Archive of SID

ارزیابی آنتی‌بادی Y (IgY) تولید شده علیه سم بوتولینوم تایپ A در مدل حیوانی

دکتر مجتبی سعادتی [۱]، جعفر سلیمیان [۱]، فیروز ابراهیمی [۱]، دکتر میرزا خلیل بهمنی [۱]، دکتر ابوالفضل گندمی [۲]

Title: *Evaluation of antibody Y (IgY) raised against botulinum neurotoxin type A in an animal model.*

Authors: *Saadati M,(PhD); Salimyan J,(MSc); Ebrahimi F,(MSc); Bahmani MK,(PhD); Gandomi A, (PhD).*

Introduction: *The yolk of eggs laid by immunized chicken has been recognized as an important source of polyclonal antibodies. Specific antibodies produced in chicken offer several important advantages over producing antibodies in mammals. This antibody can be considered as a real alternative to the traditional antibody production in laboratory animals. The purpose of this study was to explore the influence of passive oral administration of antibody to botulinum neurotoxin type A in mouse model for therapeutic usage.*

Methods: *Chicken antibodies were obtained from the yolk eggs of chickens immunized with botulinum neurotoxin. Immunization was done with 20 µg of toxoid in incomplete ferunds adjuvant per chicken injected into breast muscle of lay. Antibody extracted from egg yolks by biochemical methods in two steps and ultracentrfugation methods. Preimmune chicken egg yolk cantaining immunoglobulin Y (IgY antibody) to C. botulinum neurotoxin was supplied in drinking water of mice one day before experiment. Then, all animals were challenged with C. botulinum neurotoxin. Mice were controlled during 120 hrs.*

Results: *Each yolk, after extraction contains about 40 mg /ml of Ig Y and specific antibodies was 20 mg/ml after purification. Our results indicated that antibody could protect mice against botulinum neurotoxin.*

Conclusion: *This is the first demonstration that IgY raised against C. botulinum neurotoxin can have a protective effect against C. botulinum toxin.*

Keywords: *Immunoglobulin Y (IgY), C. botulinum neurotoxin, ELISA.*

۱- گروه علوم زیستی، پژوهشکده علوم پایه، دانشگاه امام حسین (ع)

۲- گروه آمار و ریاضی، پژوهشکده علوم پایه، دانشگاه امام حسین (ع)

www.SID.ir

Archive of SID

چکیده:

مقدمه: *زرده تخم‌مرغ مرغ‌های ایمن شده، منبع بسیار مهمی برای تولید آنتی بادی پلی‌کلنال می‌باشد آنتی‌بادی اختصاصی تولید شده در مرغ دارای مزایای فراوانی در مقایسه با دیگر آنتی‌بادی‌های تولید شده توسط پستانداران می‌باشد. این آنتی‌بادی می‌تواند به عنوان یک جایگزین مناسب بجای آنتی‌بادی تولید شده در سایرحیوانات آزمایشگاهی مطرح باشد. هدف از این مطالعه استفاده درمانی از آنتی‌بادی تولید شده در تخم‌مرغ بر علیه سم بوتولینیوم نوع A از طریق خوراکی در موش با استفاده درمانی از آن بوده است.*

روش‌کار: *در این مطالعه آنتی‌بادی (IgY) بدست آمده از مرغ‌های ایمن شده علیه سم بوتولینوم مورد بررسی قرار گرفت. به منظور تهیه آنتی‌بادی در مرغ در سه دوره و هر بار مقدار (۲۰ µg) از توکسوئید سم بوتولینوم در ادجوان ناقص فروند، مخلوط وبه عضله سینه مرغ تخم‌گذار تزریق شد. آنتی‌بادی موجود در زرده تخم‌مرغ به وسیله روش‌های بیوشیمیایی (در دو مرحله) و اولتراسنتریفیوژ تخلیص گردید. یک روز قبل از شروع آزمایش، زرده تخم‌مرغ حاوی آنتی بادی علیه سم باکتری بوتولینوم در آب آشامیدنی موش‌های تحت مطالعه ریخته شد و وضعیت آنها در طی ۱۲۰ ساعت بعدی مورد ارزیابی قرار گرفت.*

یافته‌ها: *نتایج این تحقیق نشان داد که میزان IgY به ازای هر زرده تخم‌مرغ پس از استخراج ٤٠ میلی‌گرم و پس از تخلیص کامل میزان (IgY) ۲۰ میلی‌گرم بود. هم‌چنین نتایج بدست آمده حاکی از آن است که آنتی‌بادی می‌تواند حیوانات را در مقابل سم محافظت نماید.*

نتیجه‌گیری: *این اولین گزارشی است که نشان می‌دهد این آنتی‌بادی می‌تواند در مقابل سم بوتولینیوم اثر محافظتی داشته باشد.*

گل‌واژگان: *آنتی بادی، سم کلستریدیوم بوتولینوم، الایزا.*

مقدمه:

تیپ‌های مختلف باکتری کلستریدیوم بوتولینوم، هفت نوع نوروتوکسین تولید می‌کنند که از A تا G نامگذاری شده‌اند. این سموم از نظر ساختمانی شبیه یکدیگر بوده و دارای یک زنجیره سبک ۵۰ کیلو دالتونی ویک زنجیره سنگین ۱۰۰ کیلو دالتونی می‌باشند که به وسیله اتصالات دی‌سولفیدی به یکدیگر متصل شده و در حدود ۱۵۰ کیلو دالتون وزن دارند. سموم بوتولینیوم از لحاظ آنتی‌ژنیکی با یکدیگرمتفاوت بوده و با استفاده از روش‌های سرولوژیکی نسبت به تعیین سروتایپ آن اقدام می‌گردد. سروتایپ‌های A، B و E بیشتر در انسان و بقیه سروتایپ‌ها که شامل C، D، F وG می‌باشند بیشتر در حیوانات ایجاد مسمومیت می‌نمایند. از لحاظ فارماکولوژیک این نوروتوکسین‌ها مشابه یکدیگر عمل می‌کنند و با جلو گیری از آزادسازی استیل‌کولین از انتهای سیناپسی اعصاب، موجب فلج شل پیش رونده می‌شوند، که بیماری ایجاد شده را بوتولیسم می‌نامند (۴-۱).

