**Original Article**

# Production and Evaluation of Anti-Salmonella *Typhimuruim* Immunoglobulin Y Isolated from Serum and Eggs Laid

**M. Saadati, Ph.D.[1, 2]*, N. Gorbani, M.Sc.[2], B. Barati, M.Sc.[1, 2], S. Nazarian, M.Sc.[2],**

**1. Applied Biotechnology and Environmental Research Center, Baqiyatallah Medical Science University, Tehran, Iran**
**2. Biology Department, Imam Houssein University, Tehran, Iran**

** Corresponding Address: P.O.Box: 19395-5739, Applied Biotechnology and Environmental Research Center, Baqiyatallah Medical Science University, Tehran, Iran*
*Email: saadati_m@yahoo.com*

## Abstract

**Received: 16/Apr/2008, Accepted: 5/Jun/2008**

**Objective:** The purpose of the study was to evaluate the production of antibodies in serum as well as egg yolk raised against *S. typhimurium* and the cross-reactivity of this antibody with other enteric bacteria.

**Materials and Methods:** White egg–laying hens were immunized with *S. typhimurium*, heat-killed whole cell, in Freund's adjuvant. Immunization was done with $10^7$ conlony forming unit (CFU) of bacteria per hen which was injected into the breast muscle of lay. Specific antibodies were detected by enzyme-linked immunosorbent assay in the serum and in eggs. The serum and eggs of two adults white Leghorn hens were not immunized with *S. typhimurium* used as a control.

**Results:** Chicken egg yolk antibodies (IgY) were raised against *S. typhimuruim* in the serum as well as in eggs. The production of IgY in serum was higher than IgY produced in egg yolk. Anti-*S. typhimurium* IgY cross-reacted 63%, 25% and 14% with *S. typhimurium*, *Shigella dysenteriae* and *E. coli* respectively.

**Conclusion:** The findings indicate that eggs from hens immunized with *S. typhimuruim* have not specific antibodies for the detection of *S. typhimuruim*, but they may have the potential of being a useful source of passive immunity against this pathogen.

***Keywords:*** Immunoglobulin Y (IgY), Salmonella, ELISA, Egg

Yakhteh Medical Journal, Vol 10, No 4, Winter 2009, Pages: 260-263

Archive of SID



www.SID.ir

# تولید و ارزیابی ایمونوگلوبولین Y علیه سالمونلا تیفی موریوم در سرم مرغ و تخم مرغ

مجتبی سعادتی .Ph.D[۲،۱*]، نسیبه قربانی .M.Sc[۲]، بابک براتی .M.Sc[۲،۱]، شهرام نظریان .M.Sc[۱]

۱. دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... (عج)، مرکزتحقیقات بیوتکنولوژی کاربردی و محیط زیست، تهران، ایران
۲. دانشگاه امام حسین(ع)، گروه علوم زیستی، تهران، ایران

* آدرس نویسنده مسئول: ایران، تهران، صندوق پستی: ۵۷۳۹-۱۹۳۹۵، دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... (عج)، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی کاربردی و محیط زیست
پست الکترونیک: Email: saadati_m@yahoo.com

## چکیده

دریافت مقاله: ۸۷/۱/۲۸، پذیرش مقاله: ۸۷/۳/۱۶

* **هدف:** تولید و ارزیابی آنتی‌بادی در سرم و تخم‌مرغ، علیه سالمونلا تیفی موریوم و نیز بررسی واکنش متقاطع این آنتی‌بادی با دیگر باکتری‌های روده‌ای
* **مواد و روش‌ها:** مرغ‌های سفید تخم‌گذار با سلول کامل سالمونلا تیفی موریوم که توسط حرارت کشته و با ادجوونت فروند مخلوط شده، ایمن شدند. ایمنی‌زایی توسط Colony Forming Unit (CFU) $10^7$ از باکتری که به عضله سینه مرغ تخم‌گذار تزریق گردید، ایجاد شد. آنتی‌بادی‌های اختصاصی توسط روش الایزا در سرم و تخم‌مرغ‌ها مورد ارزیابی قرار گرفتند. از سرم و تخم‌مرغ دو مرغ سفید لگهورن بالغ تخم‌گذار که علیه سالمونلا تیفی موریوم ایمن نشده بودند به عنوان شاهد استفاده شد.
* **یافته‌ها:** آنتی‌بادی علیه باکتری سالمونلا تیفی موریوم در سرم و تخم‌مرغ تولید شد. میزان آنتی‌بادی Y در سرم بیش از تخم‌مرغ تولید شد. آنتی‌بادی تولید شده علیه سالمونلا تیفی موریوم با باکتری سالمونلا تیفی ۶۳ درصد، با باکتری شیگلا دیسانتری ۲۵ درصد و با باکتری اشریشیاکلی ۱۴ درصد واکنش متقاطع داشت.
* **نتیجه گیری:** نتایج این تحقیق دلالت بر این دارد که علی‌رغم وجود واکنش متقاطع این آنتی‌بادی با باکتری‌های روده‌ای پیشنهاد می‌شود به عنوان منبع ایمنی غیرفعال در بیماری ایجاد شده توسط این عامل بیماری‌زا مورد بررسی قرار گیرد.

