Veterinary Clinical Pathology, Vol.13, No. 51, Autumn 2019

"Research article" **DOI: 10.30495/JVCP.2019.669210**

Evaluation of polyclonal antibody production level against *Listeria monocytogenes* in animal model

Bagheri, Y.[1] Khakpour, M.[2*] Zihag, H. [3] Barati, A.[1]

1- Young Researchers and Elite Club, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran.
2 - Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran.
3- D.V.M. Graduate, Faculty of Veterinary Medicine, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran.
*Corresponding author's email: khakpour@iaut.ac.ir
(Received: 2019/5/12 Accepted: 2019/10/14)

Abstract

Listeria monocytogenes is a short, gram-positive, spore-free bacillus and facultative intracellular parasite, which is transmitted through contaminated vegetables, milk, cheese and meat to humans. Immunoglobulin Y (IgY) obtained from the egg yolk of immunized hens is a great and cheap source of polyclonal antibodies. These antibodies can be an appropriate replacement for antibodies produced in other laboratory animals. In recent years, IgY has been used widely in medical research for diagnosis, prevention and treatment of diseases. In current study, 12 Hy-line laying hens were divided into 2 groups of control (2 hens) and treatment (10 hens) and the treatment group was immunized by triple injection of *Listeria monocytogenes* antigens once a week. Then, after collecting the eggs and measuring total protein and yolk globulins at weeks 9,10 and 11 after the first injection, it was observed that there was no significant difference in both parameters at 9 and 10 weeks, while they showed a significant difference compared to the control group ($p<0.05$). However, the amount of globulin and total protein of yolk in the eleventh week was significantly reduced although no significant difference was observed with the controls. Accordingly, it could be concluded that immunization of hens by antigens prepared from *Listeria monocytogenes* resulted in increased yolk globulin levels in the ninth and tenth weeks after injection therefore egg yolk can be used as a source for producing polyclonal antibodies against *Listeria monocytogenes*.

Conflict of interest: None declared.
Keywords: Polyclonal antibodies, *Listeria monocytogenes*, Animal model.

"مقاله پژوهشی" DOI: 10.30495/JVCP.2019.669210

ارزیابی میزان تولید آنتی‌بادی پلی‌کلونال علیه باکتری *لیستریا مونوسایتوژنز* در مدل حیوانی

یاسین باقری[۱]، منصور خاکپور[۲*]، حمید ذیحق[۳]، علیرضا براتی[۱]

۱- باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران.
۲- استادیار گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران.
۳- دانش‌آموخته دکترای حرفه‌ای دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران.
*نویسنده مسئول مکاتبات: khakpour@iaut.ac.ir
(دریافت مقاله: ۹۷/۸/۱۷ پذیرش نهایی: ۹۸/۹/٤)

چکیده

لیستریامونوسایتوژنز باسیلی کوتاه، گرم مثبت، انگل اختیاری داخل سلولی و فاقد اسپور است که از طریق سبزیجات آلوده، شیر، پنیر و گوشت آلوده به انسان منتقل می‌شود. ایمونوگلوبولین Y (IgY) به‌دست آمده از زرده تخم‌مرغ مرغ‌های ایمن‌شده منبع سرشار و ارزانی از آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال می‌باشد. این آنتی‌بادی‌ها می‌توانند به‌عنوان یک جایگزین مناسب به جای آنتی‌بادی‌های تولیدشده در سایر حیوانات آزمایشگاهی مطرح باشند. در سال‌های اخیر، IgY در تحقیقات علوم پزشکی جهت تشخیص، پیشگیری و درمان بیماری‌ها کاربرد گسترده‌ای داشته‌است. در مطالعه حاضر تعداد ۱۲ قطعه مرغ تخم‌گذار سویه های-لاین در دو گروه تیمار (۱۰ قطعه) و شاهد (۲ قطعه) انتخاب و گروه تیمار در ۳ نوبت و با فاصلهٔ زمانی هفته‌ای یک‌بار توسط تزریق آنتی‌ژن تهیه‌شده از *لیستریا مونوسایتوژنز* ایمن گردید. سپس با جمع‌آوری تخم‌مرغ‌ها و اندازه‌گیری میزان پروتئین تام و گلوبولین‌های زرده در هفته‌های ۹، ۱۰ و ۱۱ بعد از تزریق اول، مشخص شد که مقدار این دو پارامتر در هفته‌های ۹ و ۱۰ با یکدیگر تفاوت آماری معنی‌داری نداشته ولی در مقایسه با مقادیر آن‌ها در گروه شاهد، افزایشی معنی‌داری ($p<۰/۰۵$) مشاهده گردید. از طرفی مقدار گلوبولین و پروتئین تام زرده در هفته یازدهم افت قابل توجهی داشت ولی مقادیر آن‌ها در مقایسه با گروه شاهد، تفاوت آماری معنی‌داری نشان نداد. بر اساس یافته‌های مطالعه حاضر می‌توان نتیجه‌گیری کرد که ایمن‌سازی مرغ‌ها توسط آنتی‌ژن تهیه‌شده از *لیستریا مونوسایتوژنز* موجب افزایش میزان گلوبولین زرده در هفته‌های نهم و دهم پس از تزریق شده‌است و بنابراین می‌توان از زرده تخم‌مرغ، به‌عنوان منبعی برای تولید آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال علیه باکتری *لیستریا مونوسایتوژنز* استفاده نمود.

