Archive of SID

Iranian Journal of Animal Science
Vol 49, No 1, Spring 2018 (63-71)
DOI: 10.22059/ijas.2018.254034.653624

علوم دامی ایران
دورهٔ ۴۹، شمارهٔ ۱، بهار ۱۳۹۷ (ص ۷۱-۶۳)

تولید و به‌کارگیری مؤثر آنتی‌بادی اختصاصی زردهٔ تخم‌مرغ (IgY) برای مهار باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس*

فریما علی‌اکبری[۱]، سید امیرحسین مهدوی[۲*] و حمیدرضا رحمانی[۳]
۱، ۲ و ۳. دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشیار و استاد گروه علوم دامی، دانشکدهٔ کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۲/۱۶ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۲/۲۴)

چکیده

این بررسی به‌منظور ارزیابی ویژگی‌های ایمنی (ایمونو)شیمیایی و نیز تأثیر مهارکنندگی پودر پادتن (آنتی‌بادی) اختصاصی و غیراختصاصی زردهٔ تخم‌مرغ بر رشد باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس*، به‌عنوان یکی از مهم‌ترین سروتیپ‌های *استافیلوکوکوس* بیماری‌زای انسانی و دامی در شرایط برون‌تنی انجام شد. این آزمایش با بهره‌گیری از شانزده قطعه مرغ تخم‌گذار لگهورن سفید سویهٔ های-لاین W-۳۶ که در سن ۴۰ هفتگی قرار داشتند صورت گرفت. برای ایمن کردن پرندگان، پس از بررسی منحنی رشد میکروب و کشت آن‌ها تا پایان مرحلهٔ رشد تصاعدی، واکسن کشته‌شده با بهره‌گیری از امواج فراصوت تهیه و تزریق شد. پس از گردآوری تخم‌مرغ‌ها در یک دورهٔ زمانی ۸ هفته، IgY با بهره‌گیری از روش پولسون جداسازی و یخ خشکانی[۱] شد و در ادامه ویژگی‌های ایمنی‌شیمیایی و ضد باکتریایی آن سنجش شد. نتایج بیانگر آن است که پس از نخستین ایمن‌سازی، فعالیت اختصاصی پادتن علیه باکتری مورد آزمون در پلاسمای مرغ‌های تخم‌گذار و تخم‌مرغ افزایش یافت و این افزایش در دورهٔ آزمایش در سطوح بالا حفظ شد ($P < ۰/۰۱$). غلظت IgY و نیز درصد خلوص آن در پودر پادتن اختصاصی ۷۱ درصد بالاتر ($P < ۰/۰۵$) از پودر آنتی‌بادی غیراختصاصی بود. بهره‌گیری از سطوح ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم پودر پادتن اختصاصی سبب کاهش معنی‌دار جمعیت باکتریایی در ساعت‌های ۴ و ۶ نگهداری (انکوباسیون) شد. در این میان بالاترین اثر مهاری در انتهای مرحلهٔ (فاز) لگاریتمی متعلق به سطح ۲۰۰ میلی‌گرم پودر پادتن اختصاصی بود که توانست سبب کاهش ۱/۲logCFU/mL در مقایسه با گروه شاهد (کنترل) شود ($P < ۰/۰۱$). لذا این یافته‌ها بیانگر آن است که باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* به‌همراه ادجوانت فروند (نوع کامل در تزریق اول و نوع ناقص در تزریق دوم)، خاصیت القایی بالایی داشته و بهره‌گیری از روش پولسون راهی مؤثر برای تولید درازمدت و با بازدهٔ بالا، برای به دست آوردن IgY اختصاصی با درصد خلوص و توان ضدباکتریایی (آنتی‌باکتریال) مطلوب است.

واژه‌های کلیدی: ایمونوگلوبولین Y، استخراج IgY، اثر ضد باکتریایی.

Efficient production and application of egg yolk antibody powder against *Staphylococcus aureus*

Farima Aliakbari[1], Amir Hossein Mahdavi[2*] and Hamid Reza Rahmani[3]
1, 2, 3. M.Sc. Student, Associate Professor and Professor, Department of Animal Sciences, College of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran
(Received: Mar. 7, 2018 - Accepted: May. 14, 2018)

ABSTRACT

The aim of present experiment was to investigate the immunochemical characteristics as well as *in vitro* inhibitory effects of specific and nonspecific egg yolk antibody powder on *Staphylococcus aureus* growth, as one of the main pathogenic serotypes of *Staphylococcus* in human and animals. A total of 16 White Leghorn hens (Hy-Line W36) of forty weeks in age were immunized by killed sonicated vaccine after plotting the growth curve and incubating the bacteria until the end of exponential growth phase. This vaccine was prepared eggs were collected daily for 8 weeks, IgY was then isolated and lyophilized by Polson method. The immunochemical properties and growth inhibitory effects of specific and nonspecific sIgY were tested against *Staphylococcus aureus*. The results showed that the plasma and egg specific activity of IgY against *Staphylococcus aureus* markedly increased after the first immunization and remained on the highest titer throughout the experimental period ($P<0.01$). Total IgY concentration and purity of specific IgY powder were 71% higher rather than the non-specific IgY powder ($P<0.05$). The administration of specific IgY powder at 100 and 200 mg significantly ($P<0.05$) reduced the bacterial counts during the incubation hours of 4 and 6. Compared to control group, using the highest level of specific IgY could significantly decrease 1.20 log CFU/mL ($P<0.01$). Therefore, the present findings indicated that *Staphylococcus aureus* accompanying with Freund's adjuvant (complete form in the first immunization and incomplete form in booster immunization) have a notable potential to produce high antibody levels for a long time period. In addition, Polson method is an effective way to obtain remarkable purity for IgY with high antibacterial efficiency and long term production.

Keywords: Antibacterial effects, immunoglobulin Y, IgY extraction.

