

تولید و به کارگیری مؤثر آنتی بادی اختصاصی زرده تخم مرغ (IgY) برای مهار باکتری استافیلوکوکوس اورئوس

فریما علی اکبری^۱، سید امیر حسین مهدوی^{۲*} و حمیدرضا رحمانی^۳

۱، ۲ و ۳. دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشیار و استاد گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۲/۱۶ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۲/۲۴)

چکیده

این بررسی به منظور ارزیابی ویژگی‌های ایمنی (ایمونوشیمیایی و نیز تأثیر مهارکنندگی پودر پادتن (آنتی بادی) اختصاصی و غیراختصاصی زرده تخم مرغ بر رشد باکتری استافیلوکوکوس اورئوس، به عنوان یکی از مهم‌ترین سروتپ‌های استافیلوکوکوس بیماری‌زای انسانی و دامی در شرایط پرونتی انجام شد. این آزمایش با بهره‌گیری از شانزده قطعه مرغ تخم‌گذار لگهورن سفید سویه‌های لاین W-۳۶ که در سن ۴۰ هفتهگی قرار داشتند صورت گرفت. برای ایمن کردن پرندگان، پس از بررسی منحنی رشد میکروب و کشت آن‌ها تا پایان مرحله رشد تصاعدی، واکسن کشته شده با بهره‌گیری از امواج فراصوت تهیه و تزریق شد. پس از گردآوری تخم‌مرغ‌ها در یک دوره زمانی ۸ هفته، IgY با بهره‌گیری از روش پولسون جداسازی و یخ خشکانی^۱ شد و در ادامه ویژگی‌های ایمنی شیمیایی و ضد باکتریایی آن سنجش شد. نتایج بیانگر آن است که پس از نخستین ایمن‌سازی، فعالیت اختصاصی پادتن علیه باکتری مورد آزمون در پلاسماهای مرغ‌های تخم‌گذار و تخم‌مرغ افزایش یافت و این افزایش در دوره آزمایش در سطوح بالا حفظ شد ($P < 0/01$). غلظت IgY و نیز درصد خلوص آن در پودر پادتن اختصاصی ۷۱ درصد بالاتر ($P < 0/05$) از پودر آنتی بادی 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 مرحله (فاز) لگاریتمی متعلق به سطح ۲۰۰ میلی‌گرم پودر پادتن اختصاصی بود که توانست سبب کاهش $1/2 \log \text{CFU/mL}$ در مقایسه با گروه شاهد (کنترل) شود ($P < 0/01$). لذا این یافته‌ها بیانگر آن است که باکتری استافیلوکوکوس اورئوس به همراه 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 بازده بالا، برای به دست آوردن IgY اختصاصی با درصد خلوص و توان ضدباکتریایی (آنتی باکتریال) مطلوب است.

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

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

Farima Aliakbari¹, Amir Hossein Mahdavi^{2*} and Hamid Reza Rahmani³

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 $1.20 \log \text{CFU/mL}$ ($P < 0.01$). 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

مقدمه

باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* (*Staphylococcus aureus*) یکی از بیماریزا (پاتوژن)های فرصت طلب مهم در حوزه سلامت انسان و دام به شمار می آید. این باکتری علت شایع عفونت های بیمارستانی و نیز دامنه گستره ای از دیگر عفونت ها همچون مشکلات شایع پوستی (مانند جوش و آبه) تا بیماری های تهدیدکننده پنومونی، اندوکاردیت و مسمومیت غذایی است. افزون بر آن، این باکتری یکی از مهم ترین عامل های بروز ورم پستان در گاوهای شیری بوده که هزینه های فراوانی را برای درمان پادزیستی (آنتی بیوتیکی) آن و کاهش کیفیت شیر تولیدی در گله ها اعمال می کند (Leslie & Clem, 1969; Haran et al., 2012). شیوع بالای بیماری های ناشی از *استافیلوکوکوس اورئوس* در جامعه های انسانی و دامی و استفاده از آنتی بیوتیک برای درمان آن از یک سو و افزایش گزارش های علمی مبنی بر پیدایش سویه های مقاوم به پادزی برای این باکتری از سوی دیگر، موجب افزایش نگرانی ها در ارتباط با سلامت عمومی شده است (Haran et al., 2012). از این رو در سال های اخیر، همگام با جنبش جهانی رویارویی با افزایش مقاومت پادزیستی، تلاش برای دستیابی به جایگزین های دارویی مؤثر و درعین حال بی خطر علیه *استافیلوکوکوس اورئوس* افزایش یافته است.