کلیدواژه‌ها: آنتی‌بادی پلی‌کلونال، *لیستریا مونوسایتوژنز* ، مدل حیوانی.

مقدمه

تخم‌مرغ به عنوان ماده مغذی شناسایی شده است که شامل مقدار زیادی آنتی‌بادی‌ها از جمله ایمونوگلوبین Y در زرده تخم‌مرغ می‌باشد. امروزه تکنولوژی نوین استفاده از آنتی‌بادی‌های زرده تخم‌مرغ به منظور کاربردهای تشخیص و درمانی در حال توسعه می‌باشد. آنتی‌بادی زرده تخم‌مرغ (IgY) ایمونوگلوبین غالب زرده تخم‌مرغ می‌باشد و همتای IgG در پستانداران می‌باشد که امروزه کاربردهای گسترده‌ای پیدا کرده‌است. ایمونوگلوبین Y زرده تخم‌مرغ باعث ایجاد ایمنی غیرفعال در جنین می‌شود (Sun *et al*., 2001; Nassiri *et al*., 2016). مشخص شده‌است که ایمونوگلوبولین‌های موجود در سرم مرغ‌ها می‌توانند به زرده تخم‌مرغ برای ایجاد ایمنی در جوجه‌ها منتقل شود (Sun *et al*., 2001). همچنین مشخص شده است که ایمونوگلوبولین Y توسط مرغ‌های ایمن‌شده در مقابل آنتی‌ژنی خاص، در تخم‌مرغ تولید می‌شود (Pour Amir, 2000; Malekan *et al*., 2010). هرچند آنزیم‌های دستگاه گوارش از جمله پروتئازها، پپسین، تریپسین و کموتریپسین ممکن است تا حدودی موجب تجزیه آنتی‌بادی‌های موجود در زرده تخم‌مرغ‌هایی شوند که به شیوه خوراکی مصرف شده‌اند (Reilly *et al*., 1997)، با این حال بخشی از این آنتی‌بادی‌ها دست‌نخورده باقی‌مانده و توانایی اتصال به آنتی‌ژن را دارا می‌باشند (Akita *et al*., 1998). لذا تجویز خوراکی IgY زرده تخم‌مرغ توسط بسیاری از محققین علیه عوامل بیماری‌زای مختلف مثل *اشریشیاکولای* انتروتوکسیکوژنیک (Marquardt *et al*., 1999)، روتاویروس‌های انسانی (Sarker *et al*., 1996; Ebina *et al*., 1996) و *سودوموناس آئروژنیوزا* (Sugita *et al*., 1996) با موفقیت به‌کار گرفته شده است. از طرف دیگر از آنجائی‌که IgY مقاومت بالایی نسبت به حرارت دارد، لذا فعالیت ایمنولوژیک آن در اثر پاستوریزاسیون کاهش پیدا نمی‌کند. همچنین مشخص شده که آنتی‌بادی‌های طیور در مقایسه با آنتی‌بادی‌های پستانداران به اپی‌توپ‌های بیشتری متصل می‌شوند که این موضوع موجب افزایش حساسیت آن‌ها می‌گردد (Hatta *et al*., 1990). از این رو آنتی‌بادی‌های زرده تخم‌مرغ با موفقیت در مقاصد پزشکی، درمانی و تشخیصی به کار گرفته شده است (Bižanov *et al*., 2006). همچنین ویژگی ضدباکتریایی ایمونوگلوبولین Y موجب ترغیب محققین جهت انجام مطالعات مختلف روی آن شده است، به‌طوری‌که نشان داده‌اند IgY دارای عملکرد ایمنی‌زایی در عفونت‌های ویروسی و باکتریایی می‌باشد (Larsson, 1993; Ebina, 1996). هاتا و همکاران در سال ۱۹۹۷ از IgY تولیدشده علیه *استرپتوکوکوس موتانس* برای جلوگیری از تشکیل پلاک دندانی استفاده کردند که نتایج حاکی از کاهش تعداد باکتری مذکور بود (Hatta *et al*., 1990).

