

"مقاله علمی - پژوهشی"

ارزیابی میزان تولید آنتی‌بادی پلی‌کلونال علیه باکتری لیستریا مونوسیتوژنز در مدل حیوانی

یاسین باقری^۱، منصور خاکپور^{۲*}، حمید ذیحق^۳، علیرضا براتی^۱

۱- باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران.

۲- استادیار گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران.

۳- دانش‌آموخته دکترای حرفه‌ای دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران.

*نویسنده مسئول مکاتبات: khakpour@iaut.ac.ir

(دریافت مقاله: ۹۷/۸/۱۷ پذیرش نهایی: ۹۸/۹/۴)

چکیده

لیستریا مونوسیتوژنز باسیلی کوتاه، گرم مثبت، انگل اختیاری داخل سلولی و فاقد اسپور است که از طریق سبزیجات آلوده، شیر، پنیر و گوشت آلوده به انسان منتقل می‌شود. ایمونوگلوبولین Y (IgY) به‌دست آمده از زرده تخم‌مرغ مرغ‌های ایمن‌شده منبع سرشار و ارزانی از آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال می‌باشد. این آنتی‌بادی‌ها می‌توانند به‌عنوان یک جایگزین مناسب به جای آنتی‌بادی‌های تولیدشده در سایر حیوانات آزمایشگاهی مطرح باشند. در سال‌های اخیر، IgY در تحقیقات علوم پزشکی جهت تشخیص، پیشگیری و درمان بیماری‌ها کاربرد گسترده‌ای داشته‌است. در مطالعه حاضر تعداد ۱۲ قطعه مرغ تخم‌گذار سویه‌های -لاین در دو گروه تیمار (۱۰ قطعه) و شاهد (۲ قطعه) انتخاب و گروه تیمار در ۳ نوبت و با فاصله زمانی هفته‌ای یک‌بار توسط تزریق آنتی‌ژن تهیه‌شده از لیستریا مونوسیتوژنز ایمن گردید. سپس با جمع‌آوری تخم‌مرغ‌ها و اندازه‌گیری میزان پروتئین تام و گلوبولین‌های زرده در هفته‌های ۹، ۱۰ و ۱۱ بعد از تزریق اول، مشخص شد که مقدار این دو پارامتر در هفته‌های ۹ و ۱۰ با یکدیگر تفاوت آماری معنی‌داری نداشته ولی در مقایسه با مقادیر آن‌ها در گروه شاهد، افزایشی معنی‌داری ($p < 0/05$) مشاهده گردید. از طرفی مقدار گلوبولین و پروتئین تام زرده در هفته یازدهم افت قابل توجهی داشت ولی مقادیر آن‌ها در مقایسه با گروه شاهد، تفاوت آماری معنی‌داری نشان نداد. بر اساس یافته‌های مطالعه حاضر می‌توان نتیجه‌گیری کرد که ایمن‌سازی مرغ‌ها توسط آنتی‌ژن تهیه‌شده از لیستریا مونوسیتوژنز موجب افزایش میزان گلوبولین زرده در هفته‌های نهم و دهم پس از تزریق شده‌است و بنابراین می‌توان از زرده تخم‌مرغ، به‌عنوان منبعی برای تولید آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال علیه باکتری لیستریا مونوسیتوژنز استفاده نمود.

کلیدواژه‌ها: آنتی‌بادی پلی‌کلونال، لیستریا مونوسیتوژنز، مدل حیوانی.

مقدمه

Sugita *et al.*, 1996) و سودومناس آئروژنیوزا (Sugita *et al.*, 1996) با موفقیت به کار گرفته شده است. از طرف دیگر از آنجائی که IgY مقاومت بالایی نسبت به حرارت دارد، لذا فعالیت ایمنولوژیک آن در اثر پاستوریزاسیون کاهش پیدا نمی‌کند. همچنین مشخص شده که آنتی‌بادی‌های طیور در مقایسه با آنتی‌بادی‌های پستانداران به آبی‌توپ‌های بیشتری متصل می‌شوند که این موضوع موجب افزایش حساسیت آن‌ها می‌گردد (Hatta *et al.*, 1990). از این رو آنتی‌بادی‌های زرده تخم‌مرغ با موفقیت در مقاصد پزشکی، درمانی و تشخیصی به کار گرفته شده است (Bizanov *et al.*, 2006). همچنین ویژگی ضدباکتریایی ایمونوگلوبولین Y موجب ترغیب محققین جهت انجام مطالعات مختلف روی آن شده است، به طوری که نشان داده‌اند IgY دارای عملکرد ایمنی‌زایی در عفونت‌های ویروسی و باکتریایی می‌باشد (Larsson, 1993; Ebina, 1996). هاتا و همکاران در سال ۱۹۹۷ از IgY تولیدشده علیه/استرپتوکوکوس موتانس برای جلوگیری از تشکیل پلاک دندانی استفاده کردند که نتایج حاکی از کاهش تعداد باکتری مذکور بود (Hatta *et al.*, 1990).