یکی از این روش ها می تواند بهره گیری از ایمنیت غیرفعال خوراکی با استفاده از ایمنوگلوبولین های زرده تخم مرغ (IgY) باشد که روشی عملی و به صرفه برای درمان غیرفعال بسیاری از عفونت ها است. در فرآیند به کارگیری IgY، می توان با ایمن کردن مرغ های تخم گذار با شاخص های پادزی یک بیماریزای خاص، پادتن (آنتی بادی) اختصاصی علیه آن بیماریزا را تولید کرد. این پادتن ها به صورت طبیعی وارد زرده تخم مرغ شده و با استفاده از روش های بیوشیمیایی و ایمنی شناختی (ایمونولوژیک) قابل جداسازی هستند (Vega et al., 2012). این پادتن ها که در پزشکی و دامپزشکی قابل استفاده اند با کاستن از میزان مصرف آنتی بیوتیک ها می توانند خطر ریزجاندران (میکروارگانسیم های) مقاوم به دارو را کاهش دهند

(Ebina, 1996). بررسی های اولیه صورت گرفته در رابطه با توان تأثیر IgY برای مهار یا کاهش تأثیر بیماری شناختی (پاتولوژیک) *استافیلوکوکوس اورئوس* نشان داد، به کارگیری IgY خالص علیه انترتوکسین B این باکتری توانست میمون ها را در مقابل سندرم تکانه (شوک) کشنده محافظت کند (LeClaire et al., 2002). با این وجود بررسی ها در زمینه امکان تولید کاربردی پودر IgY اختصاصی (به جهت آسانی شیوه مصرف) علیه *استافیلوکوکوس اورئوس* و نیز بررسی ویژگی های بیوشیمیایی، ایمنی شناختی و ضدپاکتریایی (آنتی باکتریال) آن بر رشد این باکتری، به عنوان یکی از مهم ترین سروتیپ های *استافیلوکوکوس بیماریزای انسانی و دامی* بسیار محدود بوده و لذا این بررسی برای نیل به هدف های بالا طراحی و اجرا شد.

مواد و روش ها

تولید واکسن

تهیه پادگن (آنتی ژن) مورد نیاز برای ایمن سازی (ایمونیزاسیون) مرغ های تخم گذار با بهره گیری از روش Kariyawasam et al. (2004) انجام پذیرفت. به این منظور، باکتری *استافیلوکوک اورئوس* (PTCC 1337) از مجموعه میکروبی سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران تهیه و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس و با سرعت ۱۸۰ دور در دقیقه (IKA-KS4000i) (control, Germany) به مدت ۶ ساعت (انتهای فاز لگاریتمی) کشت شد. پس از آن یاخته ها توسط سانتریفیوژ (Sigma 6K15, Laboratory Centrifuges, Germany) با سرعت ۵۰۰۰×g برای ۱۵ دقیقه و در دمای ۴ درجه سلسیوس رسوب داده شدند. رسوب به دست آمده ۳ بار با بافر نمکی فسفات (pH= ۷/۲, PBS) شستشو شد و سپس برای دستیابی به غلظت CFU/mL^۹×۱۰^۲، با PBS مخلوط و در نهایت جمعیت میکروبی با بهره گیری از کشت به روش مایلز- میزرا (Miles & Misra, 1938) تأیید شد. برای تهیه واکسن کشته شده، ۴۰ میلی لیتر از دروایه (سوسپانسیون) باکتریایی، در شرایط حمام یخ، تحت تأثیر دستگاه سونیکاتور (Ultraschallprozessor., Dr. Hielscher, UP200H,)

عیار (تیترا) پادتن اختصاصی در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند.