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

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

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

مواد و روش‌ها

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

-نحوهٔ آماده‌سازی آنتی‌ژن باکتریایی برای ایمن‌سازی مرغ‌ها: ابتدا سویه استاندارد باکتری *لیستریا مونوسایتوژنز* (ATCC: 13932) تهیه‌شده از انستیتو پاستور (تهران، ایران) با استفاده از محیط کشت Broth BHI (مرک، آلمان) به مدت ٤٨ ساعت و در دمای ۳۷ درجهٔ سلسیوس گرم‌خانه‌گذاری گردید. در ادامه پس از انتقال به لولهٔ استریل، به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۳۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ (HETTICH، آلمان) شد. رسوب به‌دست آمده از سانتریفیوژ دو بار با سالین نرمال (فرآورده‌های تزریقی و دارویی، ایران) شستشو داده شد، سپس برای کشتن باکتری‌ها، لولهٔ آزمایش به مدت یک ساعت در درون آب با دمای ۱۰۰ درجه سلسیوس قرار داده شد. سپس جهت جداسازی باکتری‌ها از محیط کشت، محتویات لوله آزمایش مذکور، مجدداً به مدت

۱۰ دقیقه با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. مایع رویی که حاوی محیط کشت بود دور ریخته شد و رسوب ته لولهٔ آزمایش که حاوی باکتری‌های کشت داده‌شده بود، دو بار با سالین نرمال شستشو داده شد، تا محیط کشت به طور کامل حذف شده و فقط باکتری‌های کشته شده برای استخراج آنتی‌ژن باقی بمانند. در ادامه با استفاده از رسوب مذکور سوسپانسیون باکتریایی تهیه گردید که از لحاظ کدورت با لولهٔ شماره ۱ استاندارد مک فارلند مطابقت داشت. سپس آنزیم تریپسین (T٤٧٩٩، شرکت سیگما آلدریچ، آمریکا) به صورت مخلوط به همراه بافر فسفاته به مقدار ۱ میلی‌گرم برمیلی‌لیتر و به نسبت ۱ به ۹ به سوسپانسیون باکتریایی اضافه گردیده و به مدت ۳۰ دقیقه در بن ماری ۳۷ درجهٔ سلسیوس گرم‌خانه‌گذاری گردید. سپس محتویات لوله به مدت ۱۰ دقیقه به خوبی مخلوط گردید (Lee *et al*., 2002). در ادامه سوسپانسیون باکتریایی حاوی آنزیم مذکور، سه بار با سالین نرمال شستشو داده شد و سپس به نسبت ۱ به ۵۰ رقیق گردید و در نهایت ۰/۲۵ درصد به آن فرمالین (مرک، آلمان) اضافه شد. همچنین به منظور آماده‌سازی جهت انجام تزریق، مقدار ۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتریایی حاصله با ۱ میلی‌لیتر از ادجوانت فروند مخلوط گردید. لازم به ذکر است که جهت کاهش عوارض جانبی استفاده از ادجوانت فروند، در تزریقات سری اول از ادجوانت کامل فروند و در دو سری بعدی از ادجوانت ناقص فروند استفاده شد (Hatta *et al*., 1997). در نهایت دو میلی‌لیتر از مخلوط حاصله در مجاورت یخ خشک به محل نگه‌داری مرغ‌ها حمل شده و به هر یک از مرغ‌ها به میزان ۰/۲۵ میلی‌لیتر از آن در عضلهٔ سینه تزریق شد. به منظور افزایش تیتر آنتی‌بادی حاصله، مخلوط میکروبی مذکور در ۳ نوبت دیگر و با فاصلهٔ زمانی هر ۲ هفته یک‌بار به مرغ‌ها تزریق گردید. از هفته ۹ الی ۱۲ پس از اولین تزریق، هر هفته تعداد ۱۰ تخم‌مرغ از گروه تیمار و ۲ تخم‌مرغ از گروه شاهد به صورت تصادفی انتخاب و مورد آزمایش قرار گرفت (Lee *et al*., 2002; Alizadeh *et al*., 2012).