* **کلیدواژگان:** ایمونوگلوبولین Y، سالمونلا، الایزا، تخم‌مرغ

فصلنامه پزشکی باخته، سال دهم، شماره ٤، زمستان ۸۷، صفحات: ۲۶۵-۲۶۰

## مقدمه

آلودگی موادغذایی یکی از مشکلات بهداشتی بسیاری از کشورها است که هر ساله هزینه‌های گزافی جهت کنترل آن صرف می‌شود. باکتری‌ها نقش مهمی در ایجاد این آلودگی عهده‌دارند که در این میان باکتری سالمونلا اهیمت ویژه‌ای دارد و در بسیاری از کشورها این آلودگی گزارش شده است (۱، ۲). باکتری سالمونلا یکی از مهمترین عوامل بیماری‌زای روده‌ای در حیوانات و انسان‌ها است که از طریق آب و غذای آلوده انتقال می‌یابد (۲).

جنس سالمونلا، دارای سروتیپ‌های متعددی است که می‌تواند باعث گاسترو آنتریت حاد (مسمومیت غذایی)، تب روده‌ای (تیفوئید یا پاراتیفوئید)، عفونت‌های سیستمیک شود (۱).

آلودگی‌های انسانی از طریق مصرف غذاهای خام مانند گوشت، تخم‌مرغ و غذاهای روزانه حاصل می‌شود (۳).

سالمونلا تیفی موریوم یکی از سروتیپ‌های این باکتری است که برای حیوانات آزمایشگاهی کاملا بیماری‌زاست و پس از ورود به بدن آنها قادر است نوع بیماری شبیه تیفوئید انسانی ایجاد کند (۳، ۴).

در سال‌های اخیر، انواع مختلفی از آنتی‌بیوتیک‌ها برای مقابله با سالمونلاها استفاده شده است که با افزایش تعداد باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک، استفاده از روش‌های جایگزین ضروری به نظر می‌رسد (۵). استفاده از آنتی‌بادی‌های خوراکی، روش جالبی برای مقابله با پاتوژن‌های روده‌ای در انسان‌ها و حیوانات محسوب می‌شود (۶، ۷). در این میان مطالعات فراوانی در خصوص تولید آنتی‌بادی زرده تخم‌مرغ (IgY) برای ایجاد ایمنی غیرفعال در انسان و حیوانات جهت مقابله با بسیاری از بیماری‌های باکتریایی و ویروسی انجام شده است (۱۰-۸).

تولید IgY در زرده تخم‌مرغ از لحاظ اقتصادی بسیار مقرون به صرفه است و در مقایسه با IgG حجم زیادی از آنتی‌بادی را می‌توان تولید کرد بدون آنکه به حیوان آسیبی برسد (۱۱). IgY به صورت خوراکی ایمونوژن نیست اما اگر به صورت داخل وریدی به موش تزریق شود یک ایمونوژن محسوب شده و سبب ایجاد پاسخ ایمنی می‌شود. IgY که به صورت خوراکی مصرف می‌شود در معرض تقلیب توسط pH اسیدی معده و تجزیه توسط آنزیم‌های پروتئازی قرار می‌گیرد. اما مطالعات نشان داده که بخشی از آنتی‌بادی‌ها به صورت سالم باقی می‌مانند و بخش دیگری از آنها به قطعات Fab, Fab2, Fc تجزیه می‌شوند. با این وجود، قطعات Fab2 و Fab هنوز توانایی اتصال به آنتی‌ژن را حفظ کرده‌اند (۱۲). از دیگر مزایای این روش، وجود واکنش متقاطع این آنتی‌بادی با باکتری‌های بیماری‌زا است اما استفاده از آنتی‌بادی مرغی می‌تواند دارای معایبی از جمله امکان واکنش متقاطع با باکتری‌های غیربیماری‌زای روده‌ای باشد که با ایجاد تغییر در فلور طبیعی روده ممکن است زمینه ایجاد بعضی از بیماری‌ها را فراهم سازد.



Archive of SID
www.SID.ir

هدف از این تحقیق تولید و تخلیص IgY علیه سالمونلا و بررسی واکنش متقاطع آنتی‌بادی تولید شده علیه سالمونلا تیفی موریم با باکتری‌های روده‌ای با استفاده از روش الایزا بوده است.

