتری مؤثر می‌باشد. از سوی دیگر استافیلوکوکوس اورئوس از عوامل مهم عفونت‌های پوست، بافت‌های نرم و همچنین باکتریمی می‌باشد که از طریق محیط بیمارستانی یا جامعه کسب می‌شوند (۱، ۲). این باکتری دارای توکسین‌های مختلفی از جمله لوکوسیدین، همولیزین و انتروتوکسین می‌باشد که در بین آن‌ها انتروتوکسین از اهمیت بسیار زیادی برخوردار است (۳). انتروتوکسین‌های استافیلوکوکوس (SEs)[1] سوپر آنتی‌ژن‌هایی (SAgs)[2] هستند که با قابلیت تحریک جمعیت‌های بزرگی از لنفوسیت‌های T منجر به تولید سایتوکاین‌ها می‌شوند (۴). تاکنون تعداد بیست سوپر آنتی‌ژن استافیلوکوکوس شناسایی شده است که شامل انتروتوکسین‌های A-V و توکسین سندرم شوک سمی-۱ (TSST-1)[3] می‌باشد (۵). امروزه بیش از ۱۸ نوع انتروتوکسین استافیلوکوکی شناخته شده که در این میان، انتروتوکسین‌های کلاسیک (A، B، C،D ، E) نقش بیشتری در مسمومیت‌های غذایی دارند (۶) که مهم‌ترین آن‌ها انتروتوکسین‌های A و B هستند زیرا باکتری تولیدکنندهٔ توکسین در دست افراد به صورت فلور طبیعی وجود دارد و اگر مسائل بهداشتی رعایت نشود، این باکتری فرصت رشد و تولید توکسین یافته و توکسین مقاوم به حرارت تولید می‌شود. از مهم‌ترین سموم تولید شده توسط استافیلوکوک‌ها، سم انتروتوکسین می‌باشد (۷). انتروتوکسین استافیلوکوک خانواده‌ای از پروتئین‌های ترشح شده توسط استافیلوکوک اورئوس‌ها می‌باشد که در غلظت‌های بسیار کم، سمی[4] هستند (۸). انتروتوکسین B استافیلوکوک (SEB)[5] یکی از اعضای خانوادهٔ سوپر آنتی‌ژن‌ها می‌باشد که عامل مسمومیت می‌باشد، بنابراین توسط مراکز مدیریت و پیشگیری بیماری (CDC)[6] و مؤسسهٔ ملی بهداشت ایالات متحده به‌عنوان یک پاتوژن ردهٔ B دسته‌بندی شده است. SEB برخلاف آنتی‌ژن‌های معمولی، باعث فعال شدن T cell های پلی‌کلونال می‌شود که تحت پردازش پروتئولیتیک[7] با سلول‌های عرضه‌کنندهٔ آنتی‌ژن (APC)[8] برخورد و به‌عنوان MHC[9] ارائه می‌شود (۹، ۱۰). پیوند متقابل بین MHC-II و TCR[10] توسط سوپر آنتی‌ژن‌ها، APCها و T cell را می‌تواند فعال کند (۱۱). SEB به صورت آئروسل نیز قابل انتشار است (۱۲). در هنگام استنشاق، دوز مؤثر[11] ED50=۰/۰۰۰۴ میکروگرم/کیلوگرم از SEB در انسان ناتوان‌کننده است، در حالی که دوز LD50=۰/۰۲ میکروگرم/کیلوگرم از SEB می‌تواند کشنده باشد. SEB پس از استنشاق یک واکنش تقریباً فوری در ریه را آغاز می‌کند که توسط نفوذ نوتروفیل‌ها، انتشار عظیم سایتوکاین و تغییرات پاتولوژیک مشخص شده است (۱۳).

خصوصیات منحصر به فرد این توکسین شامل: ۱- قابلیت پخش شدن در هوا ۲- تشکیل ذرات آئروسل ۳- عدم شناسائی آن در فرد آلوده (تا قبل از بروز علایم کلینیکی) ۴- مقاوم بودن در شرایط محیطی ۵- امکان ناتوان‌سازی طیف زیادی از افراد ۶- امکان تولید در مقادیر انبوه ۷- کوتاه بودن مدت زمان بروز (طی ۳ و گاهی ۲۴-۸ ساعت) ۸- زمین‌گیر کردن افراد به مدت ۲ هفته ۹- عدم وجود واکسن و یا آنتی‌سرم مؤثر ۱۰- حساسیت طیف زیادی از مردم می‌باشند.

آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال با ایمونیزه کردن حیوانات مناسب تولید می‌شوند و آنتی‌ژن مورد نظر به همراه ادجوانت[12] مناسب به حیوان تزریق می‌شود (۱۴). آنتی‌بادی‌های کلاس IgG علیه آنتی‌ژن در بدن حیوان توسط لنفوسیت‌های B اختصاصی تولید می‌شوند، این آنتی‌بادی‌ها از سرم حیوان جدا می‌شوند (۱۵). آنتی‌بادی‌های تولید شده، از لنفوسیت‌های B اختصاصی علیه اپی‌توپ‌های متفاوت تولید می‌شوند (۱۶، ۱۷). آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال مخلوطی از آنتی‌بادی‌های مونوکلونال می‌باشند که علیه اپی‌توپ‌های مختلف آنتی‌ژن تولید می‌کنند و با تمایل[13] بالا به مولکول‌های آنتی‌ژن اتصال می‌یابند که احتمالاً به دلیل وجود انواع مختلف آنتی‌بادی علیه اپی‌توپ‌های مختلف آنتی‌ژن می‌باشد (۱۸). اولین و مهم‌ترین گام در تولید آنتی‌بادی تهیه آنتی‌ژن مناسب است.