- نحوه استخراج و بررسی ایمنوگلوبولین‌های تولیدی در تخم‌مرغ مرغان ایمن‌شده: بدین منظور به ۱۰ میلی‌لیتر از زردهٔ هر یک از تخم‌مرغ‌های مورد نظر که به طور کامل از سفیده جدا شده‌بود، مقدار ۱۰۰ میلی‌لیتر کلروفرم (Scharlau، اسپانیا) سرد (نگه‌داری‌شده در دمای ۲۰- درجهٔ سلسیوس) اضافه شد. پس از تشکیل دو فاز، فاز زیرین دور ریخته شد و این مرحله دوباره تکرار گردید. سپس به فاز بالائی حاصله در مرحله تکرار، مقدار ۱۰۰ میلی‌لیتر ایزوپروپانول (Scharlau، اسپانیا) سرد (نگه‌داری شده در دمای ۲۰- درجهٔ سلسیوس) اضافه شد. در این مرحله فاز رویی دور ریخته شد و رسوب حاصله جمع‌آوری گردیده و به‌میزان ۱۰۰ میلی‌لیتر استون (Scharlau، اسپانیا) سرد (نگه‌داری شده در دمای منفی۲۰ درجهٔ سلسیوس) به آن افزوده شد. سپس برای خشک شدن، رسوب در کاغذ صافی پخش گردید. در ادامه به رسوب خشک‌شده مقدار ۵۰ میلی‌لیتر محلول فسفات بافر (PBS) افزوده شد و به مدت یک ساعت در دمای محیط درحالی که مرتباً توسط شیکر و مگنت (Hei-Tec، آلمان) مخلوط می‌شد، قرار داده‌شد. در نهایت نمونه مذکور تحت سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شده و محلول رویی آن‌که حاوی IgY بود، جدا گردید (Saadati *et al*.,

2005). سپس برای تعیین مقدار پروتئین محلول فوق از روش بایوره ستفاده شد (Lumeij and Maclean, 1996). میزان آلبومین آن نیز با استفاده از کیت اختصاصی (زیست شیمی، ایران) با روش برموکرزول گرین اندازه‌گیری گردید که این روش شامل واکنش آلبومین با برموکرزول گرین در شرایط اسیدی و تشکیل کمپلکس سبز مایل به آبی است که شدت رنگ آن متناسب با غلظت آلبومین موجود در نمونه می‌باشد که با استفاده از ریدر دستگاه الایزا (BioTek، آمریکا) در طول موج ٦٣٠ نانومتر، مقدار آن اندازه‌گیری شد (Duly *et al.*, 2003).

- **تحلیل آماری داده‌ها:** تمامی داده‌ها به‌شکل میانگین± انحراف معیار ارائه شده و با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۳ و به‌منظور مقایسه بین گروه شاهد و تیمار با یکدیگر و در هفته‌های متوالی به‌ترتیب از آزمون T مستقل (Unpaired Samples T-test) و آزمون T دو نمونه (Paired Samples T-test) استفاده شد. مقدار $p<۰/۰۵$ برای تعیین سطح معنی‌دار بودن تفاوت بین گروه‌ها در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