عمومی‌ترین شکل بوتولیسم، بوتولیسم تغذیه‌ای می‌باشد که به علت خوردن غذای آلوده به سم بوتولینوم ایجاد می‌گردد. جهت درمان بیماران مسموم، از آنتی‌بادی تولید شده در اسب (IgG) به صورت تزریقی استفاده می‌شود. هرچند این آنتی‌بادی دارای مزایایی می‌باشد. اما دارای معایبی نیزهست. این معایب شامل: ایجاد شوک در افراد حساس، کاهش فعالیت آنتی‌بادی در طول نگهداری و آسیب به حیوان تولید کننده آنتی‌بادی می‌باشد. لذا در حال حاضر محققین به دنبال جایگزین مناسبی برای این آنتی بادی می‌باشند.

در سال‌های اخیر استفاده از آنتی‌بادی تولید شده در مرغ جهت شناسایی بعضی از عوامل بیماری‌زا (۵)، پروفیلاکسی (۶) و مصارف درمانی (۷) گزارش شده است. این آنتی بادی (IgY) به صورت خوراکی قابل استفاده بوده و در مقایسه با IgG حجم زیادی از آنتی‌بادی را می‌توان تهیه نمود (۸ و ۹).

استفاده از این آنتی‌بادی در برابر بعضی ازعوامل بیماریزا نظیر عوامل بیماری‌زای روده‌ای (۱۰)، آنتروتوکسیژنیک باکتری اشرشیا کلی (۱۱)، رتاویروس‌ها (۱۲) و شیگلا فلکسنری (۱۳) و هلیکوباکتر پایلوری (۱۴) گزارش گردیده است. گزارشات نشان می‌دهد که در حیوانات آزمایشگاهی آنتی‌بادی‌های تهیه شده

www.SID.ir

Archive of SID

می‌توانند نقش محافظتی ایفا نمایند (۱۵). مصرف خوراکی آنتی‌بادی به جای تزریق می‌تواند نقش مهمی در استفاده از آنها خصوصاً در کودکان داشته باشد. محققین پیش‌بینی می‌نمایند که بتوان با اضافه نمودن آنتی‌بادی بدست آمده از پرندگان علیه عوامل بیماریزا، به مواد غذایی نوزادان، آنها را در مقابل عوامل مورد نظر محافظت نمود (۱۶، ۱۷، ۱۸). با توجه به موارد متعدد گزارش شده در خصوص شیوع بیماری بوتولیسم در ایران، (۲۳-۱۹) هدف از تحقیق نشان دادن نقش درمانی و حفاظتی آنتی بادی IgY در حیوان آزمایشگاهی بود تا در صورت امکان پس از انجام آزمایشات لازم در انسان مورد استفاده قرار گیرد.

روش کار:

سوش باکتری کلستریدیوم بوتولینوم ازکه از بیمار جدا شده بود. با استفاده از روش‌های بیوشیمیایی مورد شناسایی قرار گرفت. پس از استحصال سم باکتری، با استفاده از آنتی‌بادی استاندارد تعیین نوع گردید.

کشت باکتری: کلستریدیوم بوتولینوم نوع A ابتدا به مدت یک شب در ۳۵ درجه سانتیگراد در محیط کشت Cooked Meat در شرایط بی‌هوازی، غنی سازی وسپس به محیط PYG (۲٪ پروتئوز پپتون ،۱٪ گلوکز، ۱٪ عصاره مخمری pH ۷/۴) تلقیح گردید و به مدت ۷۲ ساعت در گرمخانه ۳۵ درجه سانتیگراد قرار داده شد.

الکتروفورز SDS-PAGE: با استفاده از روش Laemli الکتروفورز سدیم دودسیل سولفات پلی‌آکریل آمید ژل الکتروفورز انجام شد. ژل ۱۰ درصد استفاده گردید و نمونه‌ها به مدت ۳ دقیقه در بافر نمونه جوشانده شدند. الکتروفورز در ۱۰۰ ولت به مدت ۴-۳ ساعت انجام شد پس از آن ژل با کوماسی بلو رنگ‌آمیزی شد (۲۴).

تخلیص پروتئین: پس از رشد باکتری و تولید پروتئین، تخلیص پروتئین با استفاده از روش Sugii و Sakaguchi در سال ۱۹۷۵، Cardella و همکاران در سال ۱۹۶۰، Miyazaki و همکاران در سال ۱۹۷۷ و Oguma و همکاران در سال ۱۹۸۰ انجام شد (۴، ۲۵، ۲۶ و ۲۷).

تعیین میزان پروتئین: از روش Lowry جهت سنجش میزان پروتئین در نمونه‌ها استفاده شد (۲۸).

تعیین LD_{50}: به منظور تعین LD50 نمونه‌های توکسین، با استفاده از روش بیو اسی در موش(Mouse Bioassay) میزان سمیت آن تعیین گردید (۲۳). در این روش رقت‌های ده برابر از سم در بافر فسفات ۰/۰۲ مول حاوی ۰/۰۲٪ ژلاتین با pH=۶/۵ تهیه و ۰/۵ میلی‌لیتر از آن به داخل صفاق موش آزمایشگاهی تزریق شد (برای هر رقت یک گروه چهارتایی در نظر گرفته شد) موش‌ها برای مدت ۴ روز تحت نظر بودند و مرگ و میر آنها ثبت گردید.