## مواد و روش‌ها

### سوش باکتری

باکتری سالمونلا تیفی موریوم (ATCC=14028) و نیز سالمونلا تیفی، باکتری شیگلا دیسانتری و اشریشیاکلی از آزمایشگاه رفرانس بیمارستان بوعلی‌سینا تهران تهیه شد. سپس با استفاده از روش های بیوشیمیایی مورد شناسایی قرار گرفتند.

### آماده کردن باکتری سالمونلا تیفی موریوم برای تزریق

به منظور آماده کردن باکتری جهت تزریق ابتدا کشت‌های تازه تهیه شد. بدین منظور باکتری‌ها به طور جداگانه در محیط کشت BHI براث در دمای ۷۳ درجه سانتی‌گراد بر روی شیکر به مدت ۸ ساعت قرار داده شدند. برای غیرفعال کردن باکتری‌ها از دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه در بن‌ماری استفاده شد.

### تهیه آنتی بادی علیه سالمونلا تیفی موریوم در مرغ

به منظور تهیه آنتی‌بادی در مرغ، تعداد ۲ مرغ سفید لگهورن بالغ تخم گذار تهیه و به هر کدام از مرغ‌ها تعداد $10^7$ CFU باکتری تزریق شد. پس از غیرفعال کردن باکتری‌ها به روش فوق، با استفاده از سانتریفیوژ به مدت ۱۰ دقیقه و با دور ۳۰۰۰ rpm جداسازی باکتری‌ها صورت گرفت. سپس سلول‌ها با آب مقطر استریل شست و شو داده شدند و در نهایت حجم سلول‌ها با آب مقطر استریل به ۲۵۰ میکرولیتر رسانده شد. ۲۵۰ میکرولیتر ادجوانت کامل با نمونه آماده مخلوط و پس از تهیه سوسپانسیون از آن به عضله سینه دو مرغ سفید تخم‌گذار تزریق شد. از سرم و تخم‌مرغ دو مرغ سفید لگهورن بالغ تخم‌گذار که آنتی‌ژن دریافت نکرده بودند به عنوان شاهد استفاده شد.

به منظور افزایش تیتر آنتی‌بادی، تعداد $10^7$ CFU باکتری مورد نظر همراه با ادجوانت ناقص که به روش فوق تهیه شده بودند در ۳ نوبت دیگر با فاصله زمانی هر دو هفته یک بار به مرغ‌های مورد نظر تزریق شدند. تزریق پنجم یک ماه پس از تزریق چهارم و بدون ادجوانت انجام شد. قبل از انجام هر تزریق، از رگ زیر بال هر یک از مرغ‌ها خون‌گیری به عمل آمد. برای جداسازی سرم، خون هر مرغ به طور جداگانه به داخل اپندورف استریل منتقل و به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۳۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شدند. مایع رویی که حاوی سرم بود جمع‌آوری و در دمای منهای ۴ درجه سانتی‌گراد تا انجام آزمایش نگهداری شد.

### تخلیص IgY و تعیین میزان پروتئین

به منظور تخلیص IgY، پس از تزریق سرم آنتی‌ژن به مرغ‌های مورد آزمایش، تخم‌مرغ‌های حاوی آنتی‌بادی جمع‌آوری و در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. به منظور تخلیص IgY، به ۱۰ میلی‌لیتر از زرده تخم‌مرغ که به طورکامل از سفیده جدا شده بود ۱۰۰ میلی‌لیتر کلرو فرم سرد (منهای ۲۰ درجه سانتی گراد) اضافه شد. پس از تشکیل دوفاز، فاز زیرین دور ریخته و این مرحله دوباره تکرار شد. پس از آن به فاز رویی ایزوپروپانول سرد اضافه شد. در این مرحله فاز رویی را دور ریخته، رسوب جمع‌آوری و به آن استون سرد افزوده شد. سپس برای خشک شدن در کاغذ صافی پخش شدند. سپس به آن ۵۰ میلی‌لیتر PBS افزوده و یک ساعت در دمای محیط (در حالی که مرتبا توسط مگنت به هم می‌خورد) قرار داده شد. در مرحله بعد نمونه در دور ۱۲۰۰۰ rpm سانتریفیوژ و محلول رویی که حاوی IgY بوده جدا شد. از روش براد فورد برای تعیین میزان پروتئین استفاده شده است.