تاکنون مطالعات مختلفی در خصوص نقش عفونت‌های استافیلوکوکوس اورئوس و توکسین SEB در التهابات سیستم عصبی مرکزی و بیماری‌های خود ایمنی و همچنین بیماری‌های ضعیف‌کنندهٔ سیستم عصبی مرکزی انجام شده است. به‌عنوان مثال نقش سوپر آنتی‌ژن‌های استافیلوکوکی در بیماری‌های خود ایمنی مانند مالتیپل اسکلروز (MS)[14]، گرانولوماتوز وگنر[15] و روماتیسم مفصلی (RA)[16] در مطالعات مختلفی مورد بررسی قرار گرفته است (۱۹، ۲۰). MS یک بیماری

[1] Staphylococcal enterotoxins
[2] Superantigen
[3] Toxic shock syndrome toxin-1
[4] Toxic
[5] Staphylococcus B enterotoxin
[6] Centers for disease control
[7] Proteolytic
[8] Antigen presenting cell
[9] Major histocompatibility complex
[10] T-cell receptor
[11] Effective dose
[12] Adjuvant
[13] Affinity
[14] Multiple sclerosis
[15] Wegener's granulomatosis
[16] Rheumatoid arthritis

خودایمنی دمیلینه کنندهٔ التهابی در سیستم عصبی مرکزی (CNS)[17] است (۲۱). اولین سوپر آنتی‌ژن‌هایی که به‌خصوص در فعال شدن سلول T مشخص می‌شوند عبارتند از: استافیلوکوکوس اورئوس انتروتوکسین‌ها (A،B ، C، D و E) و اگزوتوکسین (توکسین سندرم شوک سمی) که همان انتروتوکسین‌ها (A و B) هستند که در MS دخیل بوده‌اند (۲۲). سوپر آنتی‌ژن‌ها می‌توانند سلول‌های T را فعال کنند و بنابراین ممکن است در پیشرفت بیماری‌های خودایمنی مانند MS نقش داشته باشد (۲۳، ۲۴). برخی از فاکتورهای منتشر شده توسط باکتری‌ها تأثیر بر التهاب خود ایمنی در سیستم عصبی مرکزی دارند. عفونت‌های باکتریایی علایم بیماری MS را بدتر می‌کند و منجر به افزایش بیماری‌های تحلیل برندهٔ عصبی[18] می‌شود. در مقابل، در مطالعهٔ Kumar و همکارانش در سال ۲۰۱۵ برای اولین بار نشان داده شد که عفونت مزمن با استافیلوکوکوس اورئوس التهاب سیستمیک محیطی شدید را القا می‌کند. علاوه بر این، عفونت استافیلوکوکوس اورئوس باعث کاهش التهاب خود ایمنی سیستم عصبی مرکزی و شدت optic neuritis خود ایمنی شده است (۲۵). ارتباط بین سوپر آنتی‌ژن‌های باکتریایی و MS ابتدا بر اساس آزمایشات با استفاده از مدل آزمایشگاهی آنسفالومیلیت خود ایمنی (EAE)[19] انجام شد (۲۶). نقش SEB در اتیولوژی[20] MS در حال حاضر ناشناخته است (۲۷). در مطالعه‌ای Doenlen و همکارانش فعالیت عصبی در شرایط in vivo در دو ناحیهٔ خاص قشر لیمبیک مربوط به پردازش ورودی و مسیرهای مرتبط با دیگر پیام‌رسانی‌های حسی و همچنین ناحیهٔ آمیگدال ثبت شد. در این مطالعه الکترودهای بالغ تک قطبی در مغز موش‌های بالغ کاشته شد و فعالیت الکتریکی به صورت یکطرفه قبل و پس از در معرض قرار گرفتن دو ایمیوژن مختلف بررسی شد، LPS به‌عنوان آنتی‌ژن مستقل از T-cell و SEB به‌عنوان آنتی‌ژن وابسته به T-cell. فعالیت عصبی پس از تکرار تجویز آنتی‌ژن‌ها بررسی شد، آنتی‌ژن SEB باعث تضعیف پاسخ ایمنی شد (۲۸). در مطالعه‌ای دیگر نشان داده شد که عفونت‌های استافیلوکوکوس اورئوس مغز ممکن است منجر به تشنج شود که نشان‌دهندهٔ تداخل در انتقال طبیعی ناقلین عصبی[21] مغز است. در این مطالعه استافیلوکوکوس اورئوس به درون استریاتوم مغز موش تزریق شد که به دنبال آن سطح گلوتامات خارج سلولی ۷۶ درصد کاهش یافت. در این مطالعه چنین نتیجه‌گیری شد که افزایش چشمگیر غلظت اسیدهای آمینه خارج سلولی می‌تواند با انتقال عصبی بافت اطراف مغز تداخل داشته باشد و به دنبال آن تشنج رخ دهد. گزارش‌های متعددی مبنی بر جذب SEB توسط مکانیسم‌های دفاعی سیستم عصبی میزبان وجود دارد (۲۹).

این مطالعه با هدف بررسی تولید آنتی‌بادی پلی‌کلونال موشی علیه انتروتوکسین B استافیلوکوکوس اورئوس انجام شده است.

مواد و روش‌ها

توکسین نوترکیب SEB در مطالعه‌ای دیگر و با انتقال توالی ژنی کدکنندهٔ این توکسین در باکتری تولید و توسط سیستم کروماتوگرافی تخلیص و تغلیظ گردید. برای تعیین غلظت SEB، از روش برادفورد استفاده شد. بدین صورت که غلظت SEB استاندارد (شرکت سیگما، S4881) در رقت‌های مختلف (۰-۳۲ میکروگرم) در طول موج ۵۹۵ نانومتر اندازه‌گیری و به‌عنوان منحنی استاندارد استفاده شد.

SDS-PAGE و وسترن بلات

الکتروفورز پروتئین‌ها با روش SDS-PAGE در دستگاه الکتروفورز Bio-Rad انجام شد. برای مشاهدهٔ باند آنتی‌ژن SEB ، ژل ۱۲/۵ درصد پلی آکریل آمید استفاده شد. میزان بیان باندهای پروتئین SEB با استفاده از روش وسترن بلات آنالیز گردید. آنتی‌بادی‌های اولیه و ثانویه Rabbit-Anti-SEB و Anti-Rabbit-HRP در رقت ۱/۱۰۰۰ استفاده شد. نمونه‌ها از روی ژل با روش Semi Dry (Bio Rad, USA) بر روی غشاء نیتروسلولزی انتقال داده شد.

تولید توکسوئید انتروتوکسین B

توکسین SEB به علت سمیت زیاد قابل استفاده به صورت تزریق مستقیم نیست به همین دلیل در اثر مجاورت با فرمالدئید خاصیت سمی خود را از دست می‌دهد، در حالی که همچنان یک آنتی‌ژن قوی به شمار می‌رود. ۱ میلی‌گرم از توکسین نوترکیب SEB به همراه یک درصد فرمالدئید بر روی استیرر به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۴۰ درجه انکوبه شد. قبل از تزریق نمونهٔ توکسوئید به حیوان بایستی از حذف قدرت سمی نمونه اطمینان حاصل شود. برای اطمینان از حذف خاصیت سمی، محصول این مرحله در غلظت‌های مختلف به صورت درون صفاقی به موش تزریق و تحت بررسی قرار گرفته و بهترین دوز برای انجام بقیهٔ مراحل کار انتخاب شد.