لیستریامونوسایتوژنز باسیل کوتاه، گرم مثبت، انگل اختیاری داخل سلولی و فاقد اسپور است که از طریق سبزیجات آلوده، شیر، پنیر و گوشت آلوده به انسان منتقل می‌شود. مطالعات اپیدمیولوژیک نشان داده است که باکتری مذکور یکی از عوامل ایجادکننده مننگوآنسفالیت، اسپلنومگالی و هپاتومگالی به‌ویژه در دوران بارداری است که منجر به سقط یا مرگ جنین و یا تولد زودرس و تخریب بافتی در ارگان‌ها پس از تولد می‌شود (Bizanov *et al.*, 2006).

تخم‌مرغ به عنوان ماده مغذی شناسایی شده است که شامل مقدار زیادی آنتی‌بادی‌ها از جمله ایمونوگلوبولین Y در زرده تخم‌مرغ می‌باشد. امروزه تکنولوژی نوین استفاده از آنتی‌بادی‌های زرده تخم‌مرغ به منظور کاربردهای تشخیص و درمانی در حال توسعه می‌باشد. آنتی‌بادی زرده تخم‌مرغ (IgY) ایمونوگلوبولین غالب زرده تخم‌مرغ می‌باشد و هم‌تای IgG در پستانداران می‌باشد که امروزه کاربردهای گسترده‌ای پیدا کرده است. ایمونوگلوبولین Y زرده تخم‌مرغ باعث ایجاد ایمنی غیرفعال در جنین می‌شود (Sun *et al.*, 2001; Nassiri *et al.*, 2016). مشخص شده است که ایمونوگلوبولین‌های موجود در سرم مرغ‌ها می‌تواند به زرده تخم‌مرغ برای ایجاد ایمنی در جوجه‌ها منتقل شود (Sun *et al.*, 2001). همچنین مشخص شده است که ایمونوگلوبولین Y توسط مرغ‌های ایمن شده در مقابل آنتی‌ژنی خاص، در تخم‌مرغ تولید می‌شود (Pour Amir, 2000; Malekan *et al.*, 2010). هرچند آنزیم‌های دستگاه گوارش از جمله پروتئازها، پپسین، تریپسین و کموتریپسین ممکن است تا حدودی موجب تجزیه آنتی‌بادی‌های موجود در زرده تخم‌مرغ‌هایی شوند که به شیوه خوراکی مصرف شده‌اند (Reilly *et al.*, 1997)، با این حال بخشی از این آنتی‌بادی‌ها دست‌نخورده باقی مانده و توانایی اتصال به آنتی‌ژن را دارا می‌باشند (Akita *et al.*, 1998). لذا تجویز خوراکی IgY زرده تخم‌مرغ توسط بسیاری از محققین علیه عوامل بیماری‌زای مختلف مثل/شیریشیاکولای انتروتوکسیکوژنیک (Marquardt *et al.*, 1999)، روتاویروس‌های انسانی (Sarker *et al.*, 1996; Ebina

گروه تیمار (۱۰ قطعه) و شاهد (۲ قطعه) تقسیم و در محیطی شبیه‌سازی شده نسبت به مرغداری اصلی و در قفس در دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز در سال ۱۳۹۶ به مدت چهار ماه نگهداری شدند. تمامی مرغ‌ها در شرایط محیطی و تغذیه‌ای یکسان بودند. مرغ‌های تیمار در ۳ نوبت و با فاصله زمانی هفته‌ای یک‌بار مورد تزریق آنتی‌ژن قرار گرفتند که آنتی‌ژن تهیه شده در سری اول با ادجوانت کامل فروند (F5881، شرکت سیگما آلدریچ، آمریکا) و دو سری بعد با ادجوانت ناقص فروند (F5506، شرکت سیگما آلدریچ، آمریکا) تهیه گردید. تخم مرغ‌ها در هفته‌های ۹، ۱۰ و ۱۱، بعد از تزریق اول، به صورت جداگانه جمع‌آوری شدند. لازم به ذکر است که هر هفته به صورت تصادفی از مجموع تخم مرغ‌های همان هفته ۱۲ عدد انتخاب شده و مورد آزمایش قرار می‌گرفت.