### تست الایزا

برای بررسی تیتر آنتی‌بادی تولید شده علیه سالمونلا تیفی موریوم و نیز برای انجام تست متقاطع از تست الایزا استفاده شد. جهت انجام آزمایش، ۴ عدد پلیت الایزا انتخاب شد. بدین منظور ابتدا هر چاهک از میکروپلیت با $10^4$ CFU از باکتری سالمونلا تیفی موریوم که توسط حرارت غیرفعال شده بود و ۱۰۰ میکرو لیتر از کوتینگ بافر (بافرکربنات – بی‌کربنات ۰/۰۵ مولار با pH= ۹/۶) پوشانده و به مدت ۱ ساعت در دمای ۷۳ درجه سانتی‌گراد بر روی شیکر قرار داده شد. به منظور کنترل اجزای واکنش الایزا، یک ردیف از این پلیت‌ها به عنوان شاهد انتخاب شد.

پس از زمان فوق، میکروپلیت سه دفعه با بافر PBST (PBS با pH=۷/۴ حاوی ۰/۰۵ درصد توئین ۲۰) شست‌وشو داده شد. سپس چاهک‌های میکروپلیت با ۱۰۰ میکرولیتر بافر PBSTG (PBST حاوی ۲درصد ژلاتین) بلاک شد و میکروپلیت در دمای ۷۳ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت قرار گرفت. پس از شست‌وشو میکروپلیت، سرم مرغ ویا زرده تخم‌مرغ در چاهک‌های مربوطه در بافر PBST در حجم ۱۰۰ میکرولیتر تهیه و ریخته شد و مجددا میکرو پلیت به مدت یک ساعت در دمای۷۳ درجه سانتی‌گراد قرارداده شد. پس از شست و شو، ۱۰۰ میکرولیتر از کانژوگه (AntiIgY) در رقت ۱/۳۰۰۰ اضافه و در دمای ۷۳ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت قرار گرفت. در نهایت به دنبال شست و شو، ۱۰۰ میکرولیتر از محلول سوبسترا به چاهک اضافه شد و اجازه داده شد تا واکنش طی مدت ۲۰ دقیقه کامل شود. واکنش با اسیدسولفوریک ۱ مولار متوقف و جذب درطول موج ۹۴۰ نانومتر به کمک دستگاه الایزا ریدر خوانده شد.

### الکتروفورز SDS-PAGE

با استفاده از روش Laemli الکتروفورز سدیم دودسیل سولفات پلی آکریل آمید ژل الکتروفورز انجام و از ژل ۱۰ درصد استفاده شد. به منظور انجام الکترو فورز، IgY تخلیص شده از زرده تخم‌مرغ به مدت ۵ دقیقه در بافر نمونه بدون 2ME جوشانده شد. همچنین برای بررسی بیشتر، یک نمونه از IgY تخلیص شده از زرده تخم‌مرغ به همراه بافر نمونه دارای 2ME استفاده شد. الکتروفورز بوسیله ژل ۱۰ درصد و در شدت جریان ۱۴ میلی‌آمپر انجام و پس از اتمام الکتروفورز، ژل باکوماسی‌بلو رنگ‌آمیزی شد.

## یافته‌ها

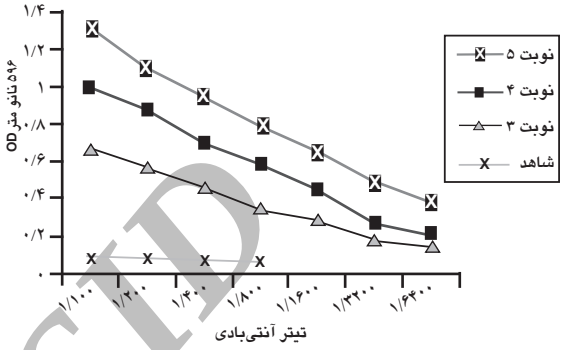
پس از شناسایی باکتری با استفاده از روش‌های بیوشیمیایی نسبت به تولید آنتی‌بادی در مرغ اقدام شد، نمودار ۱ تیتر IgY تولید شده علیه باکتری سالمونلا تیفی موریوم در سرم مرغ را نشان می‌دهد. در این نمودار افزایش میزان IgY پس از تزریقات آنتی‌ژن تهیه شده در نوبت سوم، چهارم و پنجم مشخص شده است. بیشترین تیتر آنتی‌بادی پس از تزریق نوبت پنجم مشاهده شد. از سرم مرغ‌های تخم‌گذار که آنتی‌ژن دریافت نکرده بودند به عنوان شاهد استفاده شد. نمودار ۲