* Corresponding author E-mail: mahdavi@cc.iut.ac.ir
1. Lyophilization

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* (*Staphylococcus aureus*) یکی از بیماریزا (پاتوژن)های فرصت‌طلب مهم در حوزهٔ سلامت انسان و دام به شمار می‌آید. این باکتری علت شایع عفونت‌های بیمارستانی و نیز دامنهٔ گسترده‌ای از دیگر عفونت‌ها همچون مشکلات شایع پوستی (مانند جوش و آبسه) تا بیماری‌های تهدیدکنندهٔ پنومونی، اندوکاردیت و مسمومیت غذایی است. افزون بر آن، این باکتری یکی از مهم‌ترین عامل‌های بروز ورم پستان در گاوهای شیری بوده که هزینه‌های فراوانی را برای درمان پادزیستی (آنتی‌بیوتیکی) آن و کاهش کیفیت شیر تولیدی در گله‌ها اعمال می‌کند (Leslie & Clem, 1969; Haran *et al.*, 2012). شیوع بالای بیماری‌های ناشی از *استافیلوکوکوس اورئوس* در جامعه‌های انسانی و دامی و استفاده از آنتی‌بیوتیک برای درمان آن از یک‌سو و افزایش گزارش‌های علمی مبنی بر پیدایش سویه‌های مقاوم به پادزی برای این باکتری از سوی دیگر، موجب افزایش نگرانی‌ها در ارتباط با سلامت عمومی شده است (Haran *et al.*, 2012). از این‌رو در سال‌های اخیر، همگام با جنبش جهانی رویارویی با افزایش مقاومت پادزیستی، تلاش برای دستیابی به جایگزین‌های دارویی مؤثر و درعین‌حال بی‌خطر علیه *استافیلوکوکوس‌اورئوس* افزایش یافته است.

یکی از این روش‌ها می‌تواند بهره‌گیری از ایمنیت غیرفعال خوراکی با استفاده از ایمنوگلوبولین‌های زردهٔ تخم‌مرغ (IgY) باشد که روشی عملی و به‌صرفه برای درمان غیرفعال بسیاری از عفونت‌ها است. در فرآیند به‌کارگیری IgY، می‌توان با ایمن کردن مرغ‌های تخم‌گذار با شاخص‌های پادزی یک بیماریزای خاص، پادتن (آنتی‌بادی) اختصاصی علیه آن بیماریزا را تولید کرد. این پادتن‌ها به‌صورت طبیعی وارد زردهٔ تخم‌مرغ شده و با استفاده از روش‌های بیوشیمیایی و ایمنی‌شناختی (ایمونولوژیک) قابل جداسازی هستند (Vega *et al.*, 2012). این پادتن‌ها که در پزشکی و دامپزشکی قابل استفاده‌اند با کاستن از میزان مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها می‌توانند خطر ریزجاندران (میکروارگانیسم‌های) مقاوم به دارو را کاهش دهند (Ebina, 1996). بررسی‌های اولیهٔ صورت گرفته در رابطه با توان تأثیر IgY برای مهار یا کاهش تأثیر بیماری‌شناختی (پاتولوژیک) *استافیلوکوکوس اورئوس* نشان داد، به‌کارگیری IgY خالص علیه انتروتوکسین B این باکتری توانست میمون‌ها را در مقابل سندرم تکانهٔ (شوک) کشنده محافظت کند (LeClaire *et al.*, 2002). با این وجود بررسی‌ها درزمینهٔ امکان تولید کاربردی پودر IgY اختصاصی (به جهت آسانی شیوهٔ مصرف) علیه *استافیلوکوکوس اورئوس* و نیز بررسی ویژگی‌های بیوشیمیایی، ایمنی‌شناختی و ضدیاکتریایی (آنتی باکتریال) آن بر رشد این باکتری، به‌عنوان یکی از مهم‌ترین سروتیپ‌های *استافیلوکوکوس* بیماری‌زای انسانی و دامی بسیار محدود بوده و لذا این بررسی برای نیل به هدف‌های بالا طراحی و اجرا شد.

مواد و روش‌ها

تولید واکسن

تهیهٔ پادگن (آنتی‌ژن) مورد نیاز برای ایمن‌سازی (ایمونیزاسیون) مرغ‌های تخم‌گذار با بهره‌گیری از روش Kariyawasam *et al.* (2004) انجام پذیرفت. به این منظور، باکتری *استافیلوکوک اورئوس* (PTCC 1337) از مجموعهٔ میکروبی سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه و در دمای ۳۷ درجهٔ سلسیوس و با سرعت ۱۸۰ دور در دقیقه (IKA-KS4000i control, Germany) به مدت ۶ ساعت (انتهای فاز لگاریتمی) کشت شد. پس از آن یاخته‌ها توسط سانتریفیوژ (Sigma 6K15, Laboratory Centrifuges, Germany) با سرعت ۵۰۰۰×g برای ۱۵ دقیقه و در دمای ۴ درجهٔ سلسیوس رسوب داده شدند. رسوب به‌دست‌آمده ۳ بار با بافر نمکی فسفات (PBS، pH= ۷/۲) شستشو شد و سپس برای دستیابی به غلظت CFU/mL ۲×۱۰^{۹}، با PBS مخلوط و درنهایت جمعیت میکروبی با بهره‌گیری از کشت به روش مایلز- میزرا (Miles & Misra, 1938) تأیید شد. برای تهیهٔ واکسن کشته‌شده، ۴۰ میلی‌لیتر از دروایهٔ (سوسپانسیون) باکتریایی، در شرایط حمام یخ، تحت تأثیر دستگاه سونیکاتور (Ultraschallprozessor., Dr. Hielscher, UP200H,

www.SID.ir

Archive of SID

Stuttgart, Germany) با بیشینه جریان برای ۱۵ دقیقه قرار گرفت. برای سترون (استریل) کردن دروایهٔ باکتریایی کشته‌شده، از پالایشگر (فیلتر)های ۰/۴۵ میکرومتری استفاده شد (Acrodisc Gelman Sciences, Mississauga, Ontario, Canada) که برای تأیید نبود باکتری زنده، نمونه‌ای از دروایهٔ سترون‌شده روی پلیت حاوی محیط کشت Tryptic Soy Agar (TSA) کشت شد. درنهایت واکسن به‌دست‌آمده، تا زمان تزریق در دمای ۲۰- درجهٔ سلسیوس نگهداری شد.