نحوه آماده‌سازی آنتی‌ژن باکتریایی برای ایمن‌سازی مرغ‌ها: ابتدا سویه استاندارد باکتری لیستریا مونوسایتوزنز (ATCC: 13932) تهیه شده از انستیتو پاستور (تهران، ایران) با استفاده از محیط کشت BHI (مرک، آلمان) به مدت ۴۸ ساعت و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرم‌خانه‌گذاری گردید. در ادامه پس از انتقال به لوله استریل، به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۳۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ (HETTICH، آلمان) شد. رسوب به دست آمده از سانتریفیوژ دو بار با سالین نرمال (فرآورده‌های تزریقی و دارویی، ایران) شستشو داده شد، سپس برای کشتن باکتری‌ها، لوله آزمایش به مدت یک ساعت در درون آب با دمای ۱۰۰ درجه سلسیوس قرار داده شد. سپس جهت جداسازی باکتری‌ها از محیط کشت، محتویات لوله آزمایش مذکور، مجدداً به مدت

تولید ایمونوگلوبین‌های متنوع در طی دوره بیماری به وسیله گروه‌های تحقیقی زیادی به اثبات رسیده است و پیشنهاد شده که آنتی‌بادی‌های ضد پاتوژن داخل سلولی حاضر در زمان عفونت، ممکن است نقش مهمی در حفاظت میزبان بر عهده داشته باشند. اخیراً مشخص شده است که آنتی‌بادی‌ها توانایی تغییر جنبه‌هایی از عفونت باکتریال به نفع میزبان را دارا می‌باشند. آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال مخلوطی از آنتی‌بادی‌های مونوکلونال می‌باشند که علیه اپی‌توپ‌های مختلف تولید می‌شوند و با تمایل بالا به مولکول آنتی‌ژن اتصال می‌یابند که احتمالاً به دلیل وجود انواع مختلف آنتی‌بادی علیه اپی‌توپ‌های آنتی‌ژن در آن‌ها می‌باشد (Hanly et al., 1995; Mundo et al., 2008). در واقع آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال ابزارهای مناسبی می‌باشند که توسط بسیاری از محققین در تحقیقات مورد استفاده قرار می‌گیرند و منجر به پیش‌برد بسیاری در علم پزشکی شده‌اند (Hanly et al., 1995).

با توجه به موارد ذکر شده، در مطالعه حاضر میزان تولید آنتی‌بادی پلی‌کلونال علیه باکتری لیستریا مونوسایتوزنز در مرغ‌های ایمن شده توسط این باکتری مورد ارزیابی قرار گرفت. در واقع این مطالعه با هدف تهیه مقدار بالای آنتی‌بادی پلی‌کلونال علیه این باکتری با استفاده از زرده تخم مرغ‌های تولیدی توسط مرغ‌های ایمن شده در مقابل لیستریا مونوسایتوزنز و یافتن بهترین زمان استخراج آنتی‌بادی از زرده تخم مرغ‌های مذکور، جهت دست‌یافتن به حداکثر مقدار آن انجام شد.

مواد و روش‌ها

تعداد ۱۲ قطعه مرغ تخم‌گذار نژاد های-لاین در سن ۱۱ ماهگی و با وزن تقریبی یکسان انتخاب و به دو

تزریق شد. به منظور افزایش تیتراژ آنتی‌بادی حاصله، مخلوط میکروبی مذکور در ۳ نوبت دیگر و با فاصله زمانی هر ۲ هفته یکبار به مرغ‌ها تزریق گردید. از هفته ۹ الی ۱۲ پس از اولین تزریق، هر هفته تعداد ۱۰ تخم‌مرغ از گروه تیمار و ۲ تخم‌مرغ از گروه شاهد به صورت تصادفی انتخاب و مورد آزمایش قرار گرفت (Lee et al., 2002; Alizadeh et al., 2012).