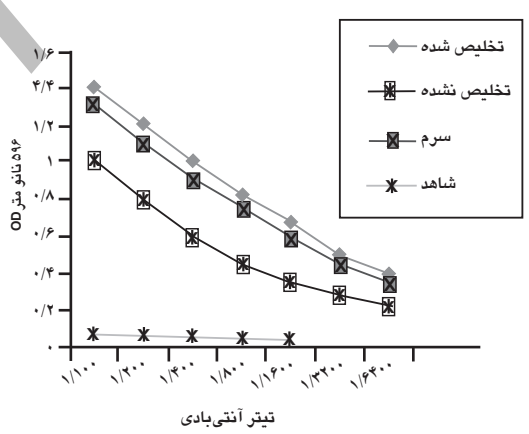
Archive of SID

www.SID.ir

مقایسه تیتر آنتی‌بادی تولید شده علیه سالمونلا تیفی موریوم در سرم، تخم‌مرغ تخلیص شده به وسیله حلال‌های آلی و تخم‌مرغ تخلیص نشده را نشان می‌دهد. میزان آنتی‌بادی IgY در سرم بیش از میزان آن در زرده تخم‌مرغ تخلیص نشده بود. این درحالی است که با تخلیص این آنتی‌بادی میزان آن در نمونه افزایش یافت (نمودار ۲).

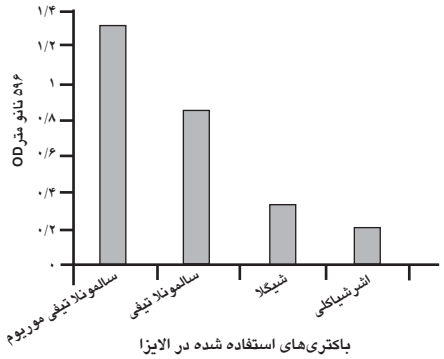



**نمودار ۱: تیتر آنتی‌بادی تولید شده علیه سالمونلا تیفی موریوم در سرم مرغ ایمن شده با این باکتری پس از تزریق سوم، چهارم و پنجم (از سرم مرغ‌های تخم‌گذار که آنتی‌ژن دریافت نکرده بودند به عنوان شاهد استفاده شده است)**



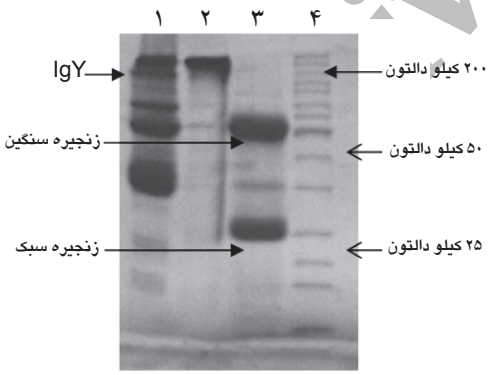

**نمودار ۲: مقایسه تیتر آنتی‌بادی تولید شده علیه سالمونلا تیفی موریوم در زرده تخم‌مرغ تخلیص شده با حلال‌های آلی، سرم و تخم‌مرغ تخلیص نشده (از زرده تخم‌مرغ‌های مرغ تخم‌گذار که آنتی‌ژن دریافت نکرده بودند به عنوان شاهد استفاده شده است)**

از زرده تخم‌مرغ‌های تهیه شده از مرغ‌های تخم‌گذاری که آنتی‌ژن دریافت نکرده بودند به عنوان شاهد استفاده شد. میزان پروتئین سنجیده شده در تخم‌مرغ تخلیص شده به روش براد فورد برابر با ۱۱ میلی گرم در میلی‌لیتر بود. نمودار ۳ تست تقاطع میان سرم ضد سالمونلا تیفی موریوم باکتری‌های سالمونلا تیفی، شیگلا و اشریشیاکلی را نشان می‌دهد. درصد شباهت به دست آمده از بررسی واکنش متقاطع بین سرم ضدسالمونلا تیفی موریوم و باکتری سالمونلا تیفی بیشترین میزان را نشان داد که ۳۶ درصد بود. این در حالی است که کمترین میزان واکنش متقاطع بین این آنتی‌بادی با باکتری اشریشیاکلی به میزان ۴۱ درصد می‌رسید. در این میان واکنش متقاطع بین باکتری شیگلا دیسانتری با آنتی‌بادی تولید شده، ۵۲ درصد مشاهده شد.




**نمودار ۳: نتایج تست کراس حاصل از الایزا بین سرم ضد سالمونلا تیفی موریوم باکتری‌های سالمونلا تیفی، شیگلا و اشریشیاکلی و همچنین سالمونلا تیفی موریوم (به عنوان شاهد مثبت) که از باکتری سالمونلا تیفی موریوم و سرم ضدباکتری سالمونلا استفاده شده است.**

به منظور بررسی آنتی‌بادی تولید شده در سرم و تخم‌مرغ و تخلیص آن، از ژل الکتروفورز ۱۰ درصد استفاده شد. با استفاده از SDS-PAGE نشان داده شد که تخلیص آنتی‌بادی IgY با استفاده از روش استفاده شده مطلوب بود (شکل ۱). ستون ۱ مربوط به آنتی بادی تخلیص شده از تخم‌مرغ (توسط حلال آلی) با استفاده از بافر نمونه بدون 2ME است. ستون ۲ نشان‌دهنده باند مربوط به آنتی‌بادی تخلیص شده از سرم مرغ با استفاده از بافر نمونه بدون 2ME است. باندهایی با وزن مولکولی تقریبا ۱۸۰ کیلودالتون در این دو ستون مربوط به IgY تخلیص شده از تخم‌مرغ است. ستون ۳ آنتی بادی تخلیص شده از سرم مرغ با استفاده از بافر نمونه دارای 2ME است. باندهای ۵۰ و ۲۵ کیلودالتونی به ترتیب مربوط به زنجیره سنگین و زنجیره سبک آنتی‌بادی هستند. ستون ۴ مارکر پروتئینی است.