تهیهٔ آنتی‌بادی

در این مطالعه از موش‌های ماده Balb/c ۱۰، ۹ هفته‌ای به وزن ۲۲-۱۸ گرم استفاده شد که به دو گروه: آزمون (۱۵ سر موش) و کنترل (۳ سر موش) تقسیم شدند. جهت تحریک هرچه بیشتر سیستم ایمنی حیوان و افزایش تیتر آنتی‌بادی تولیدی، از ادجوانت فروند استفاده شد. توکسوئید حاصل را به نسبت یک به یک در تزریق

[17] Central nervous system
[18] Neurodegeneration
[19] Experimental autoimmune encephalomyelitis
[20] Etiology
[21] Neurotransmitters

اول با ادجوانت کامل فروند[22]، در تزریقات دوم و سوم با ادجوانت ناقص فروند[23] همگن کرده و به صورت داخل صفاقی[24] به موش‌ها تزریق شد.

الایزا

الایزا به‌عنوان یک روش مفید و مناسب در تجزیه و تحلیل فعالیت آنتی‌بادی -آنتی‌ژن به کار می‌رود. برای اثبات پیشرفت تولید آنتی‌بادی پلی‌کلونال، ایمن شدن موش و همچنین برای تعیین تیتر از روش الایزای غیر مستقیم استفاده شد. در این بررسی توکسین نوترکیب SEB و توکسین SEB استاندارد به غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در کف پلیت تثبیت شدند. پس از بلاکینگ (BSA ۲ درصد)، ابتدا رقت‌های مختلف سرم و سپس آنتی‌بادی ضد IgG موشی نشاندار با HRP اضافه شد. میزان واکنش سوبسترای TMB در طول موج ۴۵۰ نانومتر خوانش گردید. از توکسین SEB استاندراد و همچنین آنتی‌بادی مونوکلونال ضد SEB جهت کنترل مثبت در روند الایزا استفاده گردید. تیتر الایزا، در رقت‌های سرم موش (۱/۱۰، ۱/۱۰۰، ۱/۱۰۰۰، ۱/۱۰۰۰۰) و خواندن جذب (OD)[25] در دستگاه الایزا ریدر در طول موج ۴۵۰ نانومتر به دست آمد.

ایمونودیفیوژن

ایمونودیفیوژن تست کیفی جهت مشاهدهٔ تیتر آنتی‌بادی می‌باشد. در این تحقیق از روش دابل دیفیوژن استفاده شد. دابل دیفیوژن روش نیمه کمی است که مبنای آن حرکت اختصاصی آنتی‌ژن و آنتی‌بادی به طرف هم و ایجاد رسوب ثابت و بدون حرکت ناشی از تشکیل کمپلکس آنتی‌ژن و آنتی‌بادی در بستر ژلی می‌باشد. برای بررسی آنتی‌بادی به روش ایمونودیفیوژن، درون پلیت حاوی ژل آگارز، چهار چاهک ایجاد شد. درون چاهک‌های مختلف به ترتیب زیر توکسوئید (۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر)، توکسین خالص SEB (۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر)، PBS و آنتی‌سرم موش ایمن شده قرار داده شد.

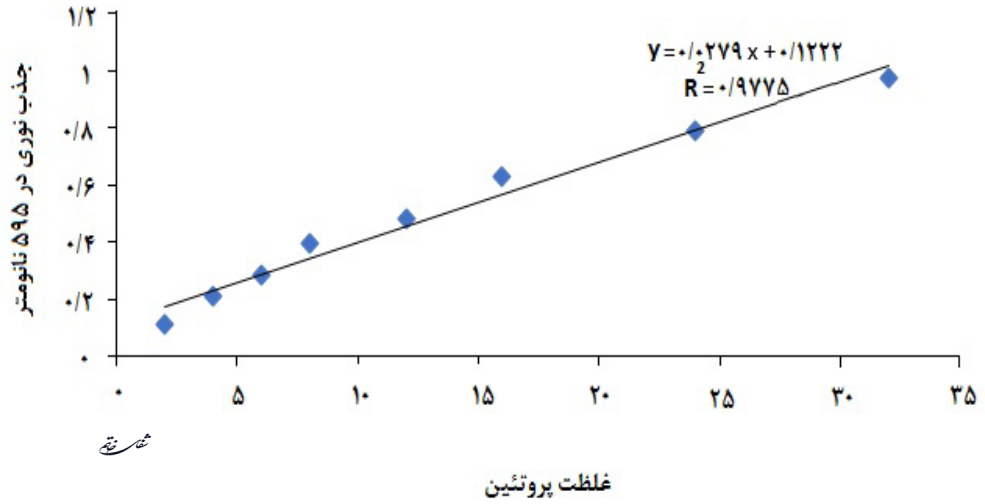
یافته‌ها

غلظت پروتئین

میزان جذب در طول موج ۵۹۵ در غلظت‌های مختلف SEB مطابق جدول ۱ می‌باشد. منحنی استاندارد با استفاده از غلظت‌های مختلف رسم شد (نمودار ۱). OD ۵۹۵ نمونه آنتی‌ژن برابر با ۰/۷۱ بود. با توجه به OD ۵۹۵ حاصل از نمونه آنتی‌ژن و مطابق با فرمول ذکر شده در مواد و روش‌ها غلظت SEB برابر با ۲۱/۰۶، تعیین گردید.

جدول ۱- مقادیر پروتئین SEB و مقدار جذب آن‌ها در ۵۹۵ نانومتر.

غلظت پروتئین در ۱۰۰ ماکرولیتر	۳۲ میکروگرم	۲۴ میکروگرم	۱۶ میکروگرم	۱۲ میکروگرم	۸ میکروگرم	۶ میکروگرم	۴ میکروگرم	۲ میکروگرم	۱ میکروگرم	۰/۵ میکروگرم	۰/۰ میکروگرم
OD	۰/۹۷۲	۰/۷۹	۰/۶۳	۰/۴۸	۰/۳۹۸	۰/۲۸۶	۰/۲۱۲	۰/۱۱۲	۰/۰۶۳	۰/۰۶۹	۰/۰

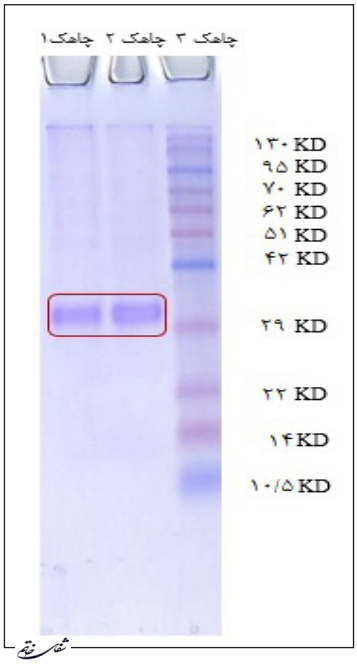


نمودار ۱- منحنی استاندارد معرف برادفورد جهت اندازه‌گیری غلظت پروتئین.