استخراج IgY

برای جداسازی و تخلیص پادتن زرده تخم مرغ، مهم ترین چالش، جداسازی حالت (فاز) چربی زرده تخم مرغ از حالت آبی آن است. یکی از روش های تخلیص پادتن زرده تخم مرغ، استفاده از حلال های آلی است که از آن جمله می توان به کلروفرم اشاره کرد. کلروفرم کمک بسیار شایانی در جداسازی حالت چربی از حالت آبی زرده تخم مرغ می کند. استفاده از این حلال در کنار یک حلال پایه آب مانند آب مقطر اسیدی یا بافر نمکی فسفات می تواند به بهترین نحو ممکن و با سانتریفیوژهای دور پایین، پروتئین های محلول در آب زرده تخم مرغ را جداسازی کند؛ به طوری که بر پایه بررسی های صورت گرفته، بازده (راندمان) استخراج IgY با بهره گیری از روش کلروفرم-پلی اتیلن گلیکول نسبت به فرآیندی که تنها از پلی اتیلن گلیکول ۶۰۰۰ استفاده کرده اند در حدود ۲/۵۷ برابر است (Polson, 1990). به این منظور در آغاز زرده تخم مرغ ها از سفیده جدا و پس از پاره کردن غشای زرده، زرده ها در یک ظرف شیشه ای تخلیه شدند. آنگاه کلروفرم تجاری به میزان هم حجم زرده ها و بافر نمکی فسفات به میزان دو برابر حجم زرده ها، مخلوط شد تا یک دروایه یکنواخت از این ترکیب ها به دست آید. سپس مخلوط به دست آمده برای مدت ۲۴ ساعت درون شیشه های در بسته درون یخچال در دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری شد. پس از گذشت زمان انکوبه گذاری، این مخلوط به سانتریفیوژ منتقل شد و در دمای ۴ درجه سلسیوس و با سرعت ۳ هزار دور در دقیقه به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس محلول روپی که حاوی پروتئین های محلول در آب بود درون ظروفی نگهداری شد. حجم محلول روپی توسط استوانه مدرج اندازه گیری شد و ۱۲ درصد حجم آن (حجمی به وزنی) پلی اتیلن گلیکول ۶۰۰۰ به آن اضافه و حل شد و محلول به دست آمده دوباره برای مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس و با ۳۰۰۰ دور در دقیقه

(Stuttgart, Germany) با بیشینه جریان برای ۱۵ دقیقه قرار گرفت. برای سترون (استریل) کردن دروایه باکتریایی کشته شده، از پالایشگر (فیلتر) های ۰/۴۵ میکرومتری استفاده شد (Acrodisc Gelman Sciences, Mississauga, Ontario, Canada) که برای تأیید نبود باکتری زنده، نمونه ای از دروایه سترون شده روی پلیت حاوی محیط کشت (TSA) Tryptic Soy Agar کشت شد. در نهایت واکسن به دست آمده، تا زمان تزریق در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شد.