- نحوه استخراج و بررسی ایمنوگلوبولین‌های تولیدی در تخم‌مرغ مرغان ایمن‌شده: بدین منظور به ۱۰ میلی‌لیتر از زرده هر یک از تخم‌مرغ‌های مورد نظر که به طور کامل از سفیده جدا شده‌بود، مقدار ۱۰۰ میلی‌لیتر کلروفرم (Scharlau، اسپانیا) سرد (نگهداری‌شده در دمای ۲۰- درجه سلسیوس) اضافه شد. پس از تشکیل دو فاز، فاز زیرین دور ریخته شد و این مرحله دوباره تکرار گردید. سپس به فاز بالائی حاصله در مرحله تکرار، مقدار ۱۰۰ میلی‌لیتر ایزوپروپانول (Scharlau، اسپانیا) سرد (نگهداری‌شده در دمای ۲۰- درجه سلسیوس) اضافه شد. در این مرحله فاز رویی دور ریخته شد و رسوب حاصله جمع‌آوری گردیده و به‌میزان ۱۰۰ میلی‌لیتر استون (Scharlau، اسپانیا) سرد (نگهداری‌شده در دمای منفی ۲۰ درجه سلسیوس) به آن افزوده شد. سپس برای خشک شدن، رسوب در کاغذ صافی پخش گردید. در ادامه به رسوب خشک‌شده مقدار ۵۰ میلی‌لیتر محلول فسفات بافر (PBS) افزوده شد و به مدت یک ساعت در دمای محیط درحالی که مرتباً توسط شیکر و مگنت (Hei-Tec، آلمان) مخلوط می‌شد، قرار داده‌شد. در نهایت نمونه مذکور تحت سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شده و محلول رویی آن که حاوی IgY بود، جدا گردید (Saadati et al.,

۱۰ دقیقه با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. مایع رویی که حاوی محیط کشت بود دور ریخته شد و رسوب ته لوله آزمایش که حاوی باکتری‌های کشت داده‌شده بود، دو بار با سالین نرمال شستشو داده شد، تا محیط کشت به طور کامل حذف شده و فقط باکتری‌های کشته شده برای استخراج آنتی‌ژن باقی بماند. در ادامه با استفاده از رسوب مذکور سوسپانسیون باکتریایی تهیه گردید که از لحاظ کدورت با لوله شماره ۱ استاندارد مک فارلند مطابقت داشت. سپس آنزیم تریپسین (T4۷۹۹، شرکت سیگما آلدریچ، آمریکا) به صورت مخلوط به همراه بافر فسفات به مقدار ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و به نسبت ۱ به ۹ به سوسپانسیون باکتریایی اضافه گردیده و به مدت ۳۰ دقیقه در بن ماری ۳۷ درجه سلسیوس گرم‌خانه‌گذاری گردید. سپس محتویات لوله به مدت ۱۰ دقیقه به خوبی مخلوط گردید (Lee et al., 2002). در ادامه سوسپانسیون باکتریایی حاوی آنزیم مذکور، سه بار با سالین نرمال شستشو داده شد و سپس به نسبت ۱ به ۵۰ رقیق گردید و در نهایت ۰/۲۵ درصد به آن فرمالین (مرک، آلمان) اضافه شد. همچنین به منظور آماده‌سازی جهت انجام تزریق، مقدار ۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتریایی حاصله با ۱ میلی‌لیتر از ادجوانت فروند مخلوط گردید. لازم به ذکر است که جهت کاهش عوارض جانبی استفاده از ادجوانت فروند، در تزریقات سری اول از ادجوانت کامل فروند و در دو سری بعدی از ادجوانت ناقص فروند استفاده شد (Hatta et al., 1997). در نهایت دو میلی‌لیتر از مخلوط حاصله در مجاورت یخ خشک به محل نگهداری مرغ‌ها حمل شده و به هر یک از مرغ‌ها به میزان ۰/۲۵ میلی‌لیتر از آن در عضله سینه

دسی‌لیتر و میانگین میزان آلبومین زرده تخم‌مرغ‌های مذکور، ۰/۴ گرم بر دسی‌لیتر بود. بیشترین میزان افزایش گلوبولین در گروه تیمار در هفته نهم بعد از اولین تزریق بود. با توجه به جدول ۱ و مقایسه میانگین‌ها، مشخص گردید که افزایش میزان پروتئین و گلوبولین‌ها بین هفته‌های ۹ و ۱۰ نسبت به گروه شاهد معنی‌دار بود ($p < 0/05$). همچنین با مقایسه میانگین‌های گروه شاهد و تیمار، کاهش میزان گلوبولین‌ها بین هفته‌های ۹ و ۱۱ نیز معنی‌دار بود ($p < 0/05$). مقایسه میانگین میزان پروتئین و گلوبولین‌ها بین هفته‌های ۱۰ و ۱۱ نشان داد که کاهش آن‌ها نیز معنی‌دار بود ($p < 0/05$). طبق جدول ۱ میانگین پروتئین تام و گلوبولین‌های زرده در هفته‌های مختلف با گروه شاهد که در طی این دوره تقریباً نتایج یکسان داشته است در هفته‌های ۹ و ۱۰ اختلاف معنی‌دار داشت ولی در هفته ۱۱ بین گروه شاهد و تیمار اختلاف غیرمعنی‌دار بود. بیشترین میزان افزایش گلوبولین در گروه تیمار مربوط به هفته نهم بعد از اولین تزریق بود. همچنین اثر این تزریق تا هفته دهم به‌طور معنی‌داری ادامه یافت ($p < 0/05$)، ولی در هفته یازدهم افت قابل توجهی نشان داد به‌طوری‌که میانگین میزان گلوبولین در گروه تیمار تفاوت معنی‌داری با میانگین گروه شاهد نداشت.