[22] Freunds complete adjuvant
[23] Freunds incomplete adjuvant
[24] Intraperitoneal
[25] Optical density

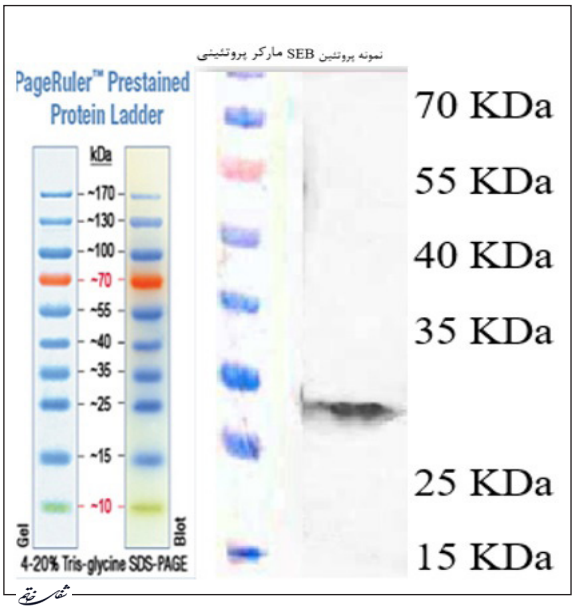
SDS-PAGE و وسترن بلات آنتی‌ژن SEB

جهت اطمینان از کیفیت آنتی‌ژن، الکتروفورز و وسترن بلات علیه توکسین SEB در رقت ۱/۱۰۰۰ انجام شد و باند آنتی‌ژن در محدودهٔ باند ۴۲-۲۹ کیلودالتون به صورت تک باند مشاهده شد (تصویر ۱).



تصویر ۱- SDS -PAGE آنتی‌ژن استخراج شده. چاهک ۱: پروتئین SEB تکرار اول، چاهک ۲: پروتئین SEB تکرار دوم، چاهک ۳: مارکر پروتئین.

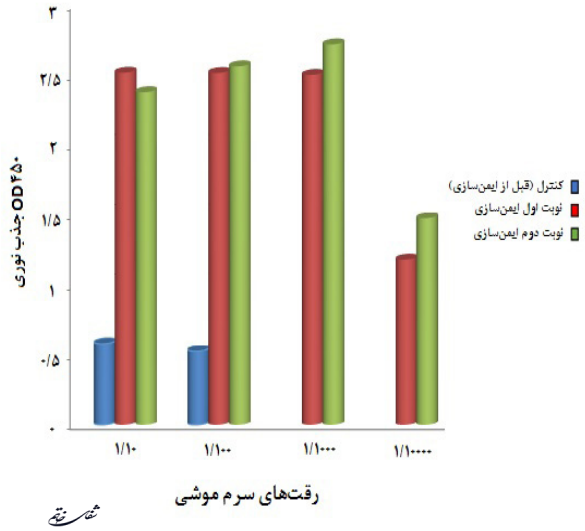
باند حاصل از وسترن بلات با باند مشاهده شده در SDS-PAGE همخوانی داشت که می‌تواند تأییدکنندهٔ این باشد که نمونهٔ SEB حاصل شده خالص و صحیح می‌باشد. لازم به ذکر است که باند SEB در محدودهٔ بین باند ۲۵ و ۳۵ کیلو دالتون قرار دارد.



تصویر ۲- میزان بیان باندهای پروتئین SEB با استفاده از وسترن بلات بر روی پروتئین SEB.

تایید ایمن‌سازی با الایزا

در راستای تایید حذف قدرت سمی توکسین، موش‌های گروه توکسین فعال با غلظت ۱ میکروگرم بر کیلوگرم و بالاتر در بازهٔ زمانی یک هفته مردند ولی در گروه توکسوئید همهٔ موش‌ها زنده بودند ولی در گروه ۱۰۰ میکروگرم بر کیلوگرم در هفتهٔ اول تب و بی‌حالی مشاهده شد که به مرور زمان رفع گردید. پس از اطمینان از حذف سمیت در توکسوئید حاصل، تزریق انجام گرفت. خونگیری از رگ دمی موش‌ها بعد از هر بار تزریق انجام شد. از سرم‌های فیلتر شده برای تایید ایمن‌سازی و تولید آنتی‌بادی استفاده شد. با توجه به نمودار ۳، تیتر الایزا حاصل از تزریق داخل صفاقی به موش‌های Balb/C پس از تزریق اول و دوم در حد قابل قبولی ($P<0/05$) نسبت به تیتر به دست آمده در گروه‌های کنترل که ایمن نشده بودند می‌باشد (نمودارهای حاصل از میانگین ۳ بار تکرار در الایزا ثبت شده‌اند).



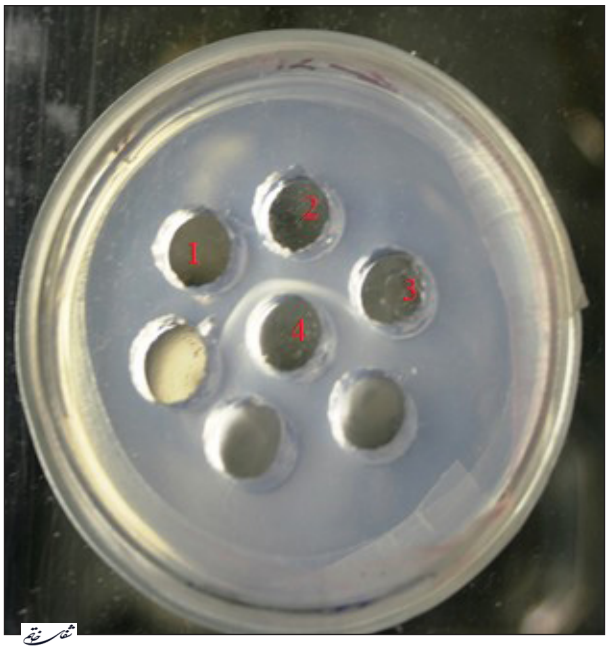
نمودار ۲- تیتر الایزای نمونه‌های سرم خون موش.

ژل دیفیوژن توکسین و توکسوئید

در این آزمایش واکنش متقاطع بین آنتی‌ژن و آنتی‌بادی به صورت خط رسوبی دیده می‌شود. آنتی‌سرم موش ایمن شده با نمونه‌های توکسوئید و توکسین SEB استاندارد جواب مثبت و با بافر فسفات جواب منفی نشان داد.