تهیه توکسوئید: غلظت ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از سم در فسفات بافر ۰/۰۱ (pH=۷) تهیه و به آن فرمالدئید تا غلظت ۰/۶٪ افزوده شد. پس از گذشت ۲۰ روز، از نمونه تهیه شده به داخل صفاق موش تزریق گردید، تا از سم‌زدایی کامل اطمینان حاصل گردد. جهت زدودن فرمالدئید از توکسوئید، دیالیز نمونه در برابر فسفات بافر ۰/۰۱ مولار (pH=۷) به مدت یک شب انجام شد (۴، ۲۵ ، ۳۰، ۳۱).

تهیه آنتی بادی علیه سم بوتولینوم در مرغ:

به منظور تهیه آنتی‌توکسین در مرغ، مقدار۲۰ میکروگرم از توکسوئید در ادجوانت کامل فروند به حالت سوسپانسیون در آورده و سپس به عضله سینه مرغ تخم‌گذار تزریق گردید. به منظور افزایش تیتر آنتی بادی، چهار مرتبه و با فاصله زمانی هر دو هفته یکبار مقدار ۲۰ میکروگرم از توکسوئید به همراه ادجوانت ناقص فروند در همان ناحیه تزریق گردید. جهت بررسی تیتر آنتی‌بادی قبل از هر تزریق، خون‌گیری از مرغ به عمل می‌آمد. پس ازتزریق سوم، تخم‌مرغ‌های ایمن شده جمع‌آوری و در ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شدند (۳۴-۳۲).

تخلیص آنتی‌بادی(IgY): جهت استخراج و تخلیص آنتی‌بادی، ابتدا زرده تخم‌مرغ از سفیده به طور کامل جدا و همژنیزه گردید. سپس ۱۰۰ میلی‌لیترکلروفرم سرد (منهای۲۰درجه سانتیگراد) به آن افزوده شد. پس از تشکیل دو فاز، فاز زیرین را دور ریخته و این مرحله دوباره تکرار شد. پس از آن به فاز رویی ایزوپروپانول سرد (۱۰۰cc) اضافه کرده، در این مرحله فاز رویی را دور ریخته، رسوب جمع‌آوری و به آن استون سرد (۵۰cc) افزوده، آن را در کاغذ صافی پخش کرده تا پودر کاملاً خشک شد. آنگاه به این پودر PBS (۵۰cc) افزوده و یک ساعت در دمای محیط (در حالی که مرتباً توسط مگنت بهم می‌خورد) قرار داده شد. در مرحله بعدی نمونه را در ۳۰۰۰۰rpm سانتریفوژ و محلول رویی جدا سازی گردید. محلول فوق که حاوی IgY است لیوفیلیزه شد.

تست الایزا:

واکنش آنتی‌بادی مرغ (IgY) با نوروتوکسین بوتولینوم نوع A به کمک روش الایزا بررسی شد. بدین منظور ابتدا هر چاهک

www.SID.ir

Archive of SID

از میکروپلیت با ۱۰۰ میکرولیتر از نوروتوکسین (غلظت ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر درکربنات – بی‌کربنات بافر ۰/۰۵ M (pH 9.6)) پوشانده و در ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت یک شب قرار داده شد. پس از زمان فوق میکروپلیت سه دفعه با بافر PBST (PBS با pH 7.4 حاوی ۰/۰۵ درصد توئین ۲۰) شستشو داده شد. سپس چاهک‌های میکروپلیت با ۱۰۰ میکرولیتر بافر PBSTG (PBST حاوی ۲ درصد ژلاتین) بلاک گردید و میکروپلیت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت قرار گرفت. پس از شستشوی میکروپلیت، سرم مرغ و یا زرده تخم‌مرغ در چاهک‌های مربوطه در بافر PBST در حجم ۱۰۰ میکرولیتر تهیه و ریخته شد و مجدداً میکروپلیت به مدت یک ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرارداده شد. پس از شستشو، ۱۰۰ میکرولیتر از کانژوگه (antiIgY) در رقت ۱/۳۰۰۰ اضافه و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت یک ساعت قرار گرفت. در نهایت به دنبال شستشو، ۱۰۰ میکرولیتر از محلول سوبسترا به چاهک اضافه شد و اجازه داده شد تا واکنش طی مدت ۲۰ دقیقه کامل شود. واکنش با اسید سولفوریک ۱ مولار متوقف و جذب در طول موج ۴۹۰ نانومتر به کمک دستگاه الایزا ریدر خوانده شد.

بررسی اثر آنتی‌بادی تولید شده در موش: تعداد ۹۶ موش به وزن ۱۸ تا ۲۲ گرمی تهیه و در ۴ گروه ۲۴ تایی قرار داده شد. موش‌ها به مدت ۲۴ ساعت در ۴ قفس مجزا تحت کنترل بودند. قبل از شروع آزمایش موش‌ها بمدت ۲۴ ساعت گرسنه نگهداری شدند. پس از زمان فوق تنها آب در اختیار موش‌های قفس اول و قفس چهارم، زرده تخم مرغ فاقد آنتی‌بادی علیه سم بوتولینوم (تخم‌مرغ معمولی) در اختیار موش‌های قفس دوم و زرده تخم مرغ حاوی آنتی‌بادی علیه سم بوتولینوم در اختیار موش‌های قفس سوم قرار داده شد. پس از ۲۴ ساعت غذای آلوده به سم بوتولینوم در اختیار تمام موش‌های موجود در قفس‌های شماره یک، دو و سه قرار داده شد و وضعیت آنها در طی ۲۴ ساعت بعدی مورد ارزیابی قرار گرفت. جهت کنترل، غذای سالم در اختیار موش‌های قفس شماره چهار قرار داده شد.