۲۰۰۵). سپس برای تعیین مقدار پروتئین محلول فوق از روش بایوره استفاده شد (Lumeij and Maclean, 1996). میزان آلبومین آن نیز با استفاده از کیت اختصاصی (زیست شیمی، ایران) با روش برموکروزول گرین اندازه‌گیری گردید که این روش شامل واکنش آلبومین با برموکروزول گرین در شرایط اسیدی و تشکیل کمپلکس سبز مایل به آبی است که شدت رنگ آن متناسب با غلظت آلبومین موجود در نمونه می‌باشد که با استفاده از ریدر دستگاه الایزا (BioTek، آمریکا) در طول موج ۶۳۰ نانومتر، مقدار آن اندازه‌گیری شد (Duly et al., 2003).
- تحلیل آماری داده‌ها: تمامی داده‌ها به‌شکل میانگین \pm انحراف معیار ارائه شده و با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۳ و به‌منظور مقایسه بین گروه شاهد و تیمار با یکدیگر و در هفته‌های متوالی به‌ترتیب از آزمون T مستقل (Unpaired Samples T-test) و آزمون T دو نمونه (Paired Samples T-test) استفاده شد. مقدار $p < 0/05$ برای تعیین سطح معنی‌دار بودن تفاوت بین گروه‌ها در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

مطابق جدول ۱ میانگین مقدار پروتئین تام تخم‌مرغ‌های مرغان هفته ۹ گروه شاهد، ۰/۴۵ گرم بر

جدول ۱- مقایسه مقادیر پروتئین تام، آلبومین و گلوبولین تخم‌مرغ‌های مورد آزمایش (میانگین \pm انحراف معیار)

گروه	هفته ۹			هفته ۱۰			هفته ۱۱		
	پروتئین تام (gr/dl)	آلبومین (gr/dl)	گلوبولین (gr/dl)	پروتئین تام (gr/dl)	آلبومین (gr/dl)	گلوبولین (gr/dl)	پروتئین تام (gr/dl)	آلبومین (gr/dl)	گلوبولین (gr/dl)
شاهد	۰/۴۵ \pm ۰/۰۸	۰/۴۵ \pm ۰/۰۶	۰/۰۵۱ \pm ۰/۰۳	۰/۴۵ \pm ۰/۰۹	۰/۴۵ \pm ۰/۰۵	۰/۰۴۷ \pm ۰/۰۴	۰/۴۵ \pm ۰/۰۵	۰/۴۵ \pm ۰/۰۶	۰/۰۴۵ \pm ۰/۰۲
تیمار	۰/۸۵ \pm ۰/۱۳ ^a	۰/۴۵ \pm ۰/۰۷	۰/۴۵ \pm ۰/۱۳ ^a	۰/۸۲ \pm ۰/۰۸ ^a	۰/۴۵ \pm ۰/۰۳	۰/۴۲ \pm ۰/۰۸ ^a	۰/۴۳ \pm ۰/۰۲ ^b	۰/۴۵ \pm ۰/۰۵	۰/۰۳۹ \pm ۰/۰۲ ^b

abc: حروف انگلیسی متفاوت در هر ردیف و پارامتر اختلاف معنی‌دار را نشان می‌دهد ($p < 0/05$).

^a: نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین گروه تیمار و شاهد در هر ستون می‌باشد ($p < 0/05$).