بحث و نتیجه‌گیری

در مطالعهٔ حاضر بررسی آنتی‌بادی پلی‌کلونال موشی علیه انتروتوکسین B استافیلوکوکوس اورئوس با روش الایزا انجام شد. آنتی‌بادی‌ها ابزاری برای تحقیقات ضروری و تشخیص‌های بالینی هستند. امروزه ثابت شده است که استفاده از آنتی‌بادی‌ها برای تحقیقات درمانی و تشخیصی مفید می‌باشد (۳۰). برای تعیین تیتر آنتی‌بادی پلی‌کلونال، الایزا مناسب‌ترین روش



تصویر ۳- ژل دیفیوژن بر روی توکسین و توکسوئید SEB درون پلیت حاوی ژل، چهار چاهک ایجاد شد. درون چاهک‌های مختلف به ترتیب زیر (۱) توکسوئید، (۲) توکسین SEB استاندارد، (۳) PBS و (۴) آنتی‌سرم موش ایمن شده قرار داده شد.

است. تخلیص آنتی‌بادی برای بسیاری از انواع روش‌های تشخیص مفید است.

فرمالدئید از دیر باز برای غیر فعالسازی توکسین‌ها، بدون صدمه زدن به خصوصیات آنتی‌ژنیک مورد استفاده قرار گرفته است. در مطالعهٔ Abrignani و همکاران در سال ۱۹۹۴ برای غیر فعالسازی انتروتوکسین B از فرمالدئید استفاده شده است. در این مطالعه SEB در فرمالدهید ۰/۳ درصد در دمای ۳۷ درجهٔ سانتیگراد به مدت ۴۰-۳۶ ساعت مقاوم بود، در حالی که SEB طی این شرایط پس از ۱۰ روز غیرفعال شد ولی در غلظت ذکر شده در دمای یخچال به مدت ۱۴-۵ ماه مقاوم بود. همچنین نشان داده شد که SEB با فرمالدهید ۰/۷ درصد در PH=۸ می‌تواند غیرفعال شود. جهت غیر فعالسازی SEB، بسته به دمای آزمایش، مدت زمان لازم جهت تماس می‌تواند متغیر باشد، مثلاً جهت کار در دمای ۵۰ °C به مدت ۲۴ ساعت و در دمای ۳۷ °C به مدت ۳ هفته زمان نیاز است. لازم به ذکر است توکسوئید حاصل از این روش در تست بی‌ضرری در خرگوش با دوز ۰/۵ میلی‌گرم نتوانسته کاهش وزنی بیش از ۵۰ گرم ایجاد نماید (۳۱).

در مطالعهٔ Sidney و همکارانش در سال ۱۹۶۹ SEB خالص‌سازی شده فاقد همولیزین‌ها، آپیراز و سایر متابولیت‌ها در بافر فسفات سالین ۰/۲ مولار با PH=۷/۳ محلول‌سازی شد. غلظت توکسین در محلول حاصل، ۱ میلی‌گرم در هر میلی‌لیتر بود و غلظت فرمالدهید از ۰/۱ تا ۱/۴ درصد در مدت زمان‌های مختلف انکوباسیون مورد مطالعه قرار گرفت. در طول مدت انکوباسیون PH اندازه‌گیری و در ۷/۳ کنترل شد، بعد از دورهٔ انکوباسیون با دیالیز فرمالدهید زدایی انجام شد (۳۲).

فرمالدهید با اتصال به عوامل آمینی و آمیدی در این توکسین، سمیت آن را از بین برده ولی خاصیت آنتی‌ژنیستهٔ آن را حفظ کرده است. در مقایسه با پریمات‌ها، موش‌ها از حساسیت زیادی نسبت به اثرات توکسیک انتروتوکسین‌های استافیلوکوکوس برخوردار نیستند (۳۳). در ادامه با کمک لیپو پلی‌ساکارید حساسیت پاسخ افزایش داده شد. توکسین SEB در غلظت ۳۰ میکروگرم و لیپو پلی‌ساکارید در غلظت ۲۵۰-۱۵۰ میکروگرم به تنهایی به موش داده شد، پس از آن هیچ‌گونه اثر مرگباری در موش مشاهده نشد. پس از تعیین دوز معین، توکسوئید به موش‌های Balb/c که به این سم حساس هستند به صورت داخل صفاقی تزریق و به مدت یک هفته از موش‌های تزریقی نگهداری شد. عدم مرگ و میر در این موش‌ها نشان داد که توکسوئید حاصل دقیقاً خاصیت سمیت خود را از دست داده است و آنتی‌ژن غیرفعال شده است.

مطالعات مختلفی با هدف تهیه و تخلیص آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال علیه آنتی‌ژن‌های باکتری‌های مختلف انجام شده است، برای مثال در سال ۲۰۱۲ بابایی و همکاران، مطالعه‌ای با هدف تهیه و تخلیص آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال علیه آنتی‌ژن‌های مایکوباکتریوم آویوم پاراتوبرکلوزیس (MAP)[۲۶] در خرگوش انجام دادند. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که القاء پاسخ ایمنی در خرگوش و تولید آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال در تیتر بالا با پاسخ مثبت به آنتی‌ژن‌ها صورت می‌پذیرد (۳۴). از آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال می‌توان جهت بررسی میزان پاسخ آنتی‌بادی به آنتی‌ژن‌های مختلف استفاده کرد و نتایج به دست آمده را می‌توان در تست‌های تشخیصی سرولوژیکی نظیر الایزا استفاده نمود.

و در مطالعات دیگر، برازش و همکاران در سال ۱۳۸۵، برای تولید آنتی‌بادی پلی‌کلونال علیه ژیاردیا لامبلیا در خرگوش مطالعه انجام دادند. جهت تحریک هرچه بیشتر سیستم ایمنی حیوان و افزایش تیتر آنتی‌بادی تولیدی، تزریق اول با استفاده از ادجوانت کامل فروند و تزریق یادآور بعدی با ادجوانت ناقص و تزریق‌های بعدی را بدون ادجوانت انجام دادند. برای اثبات پیشرفت تولید آنتی‌بادی پلی‌کلونال با روش الایزای غیر مستقیم انجام شد .ایمن شدن حیوان با جذب نوری بالای یک با تیتر سرمی ۱/۲۰۰۰ و رقت کونژوگه تا ۱/۱۰۰۰۰ به دست آمد (۳۵) که در مطالعهٔ ما ایمن‌سازی موش با الایزای غیر مستقیم در تیتر ۱/۱۰۰ انجام شد. Olad و همکاران در سال ۲۰۱۴ تولید و خالص‌سازی آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال علیه توکسین دیفتری انجام دادند. برای تایید پروتئین از روش SDS-PAGE و وسترن بلات استفاده کردند که