ایمن سازی مرغ های تخم گذار

نخستین مرحله در تولید IgY، ایمن کردن مرغ های تخم گذار با پادکن است که با روش ران و همکاران صورت گرفت (Ruan et al., 2005). در این آزمایش برای تهیه پادتن مورد نیاز، شمار ۱۶ قطعه مرغ تخم گذار لگهورن سفید سویه های لاین W-36 که در سن ۴۰ هفتگی قرار داشتند ایمن سازی شدند. به این ترتیب که در آغاز در نخستین ایمن سازی، به ازای هر مرغ، ۰/۵ میلی لیتر دروایه حاوی 10^9 CFU/mL باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* به همراه ۰/۵ میلی لیتر ادجوانت کامل فروند (Biogen, CF112, Mashhad, Iran) مخلوط و در دو عضله سینه ای به روش عضلانی تزریق شد. تزریق های یادآور ۲ و ۴ هفته پس از نخستین ایمن سازی، به ترتیب با ادجوانت ناقص فروند (Biogen, CF112, Mashhad, Iran) و بدون ادجوانت انجام پذیرفت (Ruan et al., 2005). همچنین شمار ۱۶ قطعه مرغ تخم گذار نیز به عنوان گروه شاهد (کنترل) برای تولید پادتن غیر اختصاصی در نظر گرفته شد که با روش بالا به جای پادکن، سرم فیزیولوژیک همراه با ادجوانت ها تزریق شد. در پایان هر هفته، با استفاده از سرنگ های ۵ میلی لیتری آغشته به هیپارین، خون گیری از ورید بال پرندگان انجام شد و پس از جداسازی پلاسما، تا زمان انجام آزمایش های بعدی در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شد. همچنین تخم مرغ های تولیدی به صورت روزانه گردآوری و در دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری شدند. سپس در پایان هر هفته زرده ها جدا و تا زمان انجام آزمایش های مربوط به بررسی غلظت یا

چاهک‌های پلیت با نمونه‌های رقیق شده انجام شد. به این منظور میزان ۱۰۰ میکرولیتر نمونه درون چاهک‌ها ریخته و سپس برای یک شبانه‌روز پلیت در دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری شد. پس از آن شستشوی چاهک‌ها با استفاده از ۲۰۰ میکرولیتر بافر شستشو برای سه مرحله انجام گرفت. مرحله انسداد (بلاکینگ) چاهک‌ها با بهره‌گیری از بافر مسدودکننده شامل شیر خشک بدون چربی (Merck-skimmed milk) ۵ درصد (تهیه شده 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 دوباره 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 اولیه رقیق شده به هر چاهک اضافه شد. پس از گذشت ۲ ساعت و شستشوی دوباره چاهک‌ها، میزان ۱۰۰ میکرولیتر از پادتن رقیق شدهٔ ثانویه (IgG) بزی ضد IgG خرگوشی) اضافه شد. با سپری شدن ۲ ساعت و شستشوی دوباره چاهک‌ها، میزان ۱۰۰ میکرولیتر بستره (سویسترای) تترامیتیل بنزیدین به هر چاهک اضافه شد و پس از ۱۵ دقیقه میزان ۵۰ میکرولیتر از محلول متوقف‌کننده اسیدسولفوریک ۱ مولار به هر چاهک اضافه شد و در نهایت پلیت‌ها با استفاده از دستگاه الیزا خون در طول موج 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-بی کربنات رقیق شده و حاوی CFU/mL $10^9 \times 2$ باکتری بود، کف چاهک‌ها پوشانده شد و پس از آن به مدت ۸ ساعت در دمای ۴ درجه سلسیوس قرار گرفت. در ادامه همهٔ مراحل صورت گرفته در راستای اندازه‌گیری غلظت پادتن کل که در بخش بالا

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

تهیه پودر پادتن

پودر پادتن زرده تخم مرغ به عنوان محصولی خشک و پایدار می‌تواند انتخابی بسیار بارز برای استفاده کاربردی ایمونوگلوبین Y باشد. به نظر می‌رسد که روش خشک کردن انجمادی نسبت به دیگر روش‌های تهیه پودر IgY کارآمدتر است؛ زیرا این روش در مقایسه با خشک کردن 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 به عنوان پودر پادتن اختصاصی (حاصل از تخم مرغ پرندگان ایمن‌سازی شده) و غیراختصاصی (حاصل از تخم مرغ پرندگان غیر ایمن‌سازی شده) استفاده شوند (Lee *et al.*, 2002).

تعیین غلظت پروتئین کل

غلظت پروتئین کل زرده تخم مرغ، پلاسما خون و پودر پادتن با بهره‌گیری از روش بردفورد و با بهره‌گیری از آلبومین سرم گاوی به عنوان پروتئین استاندارد انجام پذیرفت (Bradford, 1976).