ایمن‌سازی مرغ‌های تخم‌گذار

نخستین مرحله در تولید IgY، ایمن کردن مرغ‌های تخم‌گذار با پادگن است که با روش ران و همکاران صورت گرفت (Ruan *et al.*, 2005). در این آزمایش برای تهیهٔ پادتن مورد نیاز، شمار ۱۶ قطعه مرغ تخم‌گذار لگهورن سفید سویهٔ های‌لاین W-36 که در سن ۴۰ هفتگی قرار داشتند ایمن‌سازی شدند. به این ترتیب که در آغاز در نخستین ایمن‌سازی، به ازای هر مرغ، ۰/۵ میلی‌لیتر دروایهٔ حاوی 10^9 CFU/mL باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* به همراه ۰/۵ میلی‌لیتر ادجوانت کامل فروند (Biogen, CF112, Mashhad, Iran) مخلوط و در دو عضلهٔ سینه‌ای به روش عضلانی تزریق شد. تزریق‌های یادآور ۲ و ۴ هفته پس از نخستین ایمن‌سازی، به ترتیب با ادجوانت ناقص فروند (Biogen, CF112, Mashhad, Iran) و بدون ادجوانت انجام پذیرفت (Ruan *et al.*, 2005). همچنین شمار ۱۶ قطعه مرغ تخم‌گذار نیز به‌عنوان گروه شاهد (کنترل) برای تولید پادتن غیراختصاصی در نظر گرفته شد که با روش بالا به‌جای پادگن، سرم فیزیولوژیک همراه با ادجوانت‌ها تزریق شد. در پایان هر هفته، با استفاده از سرنگ‌های ۵ میلی‌لیتری آغشته به هپارین، خون‌گیری از ورید بال پرندگان انجام شد و پس از جداسازی پلاسما، تا زمان انجام آزمایش‌های بعدی در دمای ۲۰- درجهٔ سلسیوس نگهداری شد. همچنین تخم‌مرغ‌های تولیدی به‌صورت روزانه گردآوری و در دمای ۴ درجهٔ سلسیوس نگهداری شدند. سپس در پایان هر هفته زرده‌ها جدا و تا زمان انجام آزمایش‌های مربوط به بررسی غلظتیا عیار (تیتر) پادتن اختصاصی در دمای ۲۰- درجهٔ سلسیوس نگهداری شدند.

استخراج IgY

برای جداسازی و تخلیص پادتن زردهٔ تخم‌مرغ، مهم‌ترین چالش، جداسازی حالت (فاز) چربی زردهٔ تخم‌مرغ از حالت آبی آن است. یکی از روش‌های تخلیص پادتن زردهٔ تخم‌مرغ، استفاده از حلال‌های آلی است که از آن جمله می‌توان به کلروفرم اشاره کرد. کلروفرم کمک بسیار شایانی در جداسازی حالت چربی از حالت آبی زردهٔ تخم‌مرغ می‌کند. استفاده از این حلال در کنار یک حلال پایهٔ آب مانند آب مقطر اسیدی یا بافر نمکی فسفات می‌تواند به بهترین نحو ممکن و با سانتریفیوژهای دور پایین، پروتئین‌های محلول در آب زردهٔ تخم‌مرغ را جداسازی کند؛ به‌طوری‌که بر پایهٔ بررسی‌های صورت گرفته، بازدهٔ (راندمان) استخراج IgY با بهره‌گیری از روش کلروفرم-پلی اتیلن گلایکول نسبت به فرآیندی که تنها از پلی‌اتیلن‌گلایکول ۶۰۰۰ استفاده کرده‌اند در حدود ۲/۵۷ برابر است (Polson, 1990). به این منظوره در آغاز زردهٔ تخم‌مرغ‌ها از سفیده جدا و پس از پاره کردن غشای زرده، زرده‌ها در یک ظرف شیشه‌ای تخلیه شدند. آنگاه کلروفرم تجاری به میزان هم‌حجم زرده‌ها و بافر نمکی فسفات به میزان دو برابر حجم زرده‌ها، مخلوط شد تا یک دروایهٔ یکنواخت از این ترکیب‌ها به دست آید. سپس مخلوط به‌دست‌آمده برای مدت ۲۴ ساعت درون شیشه‌های در بستهٔ درون یخچال در دمای ۴ درجهٔ سلسیوس نگهداری شد. پس از گذشت زمان انکوبه‌گذاری، این مخلوط به سانتریفیوژ منتقل شد و در دمای ۴ درجهٔ سلسیوس و با سرعت ۳ هزار دور در دقیقه به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس محلول رویی که حاوی پروتئین‌های محلول در آب بود درون ظروفی نگهداری شد. حجم محلول رویی توسط استوانهٔ مدرج اندازه‌گیری شد و ۱۲ درصد حجم آن (حجمی به وزنی) پلی‌اتیلن‌گلایکول ۶۰۰۰ به آن اضافه و حل شد و محلول به‌دست‌آمده دوباره برای مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجهٔ سلسیوس و با ۳۰۰۰ دور در دقیقه

www.SID.ir

Archive of SID

سانتریفیوژ شد. رسوب سفیدرنگ که حاوی پروتئین‌های محلول در آب زرده بود گردآوری و سپس به فریزر ۲۰- درجهٔ سلسیوس منتقل شد.

تهیهٔ پودر پادتن

پودر پادتن زردهٔ تخم‌مرغ به‌عنوان محصولی خشک و پایدار می‌تواند انتخابی بسیار باارزش برای استفادهٔ کاربردی ایمونوگلوبین Y باشد. به نظر می‌رسد که روش خشک‌کردن انجمادی نسبت به دیگر روش‌های تهیهٔ پودر IgY کارآمدتر است؛ زیرا این روش در مقایسه با خشک‌کردن پاششی، میزان بیشتر محصول و درصد کمتر رطوبت را فراهم می‌آورد (Yokoyama *et al*., 1992). برای این منظور، رسوب‌های حاوی IgY که پیش از این فریز شده بودند به دستگاه فریز درایر منتقل شدند و پس از گذشت ۲۴ ساعت خشک شدند تا به‌عنوان پودر پادتن اختصاصی (حاصل از تخم‌مرغ پرندگان ایمن‌سازی‌شده) و غیراختصاصی (حاصل از تخم‌مرغ پرندگان غیر ایمن‌سازی‌شده) استفاده شوند (Lee *et al*., 2002).

تعیین غلظت پروتئین کل

غلظت پروتئین کل زردهٔ تخم‌مرغ، پلاسمای خون و پودر پادتن با بهره‌گیری از روش بردفورد و با بهره‌گیری از آلبومین سرم گاوی به‌عنوان پروتئین استاندارد انجام پذیرفت (Bradford, 1976).

