Shahid Bahonar University of Kerman
Agricultural Biotechnology Journal
Iranian Biotechnology Society
Print ISSN: 2228-6705 Online ISSN: 2228-6500

IgY production in egg yolk against Salmonella typhimurium and salmonella enteritidis

Shima Eshaghi

MSc. of Animal Genetics and Breeding, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran. Tel: +98 9162793975 Email: shimaeshaghi95um@gmail.com

Mohammadreza Nassiri

*Author for correspondence: Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran. Tel: +98 51 38805738 Email: nassiryr@um.ac.ir

Mojtaba Tahmoorespour

Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran. Tel: +98 51 38805743 Email: tahmoores@um.ac.ir

Ali Javadmanesh

Associate Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran. Tel: +98 51 38805899 Email: javadmanesh@um.ac.ir

Abstract

Objective

Salmonella is a Gram-negative, anaerobic, flagellated bacterium of Salmonella type in Enterobacteriaceae family, which is known as a zoonosis infectious agent. In recent years, different types of antibiotics have been used to overcome the Salmonella infection; however, the increasing number of antibiotic-resistant bacteria, the provision of alternative methods seems be necessary. Specific immunoglobulin Y (IgY) originated from egg yolk causes passive immunity in the fetus, and extracting these antibodies from egg yolk is cheaper and more feasible than other antibodies. Numerous studies have shown that the egg yolk IgY has immunogenic function against a wide range of bacterial and viral

infections in mammals. The purpose of this study was to produce specific immunoglobulin Y against Salmonella typhimurium and Salmonella enteritidis bacteria in laying hens.

Materials and Methods

In the current study, six pullets were inoculated and boosted with one milliliter of killed Salmonella typhimurium and Salmonella enteritidis. Injections were done fortnightly until one week before egg production. After breast muscle injection of chickens, the eggs were collected, and the IgY was extracted from yolk by the Polson method with polyethylene glycol 6000. The produced IgY was approved by SDS-PAGE method. The specific indirect ELISA done by specificity test for purified IgY also approved the specific IgY against both Salmonella typhimurium and Salmonella enteritidis.

Results

The results of SDS - PAGE demonstrated the presence of two protein bands of 27 and 67 kDa representing light and heavy chains of IgY, respectively. The specific indirect ELISA method proved that the specific IgY against Salmonella typhimurium and Salmonella enteritidis was produced in the egg yolk.

Conclusions

It might be possible to administer the egg yolk containing specific IgY against both Salmonella typhimurium and Salmonella enteritidis, to induce passive immunity for preventing some pathogenic diseases in calves such as diarrhea.

Keywords: Laying hens, IgY, Salmonella, Egg yolk

Citation: Eshaghi S, Nassiri M, Tahmoorespour M, Javadmanesh A (2020) IgY production in egg yolk against Salmonella typhimurium and Salmonella enteritidis. Agricultural Biotechnology Journal 12 (3), 177-190.

Agricultural Biotechnology Journal12 (3), 177-190.

DOI: 10.22103/jab.2020.16014.1244

Received: September 12, 2020; Accepted: October 21, 2020

©Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.

در زرده تخم مرغ علیه باکتری های سالمونلا تیفی‌موریوم و انتریتیدیس Yتولید ایمنوگلوبین

شیما اسحقی مسکونی

دانش آموخته کارشناسی ارشد ژنتیک و اصلاح نژاد دام و طیور، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران. تلفن: ۰۹۱۶۲۷۹۳۹۷۵، ایمیل: shimaeshaghi95um@gmail.com

محمدرضا نصیری

* نویسنده مسئول، استاد گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران. تلفن: ۳۸۸۰۵۷۳۸-۰۵۱، ایمیل: nassiryr@um.ac.ir

مجتبی طهمورث پور

استاد گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران. تلفن: ۳۸۸۰۵۷۴۳-۰۵۱، ایمیل: tahmoores@um.ac.ir

علی جوادمنش

دانشیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران. تلفن: ۳۸۸۰۵۸۹۹-۰۵۱، ایمیل: javadmanesh@um.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۶/۲۲، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۷/۳۰