بحث و نتيجه گيري

مقايسه ميانگين گلوبولين هاي زرده تخم مرغ ها به صورت هفتگي در پژوهش حاضر، نشان داد كه اين افزايش تا هفته دهم ادامه داشته و سپس کاهش پيدا مي كند (جدول ۱). نتايج فوق نشان مي دهد، با ايمن سازي سه مرحله اي، بهترين زمان براي توليد حداكثر ميزان آنتي بادي در زرده تخم مرغ، هفته نهم بعد از اولين تزريق مي باشد. از طرف ديگر نتايج پژوهش حاضر مشخص كرد كه در هفته نهم به طور ميانگين در زرده تخم مرغ هاي گروه تيمار ميزان پروتئين تام gr/dl $0/45$ بود (جدول ۱) و ميزان گلوبولين هاي آن gr/dl $0/45$ بود (جدول ۱)، كه اين ميزان آنتي بادي از نظر اقتصادي در مقايسه با توليد آنتي بادي به روش هاي ديگر بسيار مقرون به صرفه مي باشد. در تائيد اين يافته گزارش شده كه توليد آنتي بادي با استفاده از ايمن سازي مرغ و جداسازي از زرده تخم مرغ، علاوه بر امكان سازي توليد آنتي بادي در حجم انبوه، هزينه توليد و نگه داري كمترى نيز دارد، زيرا مرغ تخم گذار مي تواند آنتي بادي معادل با ۹۰-۷۵ ميلي ليتر از سرم را طي يك هفته در زرده تخم مرغ توليد كند، در حالي كه پستانداران بزرگ جثه مي توانند آنتي بادي هاي بيشتري از مرغ توليد كنند كه در اين حالت نيز هزينه هاي نگه داري و توليد بسيار بالاتر مي باشد (Chalghoumi et al., 2009). همچنين نشان داده اند كه با روش هاي تخليص مختلف مي توان بيش از ۴۰ ميلي گرم آنتي بادي از هر زرده تخم مرغ خالص سازي كرد كه در اين صورت در عرض يك ماه ۱/۵-۱/۲ گرم آنتي بادي خالص جداسازي خواهد شد. در ضمن، اين آنتي بادي كمپلمان سرم پستانداران را فعال نمي سازد و با روماتوئيد فاكتر و FC رسپتور موجود در سرم

پستانداران واكنش نشان نمي دهد (Saadati et al., 2005). از مزايای استفاده از زرده تخم مرغ به عنوان منبع توليد آنتي بادي، کاهش موارد استفاده از حيوانات مي باشد. به دليل اينكه مرغ ها قادرند در مقايسه با حيوانات آزمايشگاهي مقادير بالاتري از آنتي بادي توليد كنند، مي توانند جايگزين مناسبى براي حيوانات آزمايشگاهي به شمار آيد (Nassiri et al., 2016).

بر اساس مطالعات انجام شده پيشين، وود وارد و همكاران گزارش کرده اند كه پس از تزريق سوم باكتري كشته شده *سالمونلا تيفي موريوم* در مرغ، مقدار قابل توجهي IgY توليد مي شود (Woodward et al., 2002). سعادتى و همكاران نيز در سال ۱۳۸۷ در مطالعه خود نشان دادند كه با استفاده از تزريق باكتري كشته شده بوتولينوم نروتوكسين در مرغ، سيستم ايمنى تحريك شده و ميزان قابل قبولي آنتي بادي IgY توليد مي گردد كه على رغم اين كه اين امر با اولين دوز تزريقي آغاز مي شود ولي حداكثر ميزان آنتي بادي پس از تزريق يادآور چهارم توليد شده و تا هفته دوازدهم ادامه مي يابد كه نتايج پژوهش مذکور با يافته هاي مطالعه ما كه نشان داد در هفته نهم بيشترين ميزان توليد آنتي بادي حاصل شده، همخواني ندارد كه بنظر مي رسد اين تفاوت به دليل اختلاف در روش تزريق و وزن مولكولي آنتي ژن باشد (Saadati et al., 2005).

مطالعات نشان داده اند كه ايمني زايي غير فعال توسط تجويز خوراكي آنتي بادي هاي اختصاصي از منابع مختلف به عنوان مثال كلستروم مصون شده يا ايمونوگلوبين زرده تخم مرغ (IgY) مي تواند استراتژي هاي اقتصادي و مفيد براي مهار عفونت هاي گوارشي در انسان و حيوانات باشد (Mine and

تخصصی برای استفاده در روش‌های ایمنولوژیکی مهمی نظیر الایزا، آگلوتیناسیون و ایمنوفلورسنت و یا مقاصد درمانی استفاده کرد. از طرف دیگر از آنجایی که تخم مرغ از منابع غذایی روزانه انسان‌ها می‌باشد لذا به نظر می‌رسد که از این طریق می‌توان در جهت بهبود ایمنی در جوامع انسانی هم گام‌های مثبت برداشت.

سیاسگزاری

بدین وسیله از حمایت مالی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز در انجام این مطالعه، کمال تشکر و قدردانی را داریم.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تضاد منافی ندارند.