مطابق جدول ۱ میانگین مقدار پروتئین تام تخم‌مرغ‌های مرغان هفته ۹ گروه شاهد، ۰/٤٥ گرم بر دسی‌لیتر و میانگین میزان آلبومین زرده تخم‌مرغ‌های مذکور، ۰/٤ گرم بر دسی‌لیتر بود. بیشترین میزان افزایش گلوبولین در گروه تیمار در هفته نهم بعد از اولین تزریق بود. با توجه به جدول ۱ و مقایسه میانگین‌ها، مشخص گردید که افزایش میزان پروتئین و گلوبولین‌ها بین هفته‌های ۹ و ۱۰ نسبت به گروه شاهد معنی‌دار بود ($p<۰/۰۵$). همچنین با مقایسه میانگین‌های گروه شاهد و تیمار، کاهش میزان گلوبولین‌ها بین هفته‌های ۹ و ۱۱ نیز معنی‌دار بود ($p<۰/۰۵$). مقایسه میانگین میزان پروتئین و گلوبولین‌ها بین هفته‌های ۱۰ و ۱۱ نشان داد که کاهش آن‌ها نیز معنی‌دار بود ($p<۰/۰۵$). طبق جدول ۱ میانگین پروتئین تام و گلوبولین‌های زرده در هفته‌های مختلف با گروه شاهد که در طی این دوره تقریباً نتایج یکسان داشته است در هفته‌های ۹ و ۱۰ اختلاف معنی‌دار داشت ولی در هفته ۱۱ بین گروه شاهد و تیمار اختلاف غیرمعنی‌دار بود. بیشترین میزان افزایش گلوبولین در گروه تیمار مربوط به هفته نهم بعد از اولین تزریق بود. همچنین اثر این تزریق تا هفته دهم به‌طور معنی‌داری ادامه یافت ($p<۰/۰۵$)، ولی در هفته یازدهم افت قابل توجهی نشان داد به‌طوری‌که میانگین میزان گلوبولین در گروه تیمار تفاوت معنی‌داری با میانگین گروه شاهد نداشت.

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

گروه	فرانسجه‌های مورد سنجش								
	هفته ۹			هفته ۱۰			هفته ۱۱		
	پروتئین تام (gr/dl)	آلبومین (gr/dl)	گلوبولین (gr/dl)	پروتئین تام (gr/dl)	آلبومین (gr/dl)	گلوبولین (gr/dl)	پروتئین تام (gr/dl)	آلبومین (gr/dl)	گلوبولین (gr/dl)
شاهد	۰/٤٥±۰/۰۸	۰/٤±۰/۰٦	۰/۰٥۱±۰/۰۳	۰/٤٥±۰/۰۹	۰/٤±۰/۰٥	۰/۰٤٧±۰/۰٤	۰/٤٥±۰/۰٥	۰/٤±۰/۰٦	۰/۰٤٥±۰/۰۲
تیمار	۰/۸٥±۰/۱۳*[a]	۰/٤±۰/۰۷	۰/٤٥±۰/۱۳*[a]	۰/۸۲±۰/۰۸*[a]	۰/٤±۰/۰۳	۰/٤۲±۰/۰۸*[a]	۰/٤۳±۰/۰۲[b]	۰/٤±۰/۰٥	۰/۰۳۹±۰/۰۲[b]

abc: حروف انگلیسی متفاوت در هر ردیف و پارامتر اختلاف معنی‌دار را نشان می‌دهد ($p<۰/۰۵$).

*: نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین گروه تیمار و شاهد در هر ستون می‌باشد($p<۰/۰۵$).