**شکل ۱: آنالیز آنتی‌بادی‌های موجود در سرم و تخم‌مرغ بر روی ژل الکتروفورز پلی‌آکریل‌آمید ۱۰ درصد با رنگ‌آمیزی با کوماسی‌بلو**
**ستون ۱: آنتی‌بادی تخلیص شده از تخم‌مرغ توسط حلال آلی با استفاده از بافر نمونه بدون 2ME با وزن مولکولی تقریبا ۱۸۰ کیلودالتون. ستون ۲: آنتی‌بادی تخلیص شده از سرم مرغ با استفاده از بافر نمونه بدون 2ME با وزن مولکولی ۱۹۰ کیلودالتون. ستون ۳: آنتی‌بادی تخلیص شده از سرم مرغ با استفاده از بافر نمونه دارای 2ME. باندهای ۵۰ و ۲۵ کیلودالتونی به ترتیب مربوط به زنجیره سنگین وسبک آنتی‌بادی و ستون ۴: مارکر پروتئینی است.**

## بحث

وجود آنتی‌بادی IgY در خون و تخم‌مرغ قابل ردیابی است. تولید IgY در زرده تخم‌مرغ روش اقتصادی و موثری برای افزایش



Archive of SID
www.SID.ir

آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال است. به طور مثال یک مرغ تخم‌گذار می‌تواند آنتی‌بادی معادل با ۹۰-۷۵ میلی‌لیتر از سرم یا ۱۸۰-۱۵۰ میلی‌لیتر از کل خون را طی یک هفته در زرده تخم‌مرغ تولید کند. در حالی که از خرگوش تقریبا در هر هفته ۲۰ میلی‌لیتر خون‌گیری می‌شود. فقط پستانداران بزرگتر مثل گاو و اسب می‌توانند آنتی‌بادی‌هایی بیشتر از مرغ تولید کنند (۱۲). خواص ضدباکتریایی IgY یکی از مهمترین جنبه‌های مطالعه IgY است. بسیاری از گزارش‌ها نشان می‌دهد IgY می‌تواند دارای عملکرد ایمنی‌زایی در عفونت‌های باکتریایی و ویروسی در موجودات زنده باشد (۱۰، ۱۳). پرالتا و همکارانش از IgY تولید شده علیه سالمونلا انتریتیدیس برای جلوگیری از سالمونلوزیس در موش‌ها به صورت خوراکی استفاده کرده‌اند. این نتایج نشان داد که IgY می‌تواند نقش مهمی در ایمنی‌زایی داشته باشد (۱۴). هاتا و همکارانش از IgY تولید شده علیه استرپتوکوکوس موتانس در جهت جلوگیری از ایجاد پلاک دندانی استفاده کردند که سبب کاهش استقرار این باکتری در دندان شده است (۱۵). علاوه بر استفاده از IgY علیه بیماری‌های باکتریایی، این آنتی‌بادی علیه بیماری ویروسی نیز استفاده شده است. کوروکی و همکارانش از IgY تولیده شده علیه روتا ویروس در مدل موش استفاده کردند که سبب کاهش اسهال در آنها شد (۹).

بیال و همکارانش نیز نشان دادند پس از تزریق مجدد باکتری سالمونلا میزان آنتی‌بادی اختصاصی IgY به شدت افزایش می‌یابد (۱۶). کلیفتون هادلی و همکارانش و وودوارد و همکارانش گزارش کرده‌اند که پس از تزریق باکتری کشته شده سالمونلا تیفی موریوم، مقدار قابل توجه آنتی‌بادی IgY تولید می‌شود (۱۷، ۱۸). در این تحقیق نیز از باکتری کشته شده جهت تحریک سیستم ایمنی استفاده شد تا میزان قابل قبولی آنتی‌بادی تولید شود. تولید آنتی‌بادی پس از تزریق اولین دوز باکتری آغاز شد و پس از تزریق بوستر افزایش یافت که با نتایج به دست آمده از تحقیق بیال و همکارانش مطابقت دارد. هر چند حداکثر آنتی‌بادی تولید شده پس از تزریق بوستر چهارم اتفاق افتاد و تا هفته دوازدهم ادامه یافت (۱۶).