(Kovacs-Nolan, 2002). چا و همکاران در سال ۲۰۰۶ اثرات آنتی‌بادی زرده تخم‌مرغ تولیدشده در پاسخ به بخش‌های مختلف آنتی‌ژنیک E.coli O157:H7 را مورد بررسی قرار دادند و نتایج ایشان نشان داد که سطح پاسخ ایمنی در برابر آنتی‌ژن کل سلول باکتری *E. coli* O157:H7 بعد از شروع تزریق به مقدار بیشتری افزایش یافت. بدین ترتیب ایشان گزارش کردند که IgY اختصاصی ضد *E. coli* O157:H7 می‌تواند از ضررهای اختصاصی مربوط به سلامتی در انسان و حیوان پیشگیری کند (Chae et al., 2006).

بر اساس یافته‌های پژوهش حاضر چنین نتیجه‌گیری می‌شود که می‌توان از زرده تخم‌مرغ، به‌عنوان منبعی برای تولید آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال علیه باکتری لیستریا مونوسایتوزنز استفاده کرد و همچنین تولید آنتی‌بادی پلی‌کلونال علیه باکتری مذکور یک روش مناسب و مقرون به صرفه می‌باشد. لذا می‌توان از آنتی‌بادی‌های تولیدشده برای طراحی و ساخت کیت‌های سرولوژیک

منابع

- Akita, E.M., Li-Chan, E.C.Y. and Nakai, S. (1998). Neutralization of enterotoxigenic Escherichia coli heat-labile toxin by chicken egg yolk immunoglobulin Y and its antigen-binding fragments. *Food Agricultural Immunology*, 10(2): 161-172.
- Alizadeh, H., Madani, R., Babaie, M., Kavid, N., Golchinfar, F. and Emami, T. (2012). Preparation and purification of polyclonal antibodies against Mycobacterium avium paratuberculosis antigens in rabbit. *Journal of Fasa University of Medical Sciences*, 2(3): 168-173. [In Persian]
- Bizanov, G., Normantiene, T. and Jonauskiene, I. (2006). Development of antibodies to Sendai virus in chickens and their isolation from yolk. *Biologija*, 1(2): 68-71.
- Beal, R.K., Wigley, P., Powers, C., Hulme, S.D., Barrow, P.A. and Smit A.L. (2004). Age at primary infection with salmonella enterica serovar Typhimurium in the chicken in Fluences persistence of infection and subsequent immunity to re-challenge. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 100(3-4): 151-64.
- Chae, H.S., Singh, N.K., Ahn, C.N., Yoo, Y.M., Jeong, S.G., Ham, J.S., et al. (2006). Effects of egg yolk antibodies produced in response to different antigenic fractions of E. coli O157:H7 on E. coli suppression. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 19(11): 1665-1670.