بحث و نتیجه‌گیری

مقایسه میانگین گلوبولین‌های زرده تخم‌مرغ‌ها به‌صورت هفتگی در پژوهش حاضر، نشان داد که این افزایش تا هفته دهم ادامه داشته و سپس کاهش پیدا می‌کند (جدول ۱). نتایج فوق نشان می‌دهد، با ایمن‌سازی سه مرحله‌ای، بهترین زمان برای تولید حداکثر میزان آنتی‌بادی در زرده تخم‌مرغ، هفته نهم بعد از اولین تزریق می‌باشد. از طرف دیگر نتایج پژوهش حاضر مشخص کرد که در هفته نهم به‌طور میانگین در زرده تخم‌مرغ‌های گروه تیمار میزان پروتئین تام gr/dl ۰/۸۵ و میزان گلوبولین‌های آن gr/dl ۰/٤٥ بود (جدول ۱)، که این میزان آنتی‌بادی از نظر اقتصادی در مقایسه با تولید آنتی‌بادی به روش‌های دیگر بسیار مقرون به صرفه می‌باشد. در تائید این یافته گزارش شده که تولید آنتی‌بادی با استفاده از ایمن‌سازی مرغ و جداسازی از زرده تخم‌مرغ، علاوه بر امکان‌سازی تولید آنتی‌بادی در حجم انبوه، هزینه تولید و نگه‌داری کمتری نیز دارد، زیرا مرغ تخم‌گذار می‌تواند آنتی‌بادی معادل با ۹۰-۷۵ میلی‌لیتر از سرم را طی یک هفته در زرده تخم‌مرغ تولید کند، درحالی‌که پستانداران بزرگ جثه می‌توانند آنتی‌بادی‌های بیشتری از مرغ تولید کنند که در این‌حالت نیز هزینه‌های نگه‌داری و تولید بسیار بالاتر می‌باشد (Chalghoumi *et al*., 2009). همچنین نشان داده‌اند که با روش‌های تخلیص مختلف می‌توان بیش از ٤٠ میلی‌گرم آنتی‌بادی از هر زرده تخم‌مرغ خالص‌سازی کرد که در این صورت در عرض یک ماه ۱/۵-۱/۲ گرم آنتی‌بادی خالص جداسازی خواهد شد. در ضمن، این آنتی‌بادی کمپلمان سرم پستانداران را فعال نمی‌سازد و با روماتوئید فاکتور و FC رسپتور موجود در سرم پستانداران واکنش نشان نمی‌دهد (Saadati *et al*., 2005). از مزایای استفاده از زرده تخم‌مرغ به عنوان منبع تولید آنتی‌بادی، کاهش موارد استفاده از حیوانات می‌باشد. به دلیل اینکه مرغ‌ها قادرند در مقایسه با حیوانات آزمایشگاهی مقادیر بالاتری از آنتی‌بادی تولید کنند، می‌توانند جایگزین مناسبی برای حیوانات آزمایشگاهی به شمار آید (Nassiri *et al*., 2016).

براساس مطالعات انجام شده پیشین، وود وارد و همکاران گزارش کرده‌اند که پس از تزریق سوم باکتری کشته‌شده *سالمونلا تیفی‌موریوم* در مرغ، مقدار قابل توجهی IgY تولید می‌شود (Woodward *et al*., 2002). سعادتی و همکاران نیز در سال ۱۳۸۷ در مطالعه خود نشان دادند که با استفاده از تزریق باکتری کشته‌شده بوتولینیوم نروتوکسین در مرغ، سیستم ایمنی تحریک شده و میزان قابل قبولی آنتی‌بادی IgY تولید می‌گردد که علی‌رغم این‌که این امر با اولین دوز تزریقی آغاز می‌شود ولی حداکثر میزان آنتی‌بادی پس از تزریق یادآور چهارم تولید شده و تا هفته دوازدهم ادامه می‌یابد که نتایج پژوهش مذکور با یافته‌های مطالعه ما که نشان داد در هفته نهم بیشترین میزان تولید آنتی‌بادی حاصل شده، همخوانی ندارد که بنظر می‌رسد این تفاوت به دلیل اختلاف در روش تزریق و وزن مولکولی آنتی‌ژن باشد (Saadati *et al*., 2005).

مطالعات نشان داده‌اند که ایمنی‌زایی غیرفعال توسط تجویز خوراکی آنتی‌بادی‌های اختصاصی از منابع مختلف به عنوان مثال کلستروم مصون‌شده یا ایمونوگلوبین زرده تخم‌مرغ (IgY) می‌توانند استراتژی‌هایی اقتصادی و مفید برای مهار عفونت‌های گوارشی در انسان و حیوانات باشند (Mine and

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

براساس یافته‌های پژوهش حاضر چنین نتیجه‌گیری می‌شود که می‌توان از زرده تخم‌مرغ، به‌عنوان منبعی برای تولید آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال علیه باکتری *لیستریا مونوسایتوژنز* استفاده کرد و همچنین تولید آنتی‌بادی پلی‌کلونال علیه باکتری مذکور یک روش مناسب و مقرون به صرفه می‌باشد. لذا می‌توان از آنتی‌بادی‌های تولیدشده برای طراحی و ساخت کیت‌های سرولوژیک تخصصی برای استفاده در روش‌های ایمونولوژیکی مهمی نظیر الایزا، آگلوتیناسیون و ایمنوفلورسنت و یا مقاصد درمانی استفاده کرد. از طرف دیگر ازآنجایی‌که که تخم مرغ از منابع غذایی روزانه انسان‌ها می‌باشد لذا به‌نظر می‌رسد که از این طریق می‌توان در جهت بهبود ایمنی در جوامع انسانی هم گام‌های مثبت برداشت.

سپاسگزاری

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

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تضاد منافعی ندارند.

منابع

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

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

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