در این تحقیق نشان داده شد که آنتی‌بادی تولید شده علیه باکتری سالمونلا تیفی موریوم دارای واکنش متقاطع با باکتری سالمونلا تیفی بود (۶۳ درصد) این در حالی بود که این آنتی‌بادی با باکتری شیگلا دیسانتری ۲۵درصد و با باکتری اشریشیاکلی ۱۴درصد واکنش متقاطع داشت که با یافته لی و همکارنش که نشان داده‌اند آنتی‌بادی تولید شده در مرغ علیه سالمونلا انتریتیدیس دارای ۵۵/۳ درصد واکنش متقاطع با سالمونلا تیفی موریوم بوده و در مقابل، مقدار کمتری واکنش متقاطع با باکتری اشریشیاکلی دارد تطابق دارد (۱۹). این واکنش متقاطع زیاد بین آنتی‌بادی تولید شده علیه سالمونلا تیفی موریوم با باکتری سالمونلا تیفی و مقایسه آن با باکتری شیگلا دیسانتری ۲۵درصد و با باکتری اشریشیاکلی این حقیقت را که گونه‌های مختلف سالمونلا دارای آنتی‌ژن سوماتیک و نیز اپی‌توپ‌های مشترک بر روی فلاژلین هستند بیان می‌کند. واکنش متقاطع با باکتری‌های بیماری‌زا از مزایای نسبی کاربرد این آنتی‌بادی است اما واکنش متقاطع با باکتری‌های غیربیماری زای روده‌ای ممکن است منجر به تغییر فلور طبیعی روده شود و زمینه ایجاد بعضی از بیماری‌ها را فراهم سازد.

در این مطالعه، میزان تولید آنتی‌بادی در سرم و زرده تخم‌مرغ بررسی شد. مقدار آنتی‌بادی در سرم بیش از مقدار آن در زرده تخم مرغ بود که ابتدا میزان آنتی‌بادی در سرم افزایش می‌یابد و سپس در تخم‌مرغ این افزایش مشاهده می‌شود. روند افزایش آنتی‌بادی در سرم و به دنبال آن در زرده تخم‌مرغ توسط سونوو قبلا گزارش شده بود و نتایج به دست آمده را مورد تایید قرار می‌دهد (۲۰).

IgY کاملا به حرارت مقاوم است و فعالیت ایمونولوژیکی آن تحت تاثیر پاستوریزاسیون کاهش نمی‌یابد (۲۱). تفاوت فیلوژنتیکی زیادی بین گونه پستانداران و پرندگان وجود دارد. این اختلاف تکاملی سبب می‌شود آنتی‌بادی مرغی در مقایسه با آنتی‌بادی‌های پستانداران به اپی‌توپ‌های بیشتری بر روی پروتئین‌های پستانداران متصل شود. در نتیجه آنتی‌بادی‌های مرغی دارای حساسیت بالایی هستند. به طوری که تحقیقات نشان می‌دهد آنتی‌بادی مرغی ۵-۳ برابر بیشتر از آنتی‌بادی خوک به IgG خرگوش متصل می‌شود (۲۱، ۲۲).

## نتیجه‌گیری

سیستم ایمنی مرغ نسبت به آنتی‌ژن سالمونلا عکس‌العمل نشان داد و آنتی‌بادی تولید کرد. نظر به اینکه این آنتی‌بادی در تخم‌مرغ تولید می شود و عموما مردم از تخم‌مرغ استفاده می‌کنند و با توجه به نتایج این تحقیق و یافته دیگر محققن و علی‌رغم وجود واکنش متقاطع این آنتی بادی با باکتری‌های روده‌ای، این آنتی‌بادی به عنوان منبع ایمنی غیرفعال در بیماری سالمونلوز پس از بررسی کامل مورد استفاده قرار گیرد.

## تقدیر و تشکر

بدینوسیله از معاونت پژوهش دانشکده علوم و مهندسی و نیز اداره تحقیقات دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله که زمینه انجام این تحقیق را فراهم ساختند کمال تشکر را داریم.