[26] Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis

باندشان در محدودهٔ ۲۵ کیلودالتون مشاهده شد. برای تیتراسیون آنتی‌بادی از روش الایزا استفاده کردند که پس از هر تزریق سطح آن‌ها افزایش می‌یافت که در رقت ۱/۵۰۰ بهترین نتیجه را به دست آوردند (۳۶). در مطالعهٔ مجیدی و همکارانش در سال ۲۰۱۵ تولید و خالص‌سازی آنتی‌بادی پلی‌کلونال علیه IgG2b موش خالص در خرگوش‌ها برای طراحی کیت‌های ایزوتایپ مونوکلونال موش انجام دادند، تعیین تیتر ۳۲۰۰۰ در الایزا نشان از کیفیت بالای محصول است که در الایزا مستقیم در برابر IgG2b موش، رقت بهینهٔ IgG کونژوگه شده HRP تهیه شده ۱:۱۰۰۰۰ بود (۳۷).

در مطالعهٔ حاضر، تزریقات در گروه کنترل با ادجوانت آلوم و گروه آزمون با نمونهٔ تزریقی فرموله شده انجام شد، در الایزا OD بالای ۱/۵ مناسب برای نتیجه‌گیری نیست و رقت‌سازی یا رقتی که نتیجهٔ OD پایین‌تر از ۱/۵ به دست آید ادامه می‌یابد و رقت نهایی به‌عنوان نتیجه اعلام می‌گردد که ایمن شدن موش‌ها در رقت ۱/۱۰۰۰۰ به دست آمد.

جدول ۲- معرفی انتروتوکسین‌ها.

معادل فارسی	نام انگلیسی
انتروتوکسین استافیلوکوکی A	Staphylococcal enterotoxin A; (SEA)
انتروتوکسین استافیلوکوکی B	Staphylococcal enterotoxin B; (SEB)
انتروتوکسین استافیلوکوکی C1	Staphylococcal enterotoxin C1; (SEC1)
انتروتوکسین استافیلوکوکی D	Staphylococcal enterotoxin D; (SED)
انتروتوکسین استافیلوکوکی E	Staphylococcal enterotoxin E; (SEE)
انتروتوکسین استافیلوکوکی G	Staphylococcal enterotoxin G; (SEG)
انتروتوکسین استافیلوکوکی I	Staphylococcal enterotoxin I; (SEI)
انتروتوکسین استافیلوکوکی J	Staphylococcal enterotoxin J; (SEJ)
انتروتوکسین استافیلوکوکی M	Staphylococcal enterotoxin M; (SEM)
انتروتوکسین استافیلوکوکی N	Staphylococcal enterotoxin N; (SEN)
انتروتوکسین استافیلوکوکی O	Staphylococcal enterotoxin O; (SEO)

ادامه دارد

اگرچه انتروتوکسین‌ها از نظر آنتی‌ژنسیته با یکدیگر متفاوت هستند، اما آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال ایجاد شده علیه هر یک از انتروتوکسین‌ها، دارای واکنش متقاطع با دیگر انتروکسین‌ها هستند که در انتروتوکسین‌های SEB-SEC بیشتر وجود دارد (۳۸). به دلیل وجود شباهت‌هایی، در بین توالی اسیدهای آمینه انتروتوکسین‌ها خصوصاً TSST-1, SEA, C1 B-3 آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال به دست آمده از موش‌های ایمن شده با هر یک از آن‌ها، می‌تواند واکنش متقاطع به مقدار زیاد تا کم را از خود نشان دهد. مقدار این آنتی‌بادی‌ها در موش به مقداری وجود دارد که حیوان ایمن شده را هنگام challenge در برابر هر یک از انتروتوکسین‌های فوق محافظت می‌کند (۳۹).

Jing و همکارانش در یک مطالعهٔ مروری در سال ۲۰۱۵ نقش‌های SEB را در بیماری‌های خودایمنی مورد بررسی قرار دادند. بر اساس آن مطالعهٔ SEB رفتاری دوگانه بر روی سیستم ایمنی در بیماری‌های خود ایمنی عمل نشان می‌دهد. هنگامی که برای اولین بار در معرض SEB قرار گرفتند، پاسخ ایمنی سلول‌های Th^{27} در طی مراحل اولیهٔ بیماری خود ایمنی فعال می‌شود، در حالی که سلول‌های $Treg^{28}$ فعالیت سرکوب‌کنندهٔ سیستم ایمنی خود را از دست می‌دهند کاهش عملکرد لنفوسیت‌های تنظیمی در راستای افزایش عملکردهای سلول‌های T می‌باشد.

Mousavi و همکارانش در سال ۲۰۱۹ در فراوانی ژن‌های کدینگ سوپر آنتی‌ژن جدا شده از استافیلوکوکوس اورئوس که از بیماران مبتلا به MS و ناقلین بینی جمع‌آوری شده است. در این مطالعه، استعمار بینی با استافیلوکوکوس اورئوس در بیماران MS بیش از ناقلین بینی سالم بود (۴۰). سوپر آنتی‌ژن‌ها بیش از ۲۰ درصد سلول‌ها را در یک جمعیت مشخص شدهٔ سلول T فعال می‌کنند و می‌توانند نقش مهمی در تشدید یا ضعف

جدول ۳- میزان شباهت توالی اسیدهای آمینه در بین انتروتوکسین‌ها.

توکسین	SEA	SEB	SEC1	SED	SEE	SEG	SEH	SEI	SEJ	SEM	SEN	SEO
SEA	۱۰۰	۳۳	۳۰	۵۰	۸۳	۲۷	۳۷	۳۹	۶۴	۳۵	۳۹	۳۷
SEB		۱۰۰	۶۸	۳۵	۳۲	۴۳	۳۳	۳۱	۳۳	۲۹	۳۲	۳۶
SEC1			۱۰۰	۳۱	۲۹	۴۱	۲۷	۲۶	۳۰	۲۶	۲۹	۳۳
SED				۱۰۰	۵۲	۲۷	۳۵	۳۳	۵۱	۴۱	۳۸	۳۹
SEE					۱۰۰	۲۷	۳۵	۳۵	۶۳	۳۷	۳۹	۳۷
SEG						۱۰۰	۳۴	۲۸	۲۹	۲۸	۳۱	۳۰
SEH							۱۰۰	۳۳	۳۵	۳۸	۳۴	۳۱
SEI								۱۰۰	۳۴	۳۱	۳۱	۵۷
SEJ									۱۰۰	۳۸	۴۲	۳۳
SEM										۱۰۰	۲۸	۳۱
SEN											۱۰۰	۴۲
SEO												۱۰۰

ادامه دارد

[27] T helper cell
[28] Regulatory T cells

بیماری MS داشته باشند (۴۲، ۴۱). هفت تا از ژن‌های سوپر آنتی‌ژن (sea, seb, sec, sed, tst, eta, etb) جدا شده در استافیلوکوکوس اورئوس شناسایی شدند. فراوانی ژن‌های sea, seb, sec, sed, eta, etb در بیماران MS بالاتر از حامل‌های سالم بینی بودند.