تعیین میزان پادتن کل به روش الایزای غیرمستقیم

بررسی غلظت پادتن Y در نمونه‌ها با بهره‌گیری از روش Sunwoo *et al*. (2002) انجام پذیرفت. به این منظور در آغاز نمونه‌های پلاسما و پودر IgY به میزان ۱۰۰۰ برابر رقیق شدند. برای مقایسه و برآورد میزان IgY در نمونه‌های مجهول، از IgY نرمال پلی‌کلونال (R&D systems polyclonal chicken IgY) به‌عنوان استاندارد استفاده شد. رقت‌های مختلف IgY استاندارد در مقادیر ۰، ۰/۳۱۲، ۰/۶۲۵، ۱/۲۵، ۲/۵، ۵، ۱۰ و ۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر با کمک بافر کربنات- بی‌کربنات تهیه شدند. برای اندازه‌گیری غلظت پادتن کل در نمونه‌ها، در آغاز پوشش‌دهی کف چاهک‌های پلیت با نمونه‌های رقیق‌شده انجام شد. به این منظور میزان ۱۰۰ میکرولیتر نمونه درون چاهک‌ها ریخته و سپس برای یک شبانه‌روز پلیت در دمای ۴ درجهٔ سلسیوس نگهداری شد. پس از آن شستشوی چاهک‌ها با استفاده از ۲۰۰ میکرولیتر بافر شستشو برای سه مرحله انجام گرفت. مرحلهٔ انسداد (بلاکینگ) چاهک‌ها با بهره‌گیری از بافر مسدودکننده شامل شیر خشک بدون چربی (Merck-skimmed milk) ۵ درصد (تهیه‌شده با بافر PBS) انجام گرفت که به این منظور، پس از افزودن ۲۰۰ میکرولیتر از این بافر به چاهک‌ها و سپری کردن ۲ ساعت زمان در شرایط آزمایشگاهی، شستشوی دوبارهٔ آن‌ها در سه مرحله صورت پذیرفت. پس از رقیق‌سازی پادتن اولیه (پادتن خرگوشی ضد زنجیره‌های بلند و کوتاه IgY) با بافر بلوکه‌کننده (شیر خشک ۵ درصد در PBS) به نسبت ۱ به ۱۰۰۰، میزان ۱۰۰ میکرولیتر از پادتن اولیهٔ رقیق‌شده به هر چاهک اضافه شد. پس از گذشت ۲ ساعت و شستشوی دوبارهٔ چاهک‌ها، میزان ۱۰۰ میکرولیتر از پادتن رقیق‌شدهٔ ثانویه (IgG بزی ضد IgG خرگوشی) اضافه شد. با سپری شدن ۲ ساعت و شستشوی دوبارهٔ چاهک‌ها، میزان ۱۰۰ میکرولیتر بسترهٔ (سوبسترای) تترامتیل بنزیدین به هر چاهک اضافه شد و پس از ۱۵ دقیقه میزان ۵۰ میکرولیتر از محلول متوقف‌کنندهٔ اسیدسولفوریک ۱ مولار به هر چاهک اضافه شد و درنهایت پلیت‌ها با استفاده از دستگاه الایزا خوان در طول‌موج ۴۵۰ نانومتر خوانده شدند.

تعیین فعالیت اختصاصی پادتن

برآورد میزان فعالیت اختصاصی پادتن‌ها با استفاده از روش سان وو و همکاران انجام پذیرفت (Sunwoo *et al*., 2002). برای این منظور، در آغاز میزان ۲۰۰ میکرولیتر *استافیلوکوکوس اورئوس* سونیکه شده، که با بافر کربنات-بی‌کربنات رقیق‌شده و حاوی CFU/mL ۲×۱۰^{۹} باکتری بود، کف چاهک‌ها پوشانده شد و پس از آن به مدت ۸ ساعت در دمای ۴ درجهٔ سلسیوس قرار گرفت. در ادامه همهٔ مراحل صورت گرفته در راستای اندازه‌گیری غلظت پادتن کل که در بخش بالا

www.SID.ir

Archive of SID

بیان شد تکرار شد تا درنهایت میزان پادتن اختصاصی علیه باکتری مورد آزمون سنجیده شود. همچنین درصد خلوص پادتن بر پایهٔ نسبت غلظت پادتن اختصاصی و یا غیراختصاصی به پروتئین کل برآورد شد (Sunwoo *et al.*, 2002).

بررسی تأثیر مهارکنندگی پودر IgY اختصاصی و غیراختصاصی بر رشد *استافیلوکوکوس اورئوس*

در آغاز مقادیر ۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم پودر IgY اختصاصی و نیز IgY غیراختصاصی، به‌عنوان گروه شاهد، با ۱ میلی‌لیتر TSB مخلوط شدند و پس از آن در دمای ۴ درجهٔ سلسیوس به مدت ۲۰ دقیقه و با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ (Sigma 6K15, Laboratory Centrifuges, Germany) شدند. سپس این محلول‌ها از پالایشگرهای ۰/۴۵ میکرومتری عبور داده شدند تا سترون شوند. ۲ میلی‌لیتر از محلول‌های به‌دست‌آمده با ۲ میلی‌لیتر محیط کشت TSB حاوی ۲×۱۰^{۹}CFU/mL باکتری مخلوط و در دمای ۳۷ درجهٔ سلسیوس همراه با گردش ۱۸۰ دور در دقیقه، قرار داده شدند تا تأثیر مهارکنندگی سطوح ۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم پودر IgY اختصاصی و غیراختصاصی برآورد شود (Lee *et al.*, 2002). برای بررسی میزان رشد باکتری‌ها، در ساعت‌های ۰، ۲، ۴ و ۶ نگهداری (انکوباسیون) (انتهای مرحلهٔ لگاریتمی)، میزان ۱۰۰ میکرولیتر از محیط‌های کشت مایع برداشته و با بهره‌گیری از روش مایلز- میزرا با سه بار تکرار، کشت روی محیط TSA (برای یک شب و دمای۳۷ درجهٔ سلسیوس) انجام گرفت (Miles & Misra, 1938). درنهایت شمار واحدهای تشکیل‌دهندهٔ پرگنه (کلنی) در هر میلی‌لیتر از نمونه‌ها در زمان‌های مورد بررسی محاسبه شد.