در این تحقیق جهت انجام کارهای آماری از P-value و آزمون Z استفاده شده است و با کمک نرم‌افزار SPSS عملیات محاسباتی آن انجام گردید.

یافته‌ها:

پس از شناسایی باکتری با استفاده از روش‌های شیمیایی، میزان و فعالیت سم تولید شده مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج مربوط به میزان پروتئین، فعالیت سم (LD_{50}) و سمیت ویژه مراحل مختلف تخلیص در جدول شماره یک نشان داده شده است. میزان سمیت ویژه محیط کشت برابر با ۰/۲۵ بودکه با ترسیب اسیدی این میزان به ۰/۶ رسید. استخراج سم به وسیله آب مقطر سمیت ویژه را افزایش داده و مقایسه فعالیت سم بدست آمده ازطریق استفاده از سولفات آمونیوم و نیز DEAE سلولز نشان داد که تفاوت بین آن دو روش پس از تخلیص بسیار زیاد می‌باشد. مقایسه بین سمیت ویژه سم تخلیص شده از محیط کشت و DEAE سلولز نشان می‌دهد که سمیت ویژه سم۶۰۰ برابر افزایش یافته است. مقدار نوروتوکسین باز یافت شده در پایان تخلیص چهار میلی‌گرم به ازای ۵ لیتر محیط کشت بود (جدول ۱).

به منظور نشان دادن وزن مولکولی سم بوتولینوم با وزن مولکولی ۱۰۰ کیلو دالتون، ستون ۳ IgY با وزن مولکولی ۱۸۰ کیلو دالتون و ستون ۴ مارکر های پروتئینی مراحل مختلف

جدول ۱- مقادیر اندازه گیری شده (میزان پروتئین و فعالیت سمیت)

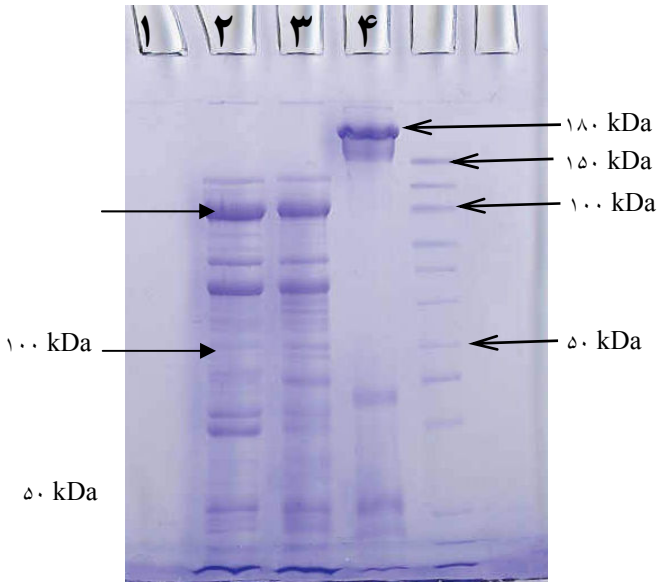
نمونه	حجم ml	پروتئین mg/ml	پروتئین کل mg	LD_{50} Unit/ml	سمیت ویژه
کشت باکتری	۵۰۰۰	۴	۲۰۰۰۰	$۱*۱۰^{-۶}$	۰/۲۵
رسوب اسیدی	۲۵۰	۲۵	۶۲۵۰	$۱/۵*۱۰^{-۷}$	۰/۶
استخراج با آب مقطر	۵۰۰	۳/۵	۱۷۵۰	$۵*۱۰^{-۶}$	۱/۴۳
سوسپانسیون رسوب	۲۵	۱۲/۷۵	۳۱۸	$۲/۵*۱۰^{-۷}$	۱/۹۶
استخراج بافری	۲۰۰	۱/۳	۲۶۰	$۳*۱۰^{-۶}$	۲/۳
رسوب سولفات آمونیوم	۲۵	۴/۳	۱۰۷/۵	$۴*۱۰^{-۷}$	۹/۳
ستون G200	۱۰۰	۱/۳۵	۱۳۰	$۱/۵*۱۰^{-۷}$	۱۱/۵
سلولز DEAE	۱۰	۰/۴	۴	$۴*۱۰^{-۷}$	۱۵۰

www.SID.ir

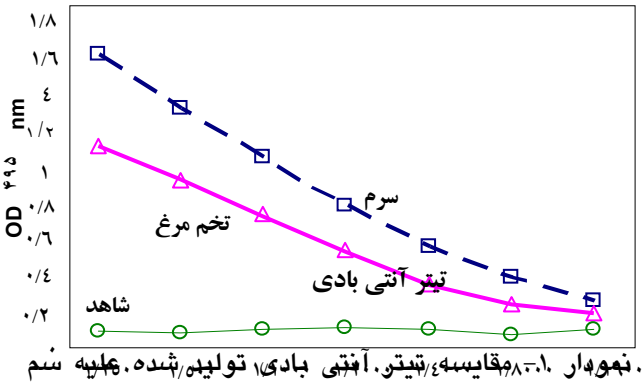
Archive of SID

تخلیص پروتئین با استفاده از روش‌های شیمیایی انجام و میزان فعالیت آن مورد ارزیابی قرار گرفت (شکل ۱). نتایج مربوط به میزان پروتئین، فعالیت (LD_{50}) و سمیت ویژه در جدول ۱ مورد بررسی قرار گرفته است.