## References

1. CDC. Preliminary FoodNet data on the incidence of foodborne illnesses-selected sites, United States, MMWR. 2000; 49: 201-205.
2. Jong Bd, Ekdahl K. The comparative burden of salmonellosis in the European Union member states, associated and candidate countries. BMC Public Health. 2006; 6: 4.
3. Slutsker L, Altekruse SF, Swerdlow DL. Foodborne diseases: emerging pathogens and trends. Infect Dis Clin North Am. 1998; 12(1): 199-216.
4. Gudmundsdottir S, Hardardottir H, Gunnarsson E. Subtyping of salmonella enterica serovar typhimurium outbreak strains isolated from humans and animals in Iceland. J Clin Microbiol. 2003; 4833-4835.
5. Lawson AJ, Desai M, Brien SJ, Davies RH, Ward1 LR, Threlfall EJ. Molecular characterisation of an outbreak strain of multiresistant Salmonella enterica serovar Typhimurium DT104 in the UK. J Clin Microbiol Infect. 2004; 10: 143-147.
6. Reilly RM, Domingo R, Sandhu J. Oral delivery of antibodies. Clin Pharmacokinet. 1998; 32(4): 313-323.
7. Smith DJ, King WF, Godiska R. Passive transfer of immunoglobulin Y antibody to Streptococcus mu-



Archive of SID
www.SID.ir

tans glucan binding protein B can confer protection against experimental dental caries. Infect Immun. 2001; 5(69): 3135-3142.
8. Xiao-liang L, Jiang-bing S, Wei-huan F. Protection of Carassius auratus Gibelio against infection by Aeromonas hydrophila using specific immunoglobulins from hen egg yolk. J Zhejiang Univ Sci B. 2006; 7(11): 922-928.
9. Kuroki M, Ikemori Y, Yokoyama H, Peralta RC, Icatlo FC, Kodama Y. Passive protection against bovine rotavirus-induced diarrhea in murine model by specific immunoglobulins from chicken egg yolk. Vet Microbiol. 1993; 37(1-2): 135-146.
10. Krüger C, Pearson SK, Kodama Y, Vacca Smith A, Bowen WH, Hammarstrom L. The effects of egg-derived antibodies to glucosyltransferases on dental caries in rats. Caries Res. 2004; 38(1): 9-14.
11. Schade R, Staak C, Hendriksen C, Erhard M, Hugl H, Koch G et al. The production of avian (egg yolk) antibodies: IgY. Altern Anim. 1996; 24: 925-934.
12. Carlander D, editor. Avian IgY Antibody In vitro and in vivo. Acta Universitatis Upsaliensis. Uppasala. 2002.
13. Van Nguyen S, Umeda K, Yokoyama H, Tohya Y, Kodama Y. Passive protection of dogs against clinical disease due to Canine parvovirus-2 by specific antibody from chicken egg yolk. Can J Vet Res. 2006; 70(1): 62-64.
14. Peralta RC, Yokoyama H, Ikemori Y, Kuroki M, Kodama Y. Passive immunisation against experimental salmonellosis in mice by orally administered hen egg-yolk antibodies specific for 14-kDa fimbriae of Salmonella enteritidis. J Med Microbiol. 1994; 41(1): 29-35.
15. Hatta H, Tsuda K, Ozeki M, Kim M, Yamamoto T, Otake S et al. Passive immunization against dental plaque formation in humans: effect of a mouth rinse containing egg yolk antibodies (IgY) specific to Streptococcus mutans. Caries Res. 1997; 31(4): 268-274.
16. Beal RK, Wigley P, Powers C, Hulme SD, Barrow PA, Smith AL. Age at primary infection with Salmonella enterica serovar Typhimurium in the chicken influences persistence of infection and subsequent immunity to re-challenge. Vet Immunol Immunopathol. 2004; 100: 151-164
17. Clifton-Hadley FA, Breslin M, Venables LM, Sprigings KA, Cooles SW, Houghton S, et al. A laboratory study of an inactivated bivalent iron restricted Salmonella enterica serovars Enteritidis and Typhimurium dual vaccine against Typhimurium challenge in chickens. Vet Microbiol. 2002; 89: 167-79.
18. Woodward MJ, Gettinby G, Breslin MF, Corkish JD, Houghton S. The efficacy of Salenvac, a Salmonella enterica subsp. Enterica serotype Enteritidis iron-restricted bacterin vaccine, in laying chickens. Avian Pathol. 2002; 31(4): 383-392.
19. Lee, EN, Sunwoo HH, Menninen K, Sim JS. In Vitro Studies of Chicken Egg Yolk Antibody (IgY) Against Salmonella enteritidis and Salmonella typhimurium. Poult Sci. 2002; 81: 632-641.
20. Sunwoo HH, Nakano T, Dixon WT, Sim S. Immune responses in chickens against lipopolysaccharide of Escherichia coli and Salmonella typhimurium. Poult Sci. 1996; 75: 342-345.
21. Hatta H, Tsuda K, Akachi S, Kim M, Yamamoto T. Productivity and some properties of egg yolk antibody (IgY) against human rotavirus compared with rabbit IgG. Biosci Biotechnol Biochem. 1993; 57(3): 450-454.
22. Olovsson M, Larsson A. Biotin labelling of chicken antibodies and their subsequent use in ELISA and immunohistochemistry. Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 1993; 16(2): 145-152.

Archive of SID



www.SID.ir