تجزیه‌وتحلیل آماری

پس از ثبت داده‌ها، تجزیه‌وتحلیل نهایی با استفاده از رویهٔ GLM نرم‌افزار SAS (2001) انجام شد. میانگین داده‌ها با استفاده از روش حداقل مربعات مقایسه شدند. مدل آماری که برای تجزیه‌وتحلیل داده‌ها استفاده شد شامل $Y_{ij} = \mu+A_i+e_{ij}$ است، که در آن Y_{ij} = میزان هر مشاهده، μ = میانگین مشاهده‌ها، A_i = اثر تیمار، و e_{ij} = اثر باقی‌مانده است.

نتایج و بحث

فعالیت اختصاصی IgY علیه *استافیلوکوکوس اورئوس*

همان‌گونه که در شکل ۱ ارائه شده است، پس از نخستین ایمن‌سازی، فعالیت اختصاصی پادتن علیه *استافیلوکوکوس اورئوس* در پلاسمای مرغ‌های تخم‌گذار افزایش یافت. پس از دومین تزریق در روز ۱۴، این روند افزایشی به شکل شایان‌ملاحظه‌ای ادامه یافت و تا پایان دوره در سطوح بالای خود نسبت به دو هفتهٔ آغازین باقی ماند ($P < ۰/۰۱$). تغییر همسانی نیز در فعالیت اختصاصی IgY علیه این باکتری در تخم‌مرغ‌ها مشاهده شد، با این تفاوت که فعالیت اختصاصی پادتن در تخم‌مرغ، از روز ۲۱ به بعد افزایش شایان‌توجهی نشان داد و همچون پلاسما، برای همهٔ دورهٔ نمونه‌برداری (۸ هفته)، در سطوح بالا حفظ شد ($P<۰/۰۱$). تأخیر در پاسخ بروز کرده در زردهٔ تخم‌مرغ نسبت به پلاسما (یک هفته) می‌تواند مربوط به مدت‌زمان لازم برای تشکیل زرده و نحوهٔ انتقال و تجمع پادتن در زرده باشد (Kitaguchi *et al.*, 2008).

فعالیت اختصاصی پادتن‌ها، به‌طور عمده تحت تأثیر توان ایمنی‌زایی پادگن است. این خاصیت نیز به‌نوبهٔ خود، تحت تأثیر عامل‌های مختلفی همچون ویژگی‌های منحصربه‌فرد پادگن، میزان پادگن، مسیر آلودگی، نوع ادجوانت و نژاد پرنده می‌تواند دچار تغییر شود. نتایج آزمایش‌های سان‌وو و همکاران نشان‌دهندهٔ آن است که استفاده از ادجوانت فروند می‌تواند بهترین پاسخ را در تداوم غلظت پادتن، برای یک دورهٔ درازمدت نسبت به ادجوانت‌های کوئیل A، عصارهٔ بره موم و عصارهٔ دانهٔ *Cochinchia momordica* بروز دهد (Sunwoo *et al.*, 2002). همچنین، امروزه به‌خوبی ثابت شده است که بهره‌گیری از تزریق عضلانی به‌عنوان یک روش ایمن‌سازی، در مرغ‌های تخم‌گذار سویهٔ لگهورن به‌عنوان یک‌سویه با تولید بالا، می‌تواند بهترین نتایج را برای بهره‌وری بالاتر تولید پادتن سبب شود (Sun *et al.*, 2008).

www.SID.ir

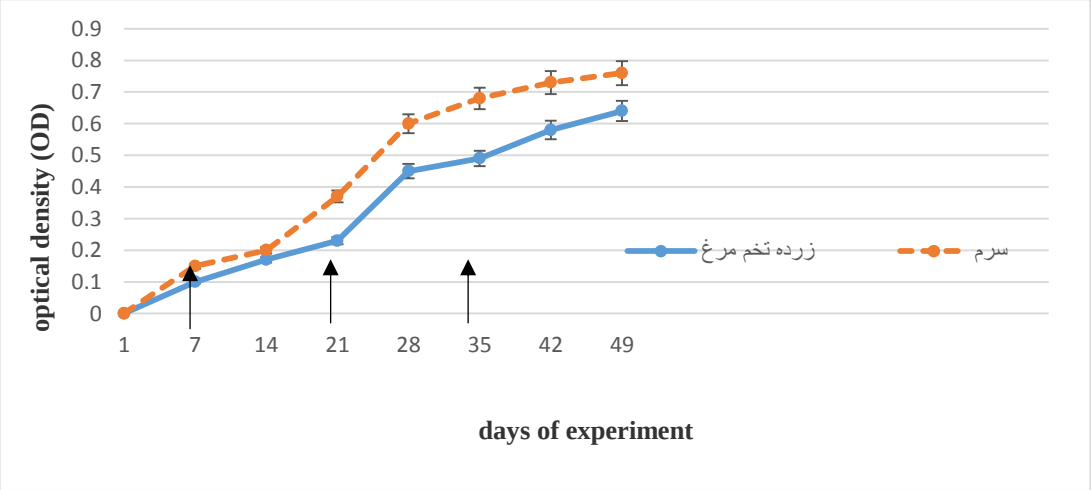
Archive of SID

هرچند برخی محققان در نتایج بررسی‌های خود پیشنهاد کرده‌اند، به دلیل نبود تغییر قابل‌ملاحظه در فعالیت اختصاصی پادتن پس از دومین تزریق یادآور (روز ۲۸)، انجام این تزریق امری غیرضروری است (Sunwoo *et al.*, 2002)، اما نتایج این بررسی نشان داد، انجام این تزریق برای حفظ چگالی نوری در سطوح بالا برای یک دورهٔ زمانی درازمدت می‌تواند به‌خوبی مؤثر باشد (Lee *et al.*, 2002). لذا با عنایت به این یافته‌ها می‌توان چنین بیان کرد که *استافیلوکوکوس اورئوس* به همراه ادجوانت فروند، دارای خاصیت القایی بالایی، برای تولید سطوح بالای پادتن در مرغ‌های تخم‌گذار لگهورن سفید، برای یک مدت طولانی بوده است.