تعیین میزان پادتن کل به روش الیزای 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 پلی کلونال (R&D systems polyclonal chicken IgY) به عنوان 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-بی کربنات تهیه شدند. برای اندازه‌گیری غلظت پادتن کل در نمونه‌ها، در آغاز پوشش‌دهی کف

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 پلاسما 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 هفته آغازین باقی ماند ($P < 0/01$). 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 شایان توجهی نشان داد و همچون پلاسما، برای همه دوره نمونه‌برداری (۸ هفته)، در سطوح بالا حفظ شد ($P < 0/01$). تأخیر در پاسخ بروز کرده در زرده تخم‌مرغ نسبت به پلاسما (یک هفته) می‌تواند مربوط به مدت‌زمان لازم برای تشکیل زرده و نحوه 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 به‌نوبه خود، تحت تأثیر عامل‌های مختلفی همچون ویژگی‌های منحصربه‌فرد پادگن، میزان پادگن، مسیر آلودگی، نوع ادجوانت و نژاد پرند می‌تواند دچار تغییر شود. نتایج آزمایش‌های سان‌وو و همکاران نشان‌دهنده آن است که استفاده از ادجوانت فروند می‌تواند بهترین پاسخ را در تداوم غلظت پادتن، برای یک دوره درازمدت نسبت به ادجوانت‌های کوئیل A، عصاره بره موم و عصاره دانه *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 سوئه لگهورن به‌عنوان یک‌سویه با تولید بالا، می‌تواند بهترین نتایج را برای بهره‌وری بالاتر تولید پادتن سبب شود (Sun *et al.*, 2008).

بیان شد تکرار شد تا درنهایت میزان پادتن اختصاصی علیه باکتری مورد آزمون سنجیده شود. همچنین درصد خلوص پادتن بر پایه 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 درجه 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 2×10^9 CFU/mL باکتری مخلوط و در دمای ۳۷ درجه 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 مرحله 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 دمای ۳۷ درجه سلسیوس) انجام گرفت (Miles & Misra, 1938). درنهایت شمار واحدهای تشکیل‌دهنده پرگنه (کلنی) در هر میلی‌لیتر از نمونه‌ها در زمان‌های مورد بررسی محاسبه شد.

تجزیه و تحلیل آماری

پس از ثبت داده‌ها، تجزیه و تحلیل نهایی با استفاده از رویه GLM نرم‌افزار SAS (2001) انجام شد. میانگین داده‌ها با استفاده از روش حداقل مربعات مقایسه شدند. مدل آماری که برای تجزیه و تحلیل داده‌ها استفاده شد شامل $Y_{ij} = \mu + A_i + e_{ij}$ است، که در آن

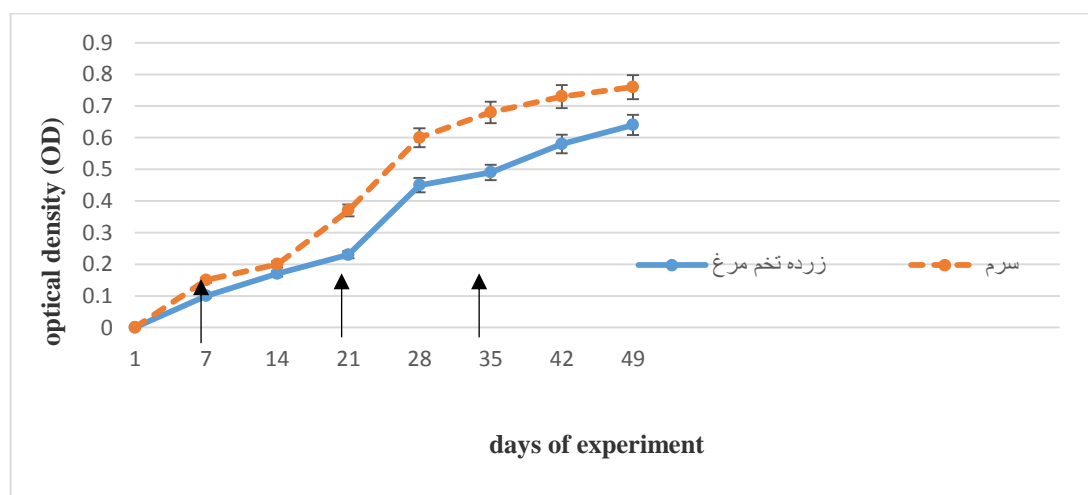
افزایش یافت و با القای ایمن سازی یادآور در هفته چهارم، مقادیر IgY کل در هفته های پنجم تا هفتم به اوج سطح خونی خود رسید و پس از آن در سطح بالایی حفظ شد. درصد خلوص پادتن (نسبت غلظت IgY به پروتئین کل) پلاسما نیز روند همسانی داشت به طوری که پس از آخرین ایمن سازی، در هفته ششم به بالاترین سطح خود رسید ($P < 0.01$).