SDS-PAGE
ژل الکتروفورزپلی آکریلامید(۸ ٪)



تصویر ۱- ستون ۱ و ۲ سم بوتولینیوم با وزن مولکولی ۱۰۰ کیلو دالتون، ستون ۳ IgY با وزن مولکولی ۱۸۰ کیلو دالتون و ستون ۴ مارکر های پروتئینی



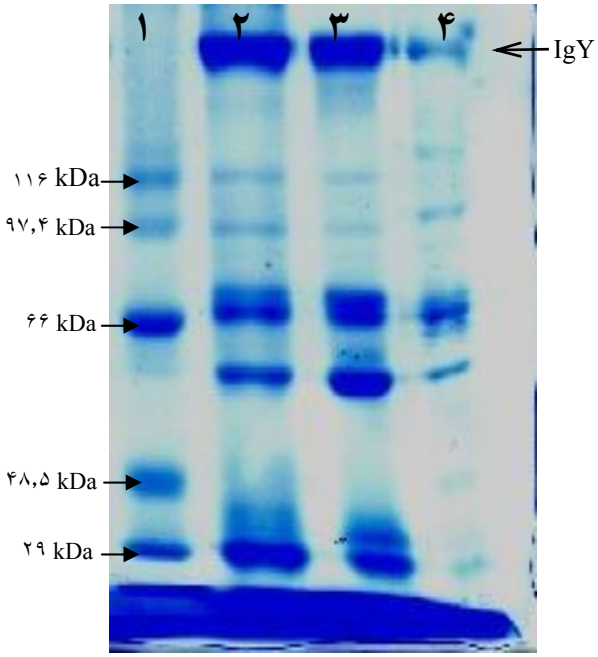
نمودار ۱- مقایسه تیتر آنتی بادی تولید شده علیه سم بوتولینوم در سرم و زرده تخم مرغ با سیستم الیزا

میزان تولید آنتی‌بادی در سرم مرغ و زرده تخم‌مرغ مورد بررسی قرار گرفت که تولید آنتی‌بادی در سرم بیش از میزان آن

در تخم‌مرغ پس از هر تزریق بوده است. در نمودار ۱ تیتر آنتی‌بادی را پس از آخرین تزریق توکسوئید در سرم و تخم‌مرغ نشان می‌دهد. میزان آنتی بادی در سرم ۱/۵ برابر بیش از آنتی‌بادی بدست آمده در تخم‌مرغ می‌باشد.

جهت تخلیص IgY روش‌های مختلفی ارایه شده است. در این تحقیق به این منظور، IgY با استفاده از حلال آلی و سولفات آمونیوم تخلیص و نیز با اولتراسانتریفوژ تخلیص گردید. نتایج بدست آمده نشان می‌دهد که در روش اولتراسانتزیفوژ میزان زیادی از IgY در هنگام تخلیص در مقایسه با دو روش دیگر کاهش یافته و روش اولتراسانتزیفوژ جهت تخلیص IgY مناسب نمی‌باشد (تصویر ۲).

SDS-PAGE
ژل الکتروفورزپلی آکریلامید (۸ ٪)



تصویر ۲- ستون ۱ مارکرهای پروتئینی، ستون‌های شماره ۲ و ۳ IgY تخلیص شده با حلال آلی و سولفات آمونیوم، ستون ۴ IgY تخلیص شده با اولتراسانتریفوژ

اثر درمانی آنتی بادی تولید شده در موش:

در طی آزمایش، موش‌ها تحت کنترل بوده و پس از در اختیار قرار دادن سم به صورت خوراکی علایم و رفتار حیوانات ثبت گردید. همه موش‌ها پس از ۲۴ ساعت سالم بوده و هیچ

www.SID.ir

Archive of SID

گونه علایم بیماری را نشان ندادند. پس از گذشت ۴۸ ساعت از شروع آزمایش علایم بوتولیسم در موش‌های قفس شماره ۱ و ۲ مشاهده شد. این علایم پس از ۷۲ ساعت شدیدتر گردید. در همین زمان هیچگونه علائم بیماری در موش‌های قفس شماره ۳ و ۴ مشاهده نگردید. سم پس از ۹۶ ساعت منجر به مرگ ۱۷ موش از قفس شماره ۱ و ۱۵ موش از قفس شماره ۲ گردید. پس از ۱۲۰ ساعت تمامی موش‌ها مورد آزمایش در قفس شماره ۱ و۲ در اثر مصرف سم تلف شدند. تنها ۴ موش از قفس شماره ۳ که زرده تخم‌مرغ حاوی آنتی‌بادی بر علیه سم مصرف نموده بودند پس از زمان فوق مردند. همگی موش‌ها در قفس شماره ۴ در طی زمان آزمایش زنده ماندند.

به کمک آزمون z مشخص گردید که آنتی‌بادی از مرگ زود هنگام موش‌هایی که سم استفاده نموده‌اند جلوگیری کرده است ($P<۰/۰۰۱$). نتیجه این آزمون نشان می‌دهد که آنتی‌بادی تولید شده در مرغ می‌تواند اثر سود بخشی زنده ماندن موش‌ها را ارتقاء دهد.

بحث:

جهت درمان مسمومیت‌های ناشی از سم بوتولینوم می‌توان از ایمونوگلوبولین تولید شده به روش‌های مختلف استفاده نمود. اولین آنتی‌بادی که مورد استفاده قرار گرفت، آنتی‌بادی تولید شده در اسب بود که علیه نوع A این سم تولید گردید. بعدها به دلیل تسریع در درمان مسمومین، آنتی بادی بر علیه تیپ‌های A، B و E تهیه گردید. آنتی‌بادی تولید شده از طریق تزریق مورد استفاده قرار می‌گیرد. این آنتی‌بادی می‌تواند سمومی که در جریان خون وجود دارد و هنوز به گیرنده‌های سلولی متصل نشده‌اند را خنثی نماید. یکی دیگر از آنتی‌بادی‌هایی که می‌تواند در درمان مسمومیت‌ها مورد استفاده قرار گیرد، آنتی‌بادی تولید شده در مرغ می‌باشد. حضور این آنتی‌بادی در خون و تخم‌مرغ قابل ردیابی است. حضور آنتی‌بادی در زرده تخم‌مرغ، سبب می‌شود تا بتوان آن را از طریق خوراکی مورد استفاده قرار داد. هرچند این آنتی‌بادی ممکن است پس از مصرف خوراکی در معده به وسیله آنزیم‌های معده از جمله: پروتئازها، پپسین، تریپسین و کموتریپسین تحت تأثیر قرار گرفته و تجزیه گردد (۳۵)، لیکن مطالعات نشان می‌دهد که بخشی از این آنتی‌بادی دست نخورده باقی مانده و این قسمت توانایی اتصال به آنتی ژن را دارا می‌باشد (۳۶). Copelan و همکارانش در سال ۱۹۹۴فعالیت این آنتی‌بادی را در مدفوع با توجه به تجزیه آن در دستگاه گوارش، گزارش نموده‌اند (۳۷).