چکیده

هدف: سالمونلا یک باکتری گرم منفی، بی‌هوازی اختیاری و تاژکدار است که در جنس سالمونلا و در خانواده انتروباکتریاسه قرار دارد که به عنوان یک عامل بیماری عفونی مشترک در انسان و حیوانات شناخته شده است. در سال‌های اخیر، انواع مختلفی از آنتی بیوتیک‌ها برای مقابله با عفونت سالمونلا استفاده شده است که با افزایش تعداد باکتری‌های مقاوم به آنتی بیوتیک، استفاده از روش‌های جایگزین ضروری به نظر می‌رسد. ایمونوگلوبین Y (IgY) اختصاصی زرده تخم‌مرغ باعث ایجاد ایمنی غیرفعال در جنین می‌شود و استخراج این آنتی‌بادی‌ها از زرده تخم‌مرغ در مقایسه با سایر آنتی‌بادی‌ها ارزان‌تر و آسانتر هستند. مطالعات زیادی نشان دادند که IgY زرده تخم‌مرغ دارای عملکرد ایمنی‌زایی در تعداد زیادی از عفونت‌های باکتریایی و ویروسی در پستانداران هستند. هدف از انجام این مطالعه تولید IgY اختصاصی علیه باکتری‌های سالمونلا تیفی‌موریوم و انتریتیدیس در زرده تخم‌مرغ مرغ‌های تخم‌گذار بود.

مواد و روش ها: بدین منظور باکتری‌های کشته شده‌ی سالمونلا تیفی‌موریوم و انتریتیدیس به میزان یک میلی‌لیتر در عضله سینه شش قطعه مرغ تخمگذار نژاد لگهورن سفید در سن ۱۱ هفتگی تزریق شدند. تزریق‌ها هر دو هفته تکرار شده و یک هفته بعد از آخرین تزریق تخم‌مرغ‌ها جمع آوری و IgY زرده تخم‌مرغ با استفاده از روش پولسون و پلی‌اتیلن‌گلیکول ۶۰۰۰ استخراج شد. وجودIgYهای تولید شده به کمک PAGE - SDS تایید و وجود IgY های اختصاصی با انجام آزمون الایزای غیرمستقیم اختصاصی با استفاده از باکتری‌های کشته‌شده سالمونلا تیفی‌موریوم و سالمونلا انتریتیدیس تایید شد.

نتایج: نتایج PAGE-SDS حضور باندهای پروتئینی ۲۷ و ۶۷ کیلودالتون که مربوط به زنجیره‌های سبک و سنگین IgY هستند را تایید کرد و آزمون الایزای غیرمستقیم اختصاصی نشان‌دهنده تولید آنتی‌بادی اختصاصی علیه سالمونلا تیفی موریوم و انتریتیدیس در زرده تخم‌مرغ بود.

نتیجه‌گیری: ممکن است بتوان از زرده تخم مرغ‌های حاوی IgY اختصاصی برای *سالمونلا تیفی‌موریوم* و *انتریتیدیس*، با ایجاد ایمنی غیرفعال جهت جلوگیری از برخی از بیماری‌های گوساله مثل اسهال استفاده کرد.

کلید واژه ها: مرغ تخمگذار، IgY، سالمونلا، زرده تخم مرغ

مقدمه

پرورش ماکیان در ایران و انتشار آن از طریق این کشور تاریخچه‌ای بسیار کهن دارد. ایران (پرشیا) یک امپراطوری بزرگ از قرن پنج قبل از میلاد تا تقریبا قرن هفت میلادی بود و از هند (دهلی) تا دریاهای سیاه و مدیترانه گسترده بود (Mohammadifar and Mohammadabadi 2017). در آن زمان و بعد از آن، در قرون وسطی ایران در محل تقاطع راه‌ها برای حمل و نقل محصولات، ازقبیل ماکیان از شرق به غرب، هم از طریق خشکی و هم از طریق دریا قرار داشت. جنگ‌های زیادی در حوالی ایران و کشورهای همسایه در طی این دوره‌ها نیز توسعه و گسترش جمعیت‌های ماکیان را تسهیل کرد. حفاری‌های باستان‌شناسی حضور ماکیان را در ایران در زمان‌های باستان تأیید کرده است (Mohammadabadi et al. 2010). استخوان‌های یافت شده در ایران در سه منطقه وجود داشته‌اند: دو کشف در تپه یحیی[1] (جنوب شرقی ایران) به ترتیب متعلق به ۳۸۰۰ تا ۳۹۰۰ قبل از میلاد و ۱۰۰۰ قبل از میلاد و دیگری در تخت‌سلیمان (شمال غربی ایران) متعلق به ۱۰۰۰ قبل از میلاد (Mohammadifar and Mohammadabadi 2018). تخم‌مرغ به عنوان ماده مغذی شناسایی شده است که شامل مقدار زیادی آنتی‌بادی از جمله IgY در زرده تخم مرغ می‌باشد. IgY ترکیبی از دو شاخه سنگین (H) و دو شاخه سبک (L) می‌باشد و با پل‌های دی سولفیدی به یکدیگر متصل هستند و دارای وزن مولکولی۱۸۰ کیلودالتون بزرگتر از IgG در پستانداران می‌باشد (Gassmann et al. 1990). امروزه تکنولوژی نوین استفاده از آنتی‌بادی‌های زرده تخم‌مرغ به منظور کاربردهای تشخیصی و درمانی در حال توسعه می‌باشد.