همچنین در مطالعهٔ Hu در سال ۲۰۰۷ سطح واسطه‌های التهابی مانند پروستاگلاندین‌ها و لوکوترین‌ها به طور فزاینده‌ای در سیستم گردش خون پریمات‌ها پس از تزریق خوراکی SEB گزارش کردند (۴۳). همچنین Mast cell ها ممکن است در مسمومیت غذایی ناشی از SEB نقش داشته باشند که ممکن است نه تنها واسطه‌های التهابی را درگیر کنند بلکه باعث تحریک توسط نوروپپتیدها از نورون‌های حسی نیز شوند. در مطالعهٔ Wang در سال ۲۰۰۴ اثر SEB در موش (تزریق داخل صفاقی) سبب کاهش تولید فیبرهای عصبی حسی پپتیدرژیک و TNF می‌شود. از طرفی تزریق داخل صفاقی SEB به موش سبب القاء بیان FOS (که یک فعال کنندهٔ سلول است) در مغز از طریق تحریک عصب واگ می‌شود که نشان‌دهندهٔ این است که SEB دارای اثرات عمیقی بر مغز است (۴۴). به نظر می‌رسد شناسایی مکانیسم‌ها، ساختارها و مسیرهای مغزی حساس به SEB بتواند مبنایی برای درک اثرات فیزیولوژیکی و رفتاری منتسب به سوپر آنتی‌ژن‌ها فراهم نماید.

توکسوئید تهیه شده خاصیت کشندگی خود را به طور کامل از دست داده است و بنابراین می‌توان از آن برای ایمن‌سازی و تهیهٔ واکسن استفاده نمود. در نتیجه از آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال تولید شده می‌توان برای بررسی پاسخ‌های ایمونولوژیکی آنتی‌ژن‌های مختلف انتروتوکسین B استافیلوکوکوس اورئوس در تست‌های مختلف استفاده کرد.

منابع

1. Balaban N, Rasooly A. Staphylococcal enterotoxins. Int J Food Microbiol. 2000; 61: 1-10.

2. Tomi NS, Kranke B, Aberer E. Staphylococcal toxins in patients with psoriasis, atopic dermatitis, and erythroderma, and in healthy control subjects. J Am Acad Dermatol. 2005; 53: 67-72.

3. Atanassova V, Meindl A, Ring C. Prevalence of staphylococcus aureus and staphylococcal enterotoxins in raw pork and uncooked smoked ham-a comparison of classical culturing detection and rflp-pcr. Food Microbiol. 2001; 68: 1-2.

4. Abbasi S, Taei S, Zamanzad B. The prevalence of methicillin-resistant staph. Aureus Strains Producing Enterotoxin A and B. Tehran University Medical. 2015; 11: 73.

5. Al-Daccak R, Mehindate K, Damdoumi F, Etongué-Mayer P. Staphylococcal enterotoxin D is a promiscuous superantigen offering multiple modes of interactions with the mhc class ii receptors. J Immunol. 1998; 160(1): 225-32.

6. Akineden O, Hassan Aa, Schneider E, Usleber E. Enterotoxigenic properties of staphylococcus aureus isolated from goats' milk cheese. Food Microbiol. 2008; 124(2): 211-6.

7. Balaban N. Rasooly A. Staphylococcal Enterotoxins. Int J Food Microbiol. 2000; 61(1): 1-10.

8. Verreault D, Ennis J, Whaley K, Z Killeen S, Karauzum H, Aman MJ, et al. Effective treatment of staphylococcal enterotoxin B (Seb) aerosol intoxication in rhesus macaques using two parentally-administered high affinity monoclonal antibodies. Antimicrob Agents Chemother. 2019; 63(5): e02049-18. doi: 10.1128/AAC.02049-18.

9. Stiles BG, Bavari S, Krakauer T, Ulrich RG. Toxicity of staphylococcal enterotoxins potentiated by lipopolysaccharide: major histocompatibility complex class ii molecule dependency and cytokine release. Infect Immun. 1993; 61(12): 5333-8.

10. Drake CG, Kotzin BL. Superantigens: biology, immunology, and potential role in disease. Journal of Clinical Immunology. 1992; 12(3): 149-62.

11. Stephen JD, Bellsteven M, Vroegopstephen EB. Early activation and cell trafficking induced by staphylococcal enterotoxin b: effects of high- versus low-dose challenge on induction of anergy. Cellular Immunology. 1994; 154(2): 440-52.

12. Saeed AI, RIEDER SA, Price Rl, Barker J, Nagarkatti P, Nagarkatti M. acute lung injury induced by staphylococcal enterotoxin b: disruption of terminal vessels as a mechanism of induction of vascular leak. Microscopy and Microanalysis. 2012; 18(3): 445-52.

13. Kitano K, Fukuda Y, Nagahira K, Nasu T, Noguchi C, Izumi R, et al. Production of polyclonal antibody specific for human natriuretic peptide receptor B. J Immunol Methods. 1996; 194(2): 147-53.

14. Maneian M, Zarkesh Esfahani SH, Akbari M, Khanahmad H, Masjedi M. Production of polyclonal antibody against recombinant growth hormone and designing an elisa kit and comparing some of its diagnostics indices with a commercial kit. Journal of

Isfahan Medical School. 2013; 31(247): 1173-84.

15. Majidi J, Abdolalizadeh J, Amirkhiz MB, Majidi S. Production and purification of polyclonal antibody against bovine immunoglobulins in rabbits. African Journal of Biotechnology. 2007; 6(12).

16. Diestre C, Martinez-Lorenzo Mj, Bosque A, Naval J, Larrad L, Anel A. Generation of rabbit antibodies against death ligands by cdna immunization. Journal of Immunological Methods. 2006; 317(1-2): 12-20.

17. Stiles BG, Garza AR, Ulrich RG, Boles JW. Mucosal Vaccination with Recombinantly Attenuated Staphylococcal Enterotoxin B and Protection in a Murine Model. Infection and Immunity. 2001; 69(4): doi: 10.1128/IAI.69.4.2031-2036.2001.