ویژگی‌های بیوشیمیایی پلاسمای خون و زردهٔ تخم‌مرغ پرندگان ایمن‌شده

غلظت پلاسمایی پروتئین کل در دورهٔ آزمایش تغییر معنی‌داری را نشان نداد (جدول ۱). با این حال، از هفتهٔ سوم آزمایش سیر افزایشی به خود گرفت و به‌صورت حاشیه‌ای (P=۰/۰۹۶) تا پایان هفته‌های آزمایش در سطح بالایی حفظ شد. تغییرپذیری غلظت IgY کل در پلاسما نیز پس از دومین ایمن‌سازی و در هفتهٔ چهارم آزمایش به‌طور معنی‌داری (P<۰/۰۱) افزایش یافت و با القای ایمن‌سازی یادآور در هفتهٔ چهارم، مقادیر IgY کل در هفته‌های پنجم تا هفتم به اوج سطح خونی خود رسید و پس از آن در سطح بالایی حفظ شد. درصد خلوص پادتن (نسبت غلظت IgY به پروتئین کل) پلاسما نیز روند همسانی داشت به‌طوری‌که پس از آخرین ایمن‌سازی، در هفتهٔ ششم به بالاترین سطح خود رسید (P<۰/۰۱).

پس از اعمال ایمن‌سازی، غلظت پروتئین کل در زردهٔ تخم‌مرغ نیز روند افزایشی داشت و در هفته‌های ششم و هفتم آزمایش به بالاترین سطح خود رسید (P=۰/۰۷). غلظت IgY کل در زرده نیز از هفتهٔ پنجم آزمایش روندی افزایشی گرفت (P<۰/۰۵). این روند تا آخرین هفتهٔ رکورد برداری به شکل معنی‌داری نسبت به هفته‌های آغازین در سطح بالاتری قرار داشت. درصد خلوص پادتن نیز روند افزایشی نشان داد و از هفته‌های پنجم به بعد در سطوح بالای خود باقی ماند (P<۰/۰۱). هرچند نتایج برخی از گزارش‌های پیشین بیانگر آن است که غلظت IgY کل در زردهٔ تخم‌مرغ پس از اعمال ایمن‌سازی تغییر معنی‌داری را نشان نمی‌دهد (Lee *et al.*, 2002)، اما یافته‌های به‌دست‌آمده در این آزمایش نشان‌دهندهٔ آن است که پس از دومین تزریق، افزایش معنی‌داری در غلظت پادتن زردهٔ تخم‌مرغ به‌خوبی قابل مشاهده است.



شکل ۱. فعالیت‌های اختصاصی پادتن پلاسما و زردهٔ تخم‌مرغ در مرغ‌های ایمن شده با *استافیلوکوکوس اورئوس* در طول دورهٔ آزمایش. نشانگرها مشخص‌کنندهٔ زمان تزریق‌ها هستند.

Figure 1. Specific activities of plasma and egg yolk antibodies in *Staphylococcus aureus* immunized hens during experimental period. Arrows indicate the time of injections.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱. تغییرپذیری غلظت پروتئین کل و IgY و نیز درصد خلوص IgY در پلاسما و زردهٔ تخم‌مرغ در دورهٔ ایمن‌سازی مرغ‌های تخم‌گذار

Table 1. The alterations of total protein and IgY concentrations as well as IgY purity in plasma and egg yolk during the immunization period of laying hens

	Weeks of experiment									
	1	2	3	4	5	6	7	8	SEM	P-Value
Serum (mg/mL)										
Total protein	37.89	39.28	40.09	42.74	43.19	43.60	44.95	45.54	2023	0.096
IgY Total	3.51[b]	3.77[b]	3.84[b]	4.09[ab]	4.68[a]	4.92[a]	4.36[a]	4.13[ab]	0.632	0.005
Purity (%)	9.26[c]	9.59[bc]	9.57[bc]	9.56[bc]	10.83[b]	11.28[a]	9.69[bc]	9.06[c]	1.48	0.047
Egg Yolk (mg/mL)										
Total protein	92.58	95.60	96.78	96.18	97.38	100.19	98.65	97.96	17.75	0.071
IgY Total	12.06[c]	12.91[c]	14.45[bc]	15.82[ab]	16.89[b]	16.87[b]	17.02[a]	17.23[a]	1.98	0.042
Purity (%)	13.02[c]	13.50[c]	14.93[bc]	16.44[b]	17.34[a]	16.83[b]	17.25[a]	17.58[a]	1.39	0.001

استافیلوکوکوس اورئوس سونیکه‌شده در روزهای ۱، ۱۴ و ۲۸ به روش عضلانی به پرندگان تزریق شد.

a-c: میانگین‌های با حرف‌های غیرهمسان در هر ردیف از نظر آماری تفاوت معنی‌داری دارند (P < ۰/۰۵).

Chickens were injected IM with sonicated *Staphylococcus aureus* on days 1, 14 and 28.

a-c: Means with different superscript letters are significantly different (P<0.05).

ویژگی‌های ایمنی‌شیمیایی پودر IgY

هرچند میزان پروتئین پودر پادتن اختصاصی و غیراختصاصی علیه *استافیلوکوکوس اورئوس* تفاوت معنی‌داری را نشان نداد، اما با این وجود غلظت IgY کل در شکل اختصاصی حدود ۲۵ درصد بالاتر (P<۰/۰۵) از نوع غیراختصاصی آن بود (جدول ۲). به نظر می‌رسد که روش خشک‌کردن انجمادی نسبت به دیگر روش‌های تهیهٔ پودر IgY کارآمدتر باشد، زیرا این روش در مقایسه با روش خشک‌کردن پاششی میزان بیشتر محصول و محتوای کمتر رطوبت را فراهم می‌آورد (Yokoyama *et al.*, 1992)؛ با این وجود تفاوت قابل‌ملاحظه‌ای در میزان فعالیت اختصاصی پادتن فراهم شده با این روش‌ها مشاهده نشده و آنچه مسلم است اعمال پی‌درپی هرکدام از این فرآیندها می‌تواند بر توان عمل IgY تأثیر زیانباری را در پی داشته باشد (Chalghoumi *et al.*, 2009).