استفاده از IgY جهت پیشگیری در حیوانات از جمله ماهی هم مورد توجه محققین بوده است. مصرف خوراکی و یا تزریقی این آنتی بادی که بر علیه باکتری *Vibrio anguillarum* تهیه شده توانسته است در جلوگیری از ایجاد بیماری ویبریوزیس کمک مؤثری نماید (۳۸). تحقیقات فراوانی جهت استفاده از آنتی‌بادی مرغی به منظور استفاده درمانی در دیگر کشورها صورت پذیرفته است (۴۱-۳۹)، اما در ایران این اولین کار تحقیقاتی است که گزارش می‌شود. درمطالعاتی که توسط و همکارانشان در سال ۲۰۰۴ انجام شد. مشخص گردید که آنتی‌بادی تولید شده در مرغ علیه انواع باکتری‌هایی که در ایجاد التهاب حلق دخالت دارند علاوه بر نداشتن عوارض جانبی، می‌تواند در درمان بیماری گلو درد حاد و مزمن مورد استفاده قرار گیرد (۴۲). این در حالی است که در درمان بیماران علیه باکتری *P.aeruginosa* نشان داده شد که مصرف روزانه زرده تخم‌مرغ حاوی آنتی‌بادی علیه باکتری *P.aeruginosa* به مدت طولانی مشکلی برای بیمار تحت درمان ایجاد ننموده است (۴۳).

از این آنتی‌بادی جهت جلوگیری از ایجاد پلاک‌های دندانی نیز استفاده شده است. Zhou و همکارانش در سال ۲۰۰۳ نشان دادند که این آنتی‌بادی می تواند از استقرار باکتری استرپتوکوکوس در دندان جلوگیری به عمل آورد (۴۴).

تولید آنتی‌بادی در مرغ دارای مزایای زیادی است. از جمله این مزایا تولید مقادیر فراوان آنتی‌بادی در این روش می‌باشد. با توجه به روش تخلیص ذکر شده در بالا به ازای هر زرده تخم‌مرغ ۴۰ میلی‌گرم آنتی‌بادی تخلیص گردید که در عرض یک ماه، ۱/۵-۱/۲ گرم آنتی‌بادی خواهیم داشت. در ضمن، این آنتی‌بادی کمپلمان سرم پستانداران را فعال نمی‌سازد و با روماتوئید فاکتور و FC رسپتورهای موجود در سرم پستانداران و بر روی باکتریها واکنش نمی‌دهد.

مقایسه تولید آنتی‌بادی در سرم مرغ و تخم‌مرغ حاکی از آن است که میزان تولید آنتی‌بادی در سرم بیشتر از تخم مرغ می‌باشد. این نتیجه مشابه نتایج بدست آمده توسط Chang و همکاران در سال ۲۰۰۲ می‌باشد که میزان آنتی‌بادی در سرم علیه اوره‌آز تولید شده توسط باکتری هلیکوباکترپیلوری بسرعت افزایش یافته و پس از ۵ تزریق به حداکثر خود رسیده است (۴۵). هر چند الگوی افزایش آنتی بادی در سرم و تخم‌مرغ مشابه بوده، ولی مقدار آنتی‌بادی در سرم بیش از تخم‌مرغ بوده است.

این اختلاف در تولید آنتی بادی در سرم و زرده تخم‌مرغ در اولین تزریق در برابرسروتایپ C باکتری *Streptococcus*

www.SID.ir

Archive of SID

mutans بسیار کم بوده است (۴۶). این نتایج می‌تواند بـه دلیـل اختلاف در وزن مولکولی آنتی ژن، روش تزریق و یا حیوان مورد آزمایش باشد (۵۰-۴۷).

این آنتی‌بادی (IgY) به صورت خوراکی قابل استفاده بوده و در مقایسه با IgG (۲۰۰ میلی‌گرم در ماه با تقریبا ۵٪ آنتی‌بـادی اختصاصی می‌توان IgG تهیه نمود).

راندمان تخلیص در حدود ۱۵۰۰ میلی‌گرم IgY بـا ۲ تـا ۱۰ درصد آنتی‌بادی اختصاصی در هر ماه می‌توان تهیه نمود (۸). در این روش حدود ۲ میلی‌گرم برای هر تخم‌مرغ (حدود ۸ میلی‌لیتر زرده کامل) بوده که میزان IgY به ازای هر زرده تخم‌مرغ پـس از استخراج ۴۱ میلی‌گرم بود و وزن ملکولی آن ۱۶۸ کیلو دالتون برآورد گردید.