پس از اعمال ایمن سازی، غلظت پروتئین کل در زرده تخم مرغ نیز روند افزایشی داشت و در هفته های ششم و هفتم آزمایش به بالاترین سطح خود رسید ($P = 0.07$). غلظت IgY کل در زرده نیز از هفته پنجم آزمایش روندی افزایشی گرفت ($P < 0.05$). این روند تا آخرین هفته رکورد برداری به شکل معنی داری نسبت به هفته های آغازین در سطح بالاتری قرار داشت. درصد خلوص پادتن نیز روند افزایشی نشان داد و از هفته های پنجم به بعد در سطوح بالای خود باقی ماند ($P < 0.01$). هرچند نتایج برخی از گزارش های پیشین بیانگر آن است که غلظت IgY کل در زرده تخم مرغ پس از اعمال ایمن سازی تغییر معنی داری را نشان نمی دهد (Lee et al., 2002)، اما یافته های به دست آمده در این آزمایش نشان دهنده آن است که پس از دومین تزریق، افزایش معنی داری در غلظت پادتن زرده تخم مرغ به خوبی قابل مشاهده است.

هرچند برخی محققان در نتایج بررسی های خود پیشنهاد کرده اند، به دلیل نبود تغییر قابل ملاحظه در فعالیت اختصاصی پادتن پس از دومین تزریق یادآور (روز ۲۸)، انجام این تزریق امری غیر ضروری است (Sunwoo et al., 2002)، اما نتایج این بررسی نشان داد، انجام این تزریق برای حفظ چگالی نوری در سطوح بالا برای یک دوره زمانی درازمدت می تواند به خوبی مؤثر باشد (Lee et al., 2002). لذا با عنایت به این یافته ها می توان چنین بیان کرد که استافیلوکوکوس اورئوس به همراه ادجوانت فروند، دارای خاصیت القایی بالایی، برای تولید سطوح بالای پادتن در مرغ های تخم گذار لگهورن سفید، برای یک مدت طولانی بوده است.

ویژگی های بیوشیمیایی پلاسما و خون زرده تخم مرغ پرندگان ایمن شده

غلظت پلاسما پروتئین کل در دوره آزمایش تغییر معنی داری را نشان نداد (جدول ۱). با این حال، از هفته سوم آزمایش سیر افزایشی به خود گرفت و به صورت حاشیه ای ($P = 0.096$) تا پایان هفته های آزمایش در سطح بالایی حفظ شد. تغییر پذیری غلظت IgY کل در پلاسما نیز پس از دومین ایمن سازی و در هفته چهارم آزمایش به طور معنی داری ($P < 0.01$)



شکل ۱. فعالیت های اختصاصی پادتن پلاسما و زرده تخم مرغ در مرغ های ایمن شده با استافیلوکوکوس اورئوس در طول دوره آزمایش. نشانگرها مشخص کننده زمان تزریق ها 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.

جدول ۱. تغییرپذیری غلظت پروتئین کل و IgY و نیز درصد خلوص IgY در پلاسما و زرده تخم مرغ در دوره ایمن سازی مرغ های تخم گذار

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								SEM	P-Value
	1	2	3	4	5	6	7	8		
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 سونیکه شده در روزهای ۱، ۱۴ و ۲۸ به روش عضلانی به پرندگان تزریق شد.

a-c: میانگین های با حرف های غیرهمسان در هر ردیف از نظر آماری تفاوت معنی داری دارند ($P < 0.05$).