استخراج حالت پروتئین‌های محلول در آب زردهٔ تخم‌مرغ که حاوی پادتن‌های زرده هستند با استفاده از روش پولسون می‌تواند میزان بالایی از پروتئین را با درصد خلوص بالای حدود ۷۱ درصد از زرده استحصال کند. این شیوهٔ استخراج، در حضور حجم‌های بالای زردهٔ تخم‌مرغ و یا بدون دسترسی به سانتریفیوژهای دور بالا، توانایی بسیار خوبی را برای دستیابی به بالاترین بازده و درصد خلوص پادتن فراهم می‌آورد. چراکه در دیگر روش‌های استخراج همچون شیوهٔ ارائه‌شده توسط آکیتا و ناکایی (Akita & Nakai, 1992)، نه‌تنها پادتن به‌جای جداسازی از حالت رسوبی باید از حالت مایع جدا شود، بلکه نیازمند به استفاده از سانتریفیوژهای با دور بالا برای حجم‌های بسیار زیاد است که سبب اعمال هزینه‌های فراوان و صرف زمان بسیاری برای استخراج می‌شود. از سوی دیگر روش‌های ارائه شده توسط آن‌ها در بهترین حالت تنها توانسته است تا حدود ۳۰ درصد خالص‌سازی در پودر را اعمال کند.

جدول ۲. ویژگی‌های ایمنی‌شیمیایی پودر IgY اختصاصی و غیراختصاصی تولیدشده به شیوهٔ لیوفیلیزه

Table 2. Immunochemical characteristics of specific and nonspecific IgY powder produced by lyophilization

IgY powder	Purity (%)	IgY (mg/g)	Protein (mg/g)
Specific IgY	70.9[a] ± 0.07	398.3[a] ±5.61	561± 7.02
Nonspecific IgY	47.3[b] ± 0.06	256.7[b] ± 4.38	542 ± 6.30

a-b: میانگین‌های با حرف‌های غیرهمسان در هر ستون از نظر آماری تفاوت معنی‌داری دارند (P<۰/۰۵).

a-b: Means with different superscript letters are significantly different (P<0.05).

تأثیر مهارکنندگی پودر پادتن اختصاصی و غیراختصاصی بر *استافیلوکوکوس اورئوس*

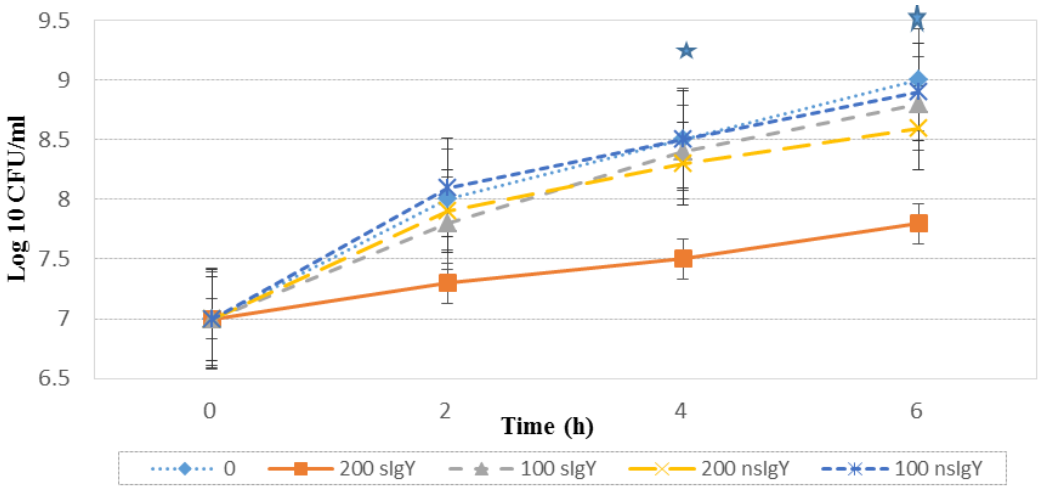
منحنی رشد به‌دست‌آمده از رفتار *استافیلوکوکوس اورئوس* شامل سه مرحله، مرحلهٔ تأخیری (ساعت ۰ تا ۲ انکوباسیون)، مرحلهٔ رشد تصاعدی یا مرحلهٔ لگاریتمی (ساعت ۲ تا ۶ انکوباسیون) و مرحلهٔ بیشینه ایستایی رشد بود. لذا با توجه به منحنی رشد، بررسی اثر مهارکنندگی پودر پادتن اختصاصی و غیراختصاصی در یک بازهٔ زمانی ۶ ساعته یعنی تا انتهای مرحلهٔ

www.SID.ir

Archive of SID

لگاریتمی انجام شد (شکل ۲). استفاده از سطوح پایین پودر پادتن اختصاصی (۱۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) تأثیر قابل‌ملاحظه‌ای بر مهار رشد میکروب در مقایسه با گروه شاهد (۱۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر پادتن غیراختصاصی) نداشت. با این وجود، انکوباسیون باکتری در مجاورت ۱۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر پادتن اختصاصی سبب کاهش غیر معنی‌دار رشد میکروبی در ساعت ۶ انکوباسیون شد (۰/۲۰ log CFU/mL، شکل ۲). اما افزودن ۲۰۰ میلی‌گرم پادتن اختصاصی به ازای هر میلی‌لیتر محیط کشت حاوی ۲×۱۰^{۹} CFU/mL سبب شد که در خلال ساعت‌های ۲ تا ۴ انکوباسیون، جمعیت میکروبی تنها در حدود ۰/۲ log CFU/mL افزایش یابد، حال‌آنکه این افزایش در گروه شاهد (۲۰۰ میلی‌گرم در هر میلی‌لیتر پادتن غیراختصاصی) در حدود ۰/۴ log CFU/mL بود. این نتیجه بیانگر آن است که کاربرد سطح دوم پادتن اختصاصی در مقایسه با گروه شاهد آن سبب کاهش ۱ لگاریتمی رشد میکروب در ساعت ۴ انکوباسیون شد (P<۰/۰۵). همچنین، بهره‌گیری از این سطح سبب کاهش بسیار معنی‌دار جمعیت باکتریایی تا حدود ۱/۲۰ log CFU/mL در مقایسه با گروه شاهد، در ساعت ۶ انکوباسیون شد (P<۰/۰۵). این یافته‌ها با نتایج بررسی‌های Sunwoo *et al.* (2002) یکسان است. بنابر گزارش آنان، اگرچه کاربرد ۱۸۰ میلی‌گرم پادتن اختصاصی به ازای هر میلی‌لیتر محیط کشت، موجب کاهش معنی‌دار جمعیت باکتری شد، اما این تأثیر در گروه‌های شاهد دیده نشد. بر پایهٔ یافته‌های به‌دست‌آمده از مشاهده‌های میکروسکوپ الکترونی، اتصال پادتن اختصاصی به ترکیب‌های سطحی باکتریایی و تغییر ساختمانی سطوح میکروبی، مهم‌ترین ساخت‌وساز تأثیر مهارکنندگی پادتن اختصاصی بر رشد باکتری است (Lee *et al.*, 2002; Sunwoo *et al.*, 2002).