همـانطور کـه در نتـایج، گـزارش گردیـد در طـی آزمـایش موش‌ها همه تحت کنترل بوده و علایم و رفتـار حیوانـات ثبـت می‌گردید. از آنجا که سرعت جذب سـم در دسـتگاه گـوارش در مقایسه با روش تزریقی آن بسیار کم می‌باشد، پس از ۲۴ ساعت همگی موش‌ها سالم بوده و هیچ‌گونه علایـم بیمـاری را نـشان ندادند. کاهش و یا افزایش این زمان می‌تواند وابسته بـه میـزان سم مورد استفاده باشد و علایم مسمومیت را درحیـوان مـشاهده نمود. پس از ۴۸ ساعت علایم بوتولیـسم در مـوش‌هـای قفـس شماره ۱ و ۲ مشاهده شد و این علائم پس از ۷۲ ساعت شدیدتر گردید. در همین زمان هیچ‌گونه علایم بیماری در قفـس شـماره ۳و ۴ مشاهده نگردید. سم پس از ۹۶ ساعت منجر به مـرگ ۱۷ موش از قفس شماره ۱ و ۱۵ مـوش از قفـس شـماره ۲ گردیـد. پس از ۱۲۰ ساعت همگی موش‌ها در اثـر سـم مردنـد. تنهـا ۴ موش از قفس شماره ۳ پس از ۱۲۰ سـاعت مردنـد کـه ممکـن است به دلیل حساسیت بیشتر این حیوانات به سم بوده باشد. هر چند که استفاده IgY در درمان کامل بیماری بوتولیسم هنـوز در دست بررسی می‌باشد، با اطلاعات موجود می‌توان گفت که ایـن آنتی‌بادی می‌تواند قبل از بروز مسمومیت بـه عنـوان پیـشگیری مورد استفاده قرار گیرد، این در حالی است کـه مکانیـسم انتقـال IgY از دستگاه گوارش به داخل خون جهت جلـوگیری از اثـرات سم هنوز ناشناخته است.

References:

1- Doellgast G, Triscott M. Enzyme linked immunosorbent assay- Enzyme-Linke coaggulation assay for detection of antibodies to Clostridium botulinum neurotoxins A, B and E and solution phase complexes. J Clin Mic 1994; 32(3): 851-3.

2- Ekong T, Mclellan k, Sesardic D. Immunologycal detecton of Clostridium botulinom toxin type A in therapeutic preparation. J Immunological method 1995; 180: 181-91.

3- Hallis B, James B, Shone C. Development of novel assay for botulinum type A and B neurotoxin based their endopeptidase activities. J Clin Mic 1996; 34(8): 1934-8.

4- Sugii S, Sakaguchi G. Molecular constraction of Cloctridium botulinum type A toxins" Infect Immun. 1975; 12: 1262-70.

5- de Almeida CM, Quintana-Flores VM, Medina-Acosta E, et al. Egg yolk anti-BfpA antibodies as a tool for recognizing and identifying enteropathogenic Escherichia coli. Scand J Immunol 2003 Jun; 57(6): 573-82.

6- Mine Y, Kovacs-Nolan J. Chicken egg yolk antibodies as therapeutics in enteric infectious disease: a review.J Med Food 2002; 5(3): 159-69.

7- Kruger C, Pearson SK, Kodama Y, et al. The effects of egg-derived antibodies to lucosyltransferases on dental caries in rats. Caries Res. 2004; 38(1): 9-14.

8- Schade R, Staak C, Hendriksen C, et al. The production of avian (egg yolk) antibodies: IgY. Alternat Lab Anim 1996; 24: 925-34.

9- Warr GW, Magor KE, Higgins DA. IgY: clues to the origins of modern antibodies. Immunol Today 1995; 16(8): 392-8.

10- Mietens C, Keinhorst H, Hilpert H, et al. Treatment of infantile E. coli gastroenteritis with specific bovine anti-E. coli milk immunoglobulins. Eur J Ped 1979; 132(3): 239-52.

11- Tacket CO, Losonsky G, Link H, et al. Protection by milk immunoglobulin concentrate against oral challenge with enterotoxigenic Escherichia coli. New Engl J Med 1988; 318(19): 1240-1.

12- Hilpert H, Brussow H, Mietens C, et al. Use of bovine milk concentrate containing antibody to rotavirus to treat rotavirus gastroenteritis in infants. J Infect Dis 1987; 156(1): 158-66.

13- Tacket CO, Binion SB, Bostwick E.et al. Efficacy of bovine milk immunoglobulin concentrate in preventing illness after Shigella flexneri challenge. Amer J Trop Med Hyg 1992; 47(3): 276-83.

14- Shin JH, Roe IH, Kim HG. Production of anti-Helicobacter pylori urease-specific immunoglobulin in egg yolk using an antigenic epitope of H. pylori urease. J Med Microbiol 2004 Jan; 53(Pt 1): 31-4.

15- Shin NR, Choi IS, Kim JM., et al. Effective methods for the production of immunoglobulin Y using immunogens of Bordetella bronchiseptica, Pasteurella multocida and Actinobacillus pleuropneumoniae. J Vet Sci 2002 Mar; 3(1): 47-57.

16- Goldman AS. Immunologic supplementation of cows milk formulation. Bull Int Dairy Fed 1989; 244(1): 38-43.

17- Facon M, Skura BJ, Nakai S. Potential for immunological supplementation of foods. Food Agric Immunol 1993; 5(1): 85-91.