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

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

جداسازی از حالت رسوبی باید از حالت مایع جدا شود، بلکه نیازمند به استفاده از سانتریفیوژهای با دور بالا برای حجم های بسیار زیاد است که سبب اعمال هزینه های فراوان و صرف زمان بسیاری برای استخراج می شود. از سوی دیگر روش های ارائه شده توسط آن ها در بهترین حالت تنها توانسته است تا حدود ۳۰ درصد خلوص سازی در پودر را اعمال کند.

جدول ۲. ویژگی های ایمنی شیمیایی پودر IgY اختصاصی و

غیراختصاصی تولید شده به شیوه 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: میانگین های با حرف های غیرهمسان در هر ستون از نظر آماری

تفاوت معنی داری دارند ($P < 0.05$).

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

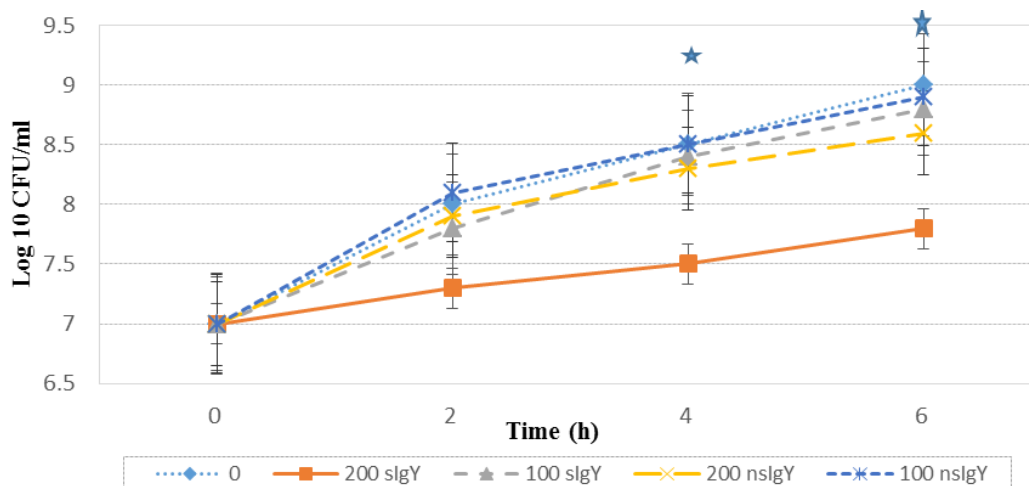
ویژگی های ایمنی شیمیایی پودر IgY

هرچند میزان پروتئین پودر پادتن اختصاصی و غیراختصاصی علیه استافیلوکوکوس اورئوس تفاوت معنی داری را نشان نداد، اما با این وجود غلظت IgY کل در شکل اختصاصی حدود ۲۵ درصد بالاتر ($P < 0.05$) از نوع غیراختصاصی آن بود (جدول ۲). به نظر می رسد که روش خشک کردن انجمادی نسبت به دیگر روش های تهیه پودر IgY کارآمدتر باشد، زیرا این روش در مقایسه با روش خشک کردن پاششی میزان بیشتر محصول و محتوای کمتر رطوبت را فراهم می آورد (Yokoyama et al., 1992); با این وجود تفاوت قابل ملاحظه ای در میزان فعالیت اختصاصی پادتن فراهم شده با این روش ها مشاهده نشده و آنچه مسلم است اعمال پی در پی هرکدام از این فرآیندها می تواند بر توان عمل IgY تأثیر زیانباری را در پی داشته باشد (Chalghoumi et al., 2009).