از سوی دیگر نتایج به‌دست‌آمده، نشان داد که بهره‌گیری از پودر پادتن اختصاصی، وابسته به میزان دُز مصرفی بوده و با افزایش میزان مصرف، مهار رشد میکروبی به‌طور مؤثرتری رخ می‌داد. توان بالاتر پادتن اختصاصی در مهار رشد میکروبی به‌طور عمده در نتیجهٔ همکوشی دو پدیده بروز کرده است. رویداد اول، افزایش فعالیت اختصاصی پادتن، در زردهٔ تخم‌مرغ‌های ایمن‌سازی‌شده است و پدیدهٔ دوم، افزایش غلظت پادتن و در پی آن درصد خلوص IgY در پودرهای IgY اختصاصی نسبت به گروه‌های شاهد است. لذا این افزایش همزمان غلظت و فعالیت اختصاصی پادتن موجب شد تا توان مهاری پادتن اختصاصی به‌طور ویژه‌ای تحت تأثیر قرار گیرد.



شکل ۲. منحنی‌های مهار رشد *استافیلوکوکوس اورئوس* (۲×۱۰^{۹} CFU/mL) در حضور غلظت‌های مختلف (۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) پودر پادتن اختصاصی و غیراختصاصی

★ نشان‌دهندهٔ شمارش میکروبی پایین‌تر به شکل معنی‌دار (P<۰/۰۵) است.

Figure 2. Growth inhibition curves of *Staphylococcus aureus* (2×10^{9} CFU / mL) in the presence of different concentrations (0, 100 and 200 mg / mL) of specific and nonspecific IgY powder.
★ Indicates significantly lower counts (P<0.05).

www.SID.ir

Archive of SID

نتیجه‌گیری کلی

نتایج این یافته‌ها بیانگر آن است، باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* به همراه ادجوانت فروند، خاصیت القایی بالایی، برای تولید سطوح بالای پادتن در مرغ‌های تخم‌گذار لگهورن سفید، برای یک دورهٔ زمانی طولانی دارد. همچنین بهره‌گیری از روش پولسون راهی مؤثر در جهت تولید درازمدت و با بازدهٔ بالا، برای به دست آوردن پادتن اختصاصی با درصد خلوص مطلوب است. تأثیر ضدباکتریایی پودر پادتن اختصاصی، وابسته به میزان دُز مصرفی بوده و این توانمندی در نتیجهٔ همکوشی دو پدیده افزایش فعالیت اختصاصی و درصد خلوص IgY است که می‌تواند این محصول را به نامزدی ارزشمندی برای مهار و یا درمان مشکلات به‌دست‌آمده از *استافیلوکوکوس اورئوس* تبدیل کند.

REFERENCES

1. Akita, E. M. & Nakai S. (1992). Immunoglobulins from egg yolk: isolation and purification. *Journal of food science*, 57, 634-629.
2. Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 254-248.
3. Ebina, T. (1996). Prophylaxis of rotavirus gastroenteritis using immunoglobulin. In: *Viral Gastroenteritis* (pp. 217-223). Springer, Vienna.
4. Haran, K. P., Godden S. M., Boxrud D., Jawahir S., Bender J. B. & Sreevatsan S. (2012). Prevalence and characterization of *Staphylococcus aureus*, including methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, isolated from bulk tank milk from Minnesota dairy farms. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(3), 688-695.
5. Kitaguchi, K., Osada, K., Horio, F. & Murai, A. (2008). Exclusion of polymeric immunoglobulins and selective immunoglobulin Y transport that recognizes its Fc region in avian ovarian follicles. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 121, 290-299.
6. LeClaire, R. D., Hunt, R. E. & Bavari, S. (2002). Protection against bacterial superantigen Staphylococcal enterotoxin B by passive vaccination. *Infec. Immun*, 70, 2278-2281.
7. Lee, E., Sunwoo, H., Menninen, K. & Sim, J. (2002). In vitro studies of chicken egg yolk antibody (IgY) against Salmonella enteritidis and Salmonella typhimurium. *Poultry Science*, 81, 632-641.
8. Leslie, G. A. & Clem, L. W. (1969). Phylogeny of immunoglobulin structure and function. *Journal of Experimental Medicine*, 130(6), 1337-1352.
9. Miles, A. A. & Misra, S. S. (1938). The estimation of the bactericidal power of the blood. *J. Hygiene*, 38, 732-749.
10. Polson A. (1990). Isolation of IgY from the yolks of eggs by a chloroform polyethylene glycol procedure. *Immunological Investigations*, 19, 253-258.
11. Ruan, G.-P., Ma, L., He, X.-W., Meng, M.-J., Zhu, Y., Zhou, M.-Q., Hu, Z.-M. & Wang, X.-N. (2005). Efficient production, purification, and application of egg yolk antibodies against human HLA-A* 0201 heavy chain and light chain (β2m). *Protein Expression and Purification*, 44, 45-51.
12. SAS. (2001). *Statistical Analyse Systems User's Guide*. Version 8.02 Edn. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.
13. Sun, J. H., Jiang, Z. & Hu, S. (2008). Effect of four adjuvants on immune response to F4 fimbriae in chickens. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 121, 107-112.
14. Sunwoo, H., Lee, E., Menninen, K., Suresh, M. & Sim, J. (2002). Growth inhibitory effect of chicken egg yolk antibody (IgY) on *Escherichia coli* O157: H7. *Journal of Food Science*, 67, 1486-1494.
15. Vega, C. G., Bok, M., Vlasova, A. N., Chattha, K. S. & Ferna´ndez, F. M. (2012). IgY Antibodies Protect against Human Rotavirus Induced Diarrhea in the Neonatal Gnotobiotic Piglet Disease Model. *PLoS ONE*, 7(8), e42788.
16. Yokoyama, H., Peralta, R. C., Diaz, R., Sendo, S., Ikemori, Y. & Kodama, Y. (1992). Passive protective effect of chicken egg yolk immunoglobulins against experimental enterotoxigenic *Escherichia coli* infection in neonatal piglets. *Infection and Immunity*, 60, 998-1007.

www.SID.ir