18- Larsson A, Carlander D. Oral immunotherapy with yolk antibodies to prevent infections in humans and animals. Ups J Med Sci 2003; 108(2): 129-40.

www.SID.ir

Archive of SID

19- Poartaghva M, Machoun A, Fatollah-zadeh Khaleghdoust A. et al. Let botulisme en Iran: Med Mal Infect 1975; 5: 536.
20- Pourshafie Mr, Saifee M, Shafiee A, et al. An outbreak of food botulism associated with contaminated locally made cheese in Iran. Scand J Infect Dis 1998; 30(1): 92-4.
21- Rouhbakhsh-khaleghdoust A. The incidence of Clostridium botulinum type E in fish and bottom deposits in Caspian Sea coastal waters. Pahlavi Med J 1975; 6: 55.
22- Rouhbakhsh- Khaleghdoust A, Pourtaghva M. A large outbreak of type E botulism in Iran. Trans R Soc Trop Med Hyp 1977; 71: 444.
۲۳- پورشفیع، م. شفیعی، ا. وحدانی، پ. سلیمیان، ج. اصلانی، م. سیفی، م. سعادتی، م. "آلودگی با سم بوتولیسم در اهالی لوشان ورود بار پس از مصرف پنیر محلی" نبض ۱۳۷۶؛ شماره اول سال هفتم.
24- Laemli UK. Cleavage of structural proteins during assembly of the head bacteriophage T4. Nature 1970; 227: 68-5.
25- Cardella M, Daff J, Wingfield B. Studies on immunity to toxin of Clostridium botulinum: purification and detoxification of type D toxin and the immunological response to toxoid. J Bacteriol 1960; 79: 372-8.
26- Miyazaki S, Iwasaki M, Sakaguchi G. Closterdium botulinum type D toxin: purification, molecular structure and some immanological properties. Infect Immun 1977; 17(2): 395-401.
27- Oguma K, Syuto B, Iida H. Antigenic similarity of toxins produced by Clostridium botulinum type C and D strains. Infect Immun 1980; 30(3): 656-60.
28- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, et al. Protein measurment with the folin phenol reagent. J Biol Chem 1951; 193: 265-75.
29- Reed CJ, Muench H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. Am J Hyj 1938; 27: 493-7.
30- Heimsch RCC, champion LA, Sugiyama H. Botulinal toxin and toxoid as antigens. Prec Soc Exp biol med 1970; 135: 151-4.
31- Wright G, Duff J, Fiock M, et al. Studies on immunity to toxins of Clostridium botulinum: detoxification of purified type A and B toxins and the antigenicity of univalent and bivalent aluminum phosphate adsorbed toxoieds. J Immunol 1960; 84: 38409.
32- Larsson A. Chiken antibodies: taking advantage of evolution: A review. Poultry Sciences 1993; 72: 1807-12.
33- Roschade R, Staak C, Hendriksen C. The production of Avian (egg yolk) antibodies: IgY. ATLA 1996 24:925-34.
۳۴- ابراهیمی، ف. سلیمیان، ج. سعادتی، م. "تخلیص سریع آنتی بادی مرغی ضد نوروتوکسین بوتولینوم تایپ A توسط HPLC"خلاصه مقالات ششمین کنگره بیوشیمی ۱۳۸۰.
35- Reilly RM, Domingo R, Sandhu J. Oral delivery of antibodies. Future pharmacokinetic trend. Clin Pharmacokinet 1997; 32(4): 313-23.
36- Akita EM, Li-Chan EC, Nakai S. Neutralization of enterotoxogenic Eschricia coli heat –labile toxin by chicken egg yolk immunoglobulin Y and its antigen-binding fragments. Food Agricult Immunol 1998; (10): 161-72.
37- Copelan EA, Bechtel TP, Klein JL, et al. Controlled trial of orally administered immunoglobulin following bone marrow transplantation. Bone Marrow Transplant 1994; 13(1): 87-91.
38- Nikoo Arasteha, Aminirisseheib AH, Yousifa AN, et al. Passive immunization of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) with chicken egg yolk immunoglobulins (IgY) Aqriculture 2004; 231 23–36.
39- Kim WK, Patterson PH. Production of an egg yolk antibody specific to microbial urease and its inhibitory effects on urease activity. Poult Sci. Oct 2003; 82(10): 1554-8.
40- Shin JH, Nam SW, Kim JT, et al. Identification of immunodominant Helicobacter pylori proteins with reactivity to H. pylori-specific egg-yolk immunoglobulin. J Med Microbiol 2003; 52(3): 217-22.
41- Shin JH, Yang M, Nam SW, et al. Use of egg yolk-derived immunoglobulin as an alternative to antibiotic treatment for control of Helicobacter pylori infection. Clin Diagn Lab Immunol. 2002 Sep; 9(5): 1061-6.
42- Xie MQ, Meng YX, Li ZH, et al. Effect of specific immunoglobulin Y in the treatment of acute and chronic pharyngitis. Zhonghua Er Bi Yan Hou Ke Za Zhi 2004; 39(2): 112-5
43- Larsson A, Carlander D. Oral immunotherapy with yolk antibodies to prevent infections in humans and animals. Ups J Med Sci 2003; 108(2): 129-40.
44- Zhou Z, Zhou R, Tang Z. Effects of topical application of immunoglobulin yolk on mutans streptococci in dental plaque. Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi 2003; 21(4): 295-7.
45- Chang HM, Lee YC, Chen CC, et al. Microencapsulation protects immunoglobulin in yolk (IgY) specific against Helicobacter pylori urease. J Food Science 2002; Vol. 67, Nr. 1,
46- Chang HM, Ou-Yang RF, Chen YT, et al. Productivity and some properties of immunoglobulin specific against Streptococcus mutans serotype C in chicken egg yolk (IgY) J Agric Food Chem 1999; 47(1): 61-6
47- Czinn SJ, Nedrud JG. Oral immunization against Helicobacter pylori. Infect Immun 1991; 59(7): 2359-63.
48- Cuenca R, Blanchard TG, Czinn SJ, et al. Therapeutic immunization against Helicobacter mustelae in naturally infected ferrets. Gastroenterology 1996; 110(6): 1770-5.
49- Lee C, Weltzin R, Thomas WD. Oral immunization with recombinant Helicobacter pylori urease induces secretary IgA antibodies and protects mice from challenge with Helicobacter felis. J Infect Dis 1995; 172(1): 161-72.
50- Chang HM, Lu TC, Chen Ccet al. Isolation of immunoglobulin from egg yolk by anionic polysaccharides. J Agric Food Chem 2000; 48(4): 995-9.

www.SID.ir