- Chalghoumi, R., Beckers, Y., Portetelle, D. and Théwis, A. (2009). Hen egg yolk antibodies (IgY), production and use for passive immunization against bacterial enteric infections in chicken: a review. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment*, 13(3): 295-308.
- Chang, H.M., Lee, Y.C., Chen, C.C. and Tu, Y.Y. (2002). Microencapsulation protects immunoglobulin in Yolk (IgY) Specific against *Helicobacter pylori* urease. *Journal of Food Science*, 67(1): 15-20.
- Duly, E.B., Grimason, S., Grimason, P., Barnes, G. and Trinick, T.R. (2003). Measurement of serum albumin by capillary zone electrophoresis, bromocresol green, bromocresol purple, and immunoassay methods. *Journal of Clinical Pathology*, 56(10): 780-781.
- Ebina, T. (1996). Prophylaxis of rotavirus gastroenteritis using immunoglobulin. *Archives of Virology*, 12(1): 217-223.
- Hatta, H., Kim, M. and Yamamoto, T.A. (1990). A novel isolation method for hen egg yolk antibody (IgY). *Agriculture and Biological Chemistry*, 54(10): 2531-2535.
- Hanly, W.C., Artwohl, J.E. and Bennett, B.T. (1995). Review of polyclonal antibody production procedures in mammals and poultry. *Institute for Laboratory Animal Research Journal*, 37(3): 93-118.
- Hatta, H., Tsuda, K., Ozeki, M., Kim, M., Yamamoto, T., Otake, S., *et al.* (1997). Passive immunization against dental plaque formation in humans: effect of mouth rinse containing egg yolk antibodies (IgY) specific to streptococcus mutans. *Caries Research*, 31(4): 268-274.
- Larson, A. (1993). Chicken antibodies: Taking advantage of evolution. *A review poultry Sciences*, 72(10): 1807-1812.
- Lee, E.N., Sunwoo, H.H., Menninen, K. and Sim, J.S. (2002). In vitro studies of chicken egg yolk antibody (IgY) against *Salmonella enteritidis* and *Salmonella typhimurium*. *Poultry Science*, 81(5): 632-641.
- Leslie, G.A. and Clem, L.W. (1969). Phylogen of immunoglobulin structure and function. *Immunoglobulins of chicken*. *Journal of Experimental Medicine*, 130(6): 1337-1352.
- Lumeij, J.T. and Maclean, B. (1996). Total protein determination in pigeon plasma and serum: comparison of refractometric methods with the biuret method. *Journal of Avian Medicine and Surgery*, 10(3): 150-152.
- Mine, Y., and Kovacs-Nolan, J. (2002). Chicken egg yolk antibodies as therapeutics in enteric infectious disease: a review. *Journal of Medicinal Food*, 5(3): 159-169.
- Malekan, M., Moosakhani, F., Pourtaghi, H., Bahonar, A. and Malekan, M. (2010). Production of immunized eggs against *Salmonella enteritidis* and *Escherichia coli* K99. *Journal of Veterinary Clinical Pathology*, 4(1): 759-764. [In Persian]
- Marquardt, P.R., Jin, L.Z., Kim, J.W., Fang, L., Frohlich, A.A. and Baidoo, SK. (1999). Passive protective effect of egg-yolk antibodies against enterotoxigenic *Escherichia coli* K88⁺ infection in neonatal and early-weaned piglets. *FEMS Immunology Medical Microbiology*, 23(4): 283-288.
- Mundo, S.L., Fontanals, A.M., García, M., Durrieu, M., Álvarez, E., Gentilini, E.R., *et al.* (2008). Bovine IgG1 antibodies against *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* protein p34-cx improve association of bacteria and macrophages. *Veterinary Research*, 39(1): 1-12.
- Nassiri, M.R., Haghparast, A., Mohsenzadeh, M., Hassan, A.A., Nasiri, K., Roudbari, Z., *et al.* (2016). Production and purification immunoglobulin against E.Coli egg yolk. *Iranian Journal of Animal Science Research*, 8(1): 154-161.
- Pour Amir, M. (2001). Immunoglobulin Y (IgY) from egg yolk: From molecular structures to medical applications. *Journal of Babol University of Medical Sciences*, 3(3): 47-54. [In Persian]
- Reilly, R.M., Domingo, R. and Sandhu, J. (1997). Oral delivery of antibodies Future Pharmacokinetic. *Clinical Pharmacokinetics*, 32(4): 313-323.
- Rupnow, M.F., Owens, DK., Shachter, R. and Parsonnet, J. (1999). *Helicobacter pylori* vaccine development and use. A Cost-Effectiveness analysis using the Institute of medicine methodology. *Helicobacter*, 4(4): 272-280.

- Saadati, M.O., Soleimani, J., Ebrahimi, F., Bahmani, Kh. and Gandomi, A. (2005). Evaluation of Antibody Y (IgY) produced against Botulinum toxin type A in animal model. *Hakim Research Journal*, 7(3): 44-51. [In Persian]
- Saadati, M.O., Gorbani, N., Barati, B. and Nazarian, S. (2009). Production and evaluation of anti-Salmonella typhimurium immunoglobulin Y isolated from serum and eggs laid. *Yakhteh Medical Journal*, 10(4): 260-263. [In Persian]
- Sarker, S.A., Casswall, T.H., Juneja, L.R., Hoq, E., Hossain, I., *et al.* (2001). Randomized, placebo-controlled, clinical trial of hyperimmunized chicken egg yolk immunoglobulin in children with rotavirus diarrhea. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 32(1): 19-25.
- Sugita- Konishi, Y., Shibata, K., Yun, S.S., Hara Kudo, Y., Yamaguchi, K. and Kumagai, S. (1996). Immune functions of immunoglobulin Y isolated from egg yolk of hens immunized with various infectious bacteria. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 60(5): 886-888.
- Sun, S., Mo, W., Ji, Y., and Liu, S. (2001). Preparation and mass spectrometric study of egg yolk antibody (IgY) against Rabies virus. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 15(9): 708-712.
- Woodward, M.J., Gettinby, G., Breslin, M.F., Corkish, J.D. and Houghton, S. (2002). The efficacy of salenvac a Salmonella enterica subsp Enterica serotype Enteritidis iron-restricted bacterin vaccine, in laying chickens. *Avian Pathology*, 31(4): 383-392.