18. Mulvey MR, Doupe M, Prout M, Leong C, Hizon R, Grossberndt A, et al. Staphylococcus aureus harbouring Enterotoxin A as a possible risk factor for multiple sclerosis exacerbations. Mult. Scler J. 2011; 17(4): 397-403.

19. Jing Li, Jie Yang, Yu-wei Lu, Song Wu, Ming-rui Wang, Ji-min Zhu. Possible role of staphylococcal enterotoxin B in the pathogenesis of autoimmune diseases. Viral Immunology. 2015; 28(7): doi. org/10.1089/vim.2015.0017.

20. Libbey JE, Cusick MF, Fujinami RS. Role of pathogens in multiple sclerosis. International Reviews of Immunology. 2013; 33(4): 1-18.

21. Torres BA, Kominsky S, Perrin GQ. Superantigens: the good, the bad, and the ugly. Exp Biol Med. 2001; 226: 164-76.

22. Schiffenbauer J, Johnson HM, Butfiloski EJ. Staphylococcal enterotoxins can reactivate experimental allergic encephalomyelitis. Proc Natl Acad Sci USA. 1993; 90: 8543-6.

23. Brocke S, Gaur A, Piercy C, Gautam A, Gijbels K, Fathman G, et al. Induction of relapsing paralysis in experimental autoimmune encephalomyelitis by bacterial superantigen. Nature. 1993; 365: 642-4.

24. Kumar P, Kretzschmar B, Herold S, Nau R, Kreutzfeldt M, Schütze S, et al. Beneficial effect of chronic Staphylococcus aureus infection in a model of multiple sclerosis is mediated through the secretion of extracellular adherence protein. Journal of Neuroinflammation. 2015; 12-22.

25. Mulvey MR, Doupe M, Prout M, Leong C, Hizon R, Grossberndt A, et al. Staphylococcus aureus arbouring Enterotoxin A as a possible risk factor for multiple sclerosis exacerbations. Mult. Scler. 2011; 4: 397-403.

26. Singh BR, Evenson ML, Bergdoll MS. Structural analysis of staphylococcal enterotoxins B and C1 using circular dichroism and fluorescence spectroscopy. Biochemistry 1988; 27(24): 8735-41.

27. Doenlen R, Krügel U, Wirth T, Riether C, Engler A, Prager G, et al. Electrical activity in rat cortico-limbic structures after single or repeated administration of lipopolysaccharide or staphylococcal enterotoxin B. Proc Biol Sci. 2011; 278(1713): 1864-72.

28. Serrats J, Sawchenko PE. CNS activational responses to staphylococcal enterotoxin B: T-lymphocyte-dependent immune challenge effects on stress-related circuitry. J Comp Neurol. 2006; 495(2): 236-54.

29. Oshvandi K, Jokar M, Khatiban M, Keyani J, Yousefzadeh MR, Sultanian AR. the effect of self-care education based on teach back method on promotion of self care behaviors in type ii diabetic patients: a clinical trial study. Diabetes and Metabolism. 2014; 13(2).

30. Tommaso A di, de Magistris MT, Bugnoli M, Marsili I, Rappuoli R, Abrignani S. formaldehyde treatment of proteins can constrain presentation to t cells by limiting antigen processing. Infect Immun. 1994; 62(5): 1830-4.

31. Coffman D, Zhu J, Roach J, Bavari S, Ulrich R, Giardina S. Production and Purification of A Recombinant Staphylococcal Enterotoxin B Vaccine Candidate Expressed in Escherichia Coli. Protein Expr Purif. 2002; 24(2): 302-12.

32. Hu DL., Zhu G., Mori F., Omoe K., Okada M., Wakabayashi K, et al. Staphylococcal enterotoxin induces emesis through increasing serotonin release in intestine and it is downregulated by cannabinoid receptor 1. Cell Microbiol. 2007; 9: 2267-77.

33. Silverman SJ, Espeseth DA, Schantz EJ. Effect of Formaldehyde on The Immunochemical and Biological Activity of Staphylococcal Endotoxin B. J Bacteriol. 1969; 98(2): 437-42.

34. Alizadeh H, Madani R, Babaie M, Kavid N, Golchinfar F, Emami T. Preparation and purification of polyclonal antibodies against mycobacterium avium paratuberculosis antigens in rabbit. J Fasa Univ Med Sci. 2012; 2(3): 168-73.

35. Barazesh A, Majidi J, Fallah E, Jamali R, Khazanchi A, Abdolalizadeh J. Prodution of polyclonal antibody against giardia lamblia in rabbit. Ilam University of Medical Sciences. 2007; 14(4).

36. Arefpour Torabi MA, Olad GR, Nazarian G, Salimian J, Khodi S, Bagheripour MJ. Production and purification of polyclonal antibodies against diphtheria toxin. Applied Biotechnology Reports. 2014; 2(1): 67-72.

37. Eivazi S, Majidi J, Aghebati Maleki L, Abdolalizadeh J, Yousefi M, Ahmadi M, et al. Production and purification of a polyclonal antibody against purified mouse igg2b in rabbits towards designing mouse monoclonal isotyping kits. Adv Pharm Bull. 2015; 5(1).

38. Niedergang F, Hémar A, Hewitt CR, Owen MJ, Dautry-Varsat A, Alcover A. The staphylococcus aureus enterotoxin B superantigen induces specific T cell receptor down-regulation by increasing its internalization. J Biol Chem. 1995; 270: 12839-45.

39. Irina V, Pinchuk Ellen J. Beswick and victor e. reyes. Staphylococcal Enterotoxins. Toxins. 2010; 2(8): 2177-97.

40. Sadeghi J, Alizadeh N, Ahangar Oskouei M, Laghusi D, Savadi Oskouei D, Nikanfar M, et al. Frequency of superantigen encoding genes of Staphylococcus aureus isolates collected from multiple sclerosis (MS) patients and nasal carriers. Microb Pathog. 2019; 127: 316-9.

41. Torres BA, Kominsky S, Perrin GQ, Hobeika AC, Johnson HM. Superantigens: the good, the bad, and the ugly. Exp Biol Med. 2001; 226(3): 164-76.

42. Wang X, Wang BR, Zhang XJ, Duan XL, Guo X, Ju G. Fos expression in the rat brain after intraperitoneal injection of Staphylococcus enterotoxin B and the effect of vagotomy. Neurochem. Res. 2004; 29: 1667-74.

43. Popoff MR, Poulain B. Bacterial toxins and the nervous system: neurotoxins and multipotential toxins interacting with neuronal cells. Toxins (Basel). 2010; 2(4): 683-737.