استخراج حالت پروتئین های محلول در آب زرده تخم مرغ که حاوی پادتن های زرده هستند با استفاده از روش پولسون می تواند میزان بالایی از پروتئین را با درصد خلوص بالای حدود ۷۱ درصد از زرده استحصال کند. این شیوه استخراج، در حضور حجم های بالای زرده تخم مرغ و یا بدون دسترسی به سانتریفیوژهای دور بالا، توانایی بسیار خوبی را برای دستیابی به بالاترین بازده و درصد خلوص پادتن فراهم می آورد. چراکه در دیگر روش های استخراج همچون شیوه ارائه شده توسط آکیتا و ناکایی (Akita & Nakai, 1992)، نه تنها پادتن به جای

یکسان است. بنابر گزارش آنان، اگرچه کاربرد ۱۸۰ میلی گرم پادتن اختصاصی به ازای هر میلی لیتر محیط کشت، موجب کاهش معنی‌دار جمعیت باکتری شد، اما این تأثیر در گروه‌های شاهد دیده نشد. بر پایه یافته‌های به دست آمده 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 به دست آمده، 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 نتیجه همکوشی دو پدیده بروز کرده است. رویداد اول، افزایش فعالیت اختصاصی پادتن، در زرده تخم‌مرغ‌های ایمن‌سازی شده است و پدیده 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 مهار پادتن اختصاصی به‌طور ویژه‌ای تحت تأثیر قرار گیرد.

لگاریتمی انجام شد (شکل ۲). استفاده از سطوح پایین پودر پادتن اختصاصی (۱۰۰ میلی گرم در میلی لیتر) تأثیر قابل ملاحظه‌ای بر مهار رشد میکروب در مقایسه با گروه شاهد (۱۰۰ میلی گرم در میلی لیتر پادتن غیراختصاصی) نداشت. با این وجود، انکوباسیون باکتری در مجاورت ۱۰۰ میلی گرم در میلی لیتر پادتن اختصاصی سبب کاهش غیر معنی‌دار رشد میکروبی در ساعت ۶ انکوباسیون شد ($0.20 \log \text{CFU/mL}$ ، شکل ۲). اما افزودن ۲۰۰ میلی گرم پادتن اختصاصی به ازای هر میلی لیتر محیط کشت حاوی $2 \times 10^9 \text{CFU/mL}$ سبب شد که در خلال ساعت‌های ۲ تا ۴ انکوباسیون، جمعیت میکروبی تنها در حدود $0.2 \log \text{CFU/mL}$ افزایش یابد، حال آنکه این افزایش در گروه شاهد (۲۰۰ میلی گرم در هر میلی لیتر پادتن غیراختصاصی) در حدود $0.4 \log \text{CFU/mL}$ 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 ($P < 0.05$). همچنین، بهره‌گیری از این سطح سبب کاهش بسیار معنی‌دار جمعیت باکتریایی تا حدود $1.20 \log \text{CFU/mL}$ در مقایسه با گروه شاهد، در ساعت ۶ انکوباسیون شد ($P < 0.05$). این یافته‌ها با نتایج بررسی‌های Sunwoo et al. (2002)



شکل ۲. منحنی‌های مهار رشد/استافیلوکوکوس اورئوس ($2 \times 10^9 \text{CFU/mL}$) در حضور غلظت‌های مختلف (۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر) پودر پادتن اختصاصی و غیراختصاصی
 ★ نشان‌دهنده شمارش میکروبی پایین‌تر به شکل معنی‌دار ($P < 0.05$) است.

Figure 2. Growth inhibition curves of *Staphylococcus aureus* ($2 \times 10^9 \text{CFU/mL}$) in the presence of different concentrations (0, 100 and 200 mg/mL) of specific and nonspecific IgY powder.

★ Indicates significantly lower counts ($P < 0.05$).

دست آوردن پادتن اختصاصی با درصد خلوص مطلوب است. تأثیر ضدباکتریایی پودر پادتن اختصاصی، وابسته به میزان دز مصرفی بوده و این توانمندی در نتیجه 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.

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 دوره زمانی طولانی دارد. همچنین بهره‌گیری از روش پولسون راهی مؤثر در جهت تولید درازمدت و با بازده بالا، برای به

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. *Infect. 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 ($\beta 2m$). *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. & Fernandez, 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.