[1] Tepe Yahya

آنتی‌بادی زرده تخم‌مرغ (IgY) ایمونوگلوبین غالب زرده تخم‌مرغ است و همتای IgG در پستانداران می‌باشد که امروزه کاربردهای گسترده‌ای پیدا کرده است (Richard et al. 2002). ایمونوگلوبین Y زرده تخم‌مرغ باعث ایجاد ایمنی غیرفعال در جنین می‌شود و استخراج این آنتی‌بادی‌ها از زرده تخم‌مرغ در مقایسه با سایر آنتی‌بادی‌ها ارزان‌تر و آسان‌تر می‌باشد (Gassmann et al. 1990). خواص ضد باکتریایی IgY یکی از مهمترین جنبه های مورد مطالعه IgY است. در بسیاری از گزارش‌ها نشان داده شده است که IgYمی‌تواند دارای عملکرد ایمنی‌زایی در عفونت‌های باکتریایی و ویروسی در موجودات زنده باشد (Van Nguyen et al. 2006). به طور تقریبی ۱۵۰۰ میلی گرم IgY می‌توان در هر ماه از مرغ‌های تخم گذار به دست آورد (۵–۲۵ میلی گرم در زرده تخم مرغ) که بین ۲–۱۰ درصد IgY اختصاصی برای آنتی‌ژن مورد نظرمی‌باشد (Carlander et al. 2003) که نشان دهنده روش ارزان‌تر و سریع‌تر برای تولید آنتی‌بادی پلی‌کلونال نسبت به دیگر منابع می‌تواند باشد. آنتی‌بادی‌های محلول که به آنها ایمونوگلوبین گفته می‌شود دسته‌ای از مولکول‌های سرم هستند که ارتباط نزدیکی با گیرنده‌های آنتی‌ژنی سلول های B دارند و اساساً از آنها مشتق شده‌اند. تمام ایمونوگلوبین‌ها دارای ساختار مشترک Y شکل هستند. روی شاخک‌های Y دو ناحیه ی متغیر برای اتصال به آنتی‌ژن (Fab) وجود دارد. پایه اسکلت Y ثابت بوده (Fc) و در اتصال آنتی‌ژن دخالتی ندارد (Chen et al. 1982). آنتی بادی‌های موجود درزرده تخم‌مرغ به نام IgY نامگذاری شده است. بنابراین، آنتی‌بادی IgY اختصاصی از مرغ تخمگذار توسط جوجه‌های واکسینه شده علیه آنتی‌ژن بدست می‌آید (Shimizu et al. 1988). در جوجه‌ها ایمنوگلوبین Y از نظر عملکردی شبیه ایمنوگلوبین (IgG) است و درست شبیه IgG از دو زنجیره سبک و دو زنجیره سنگین تشکیل شده است، اما تفاوت‌های بزرگی بین این دو ایمنوگلوبین وجود دارد. ایمنوگلوبین G دارای وزن مولکولی تقریبی ۱۵۰ کیلو دالتون می‌باشد در حالیکه ایمنوگلوبین Y دارای وزن مولکولی ۱۸۰ کیلودالتون می‌باشد. این بزرگی وزن ایمنوگلوبین Y به دلیل تفاوت‌های است که در دومین زنجیره سنگین IgY و اتصال به زنجیره های کربوهیدراتی است. منطقه ثابت در آنتی‌بادی IgY کوتاهتر بوده در نتیجه نسبت به IgG دارای انعطاف‌پذیری کمتری می‌باشد ساختار کلی ایمونوگلوبولین Y از چهار زنجیره پلی‌پپتیدی تشکیل شده است که اجزای آن متشکل از ۲ زنجیره سبک و ۲ زنجیره سنگین است که فرمول کلی آنها به صورت (L2H2 n) می‌باشد. زنجیره سنگین و زنجیره سبک از نواحی تشکیل شده‌اند که دارای ۱۱۵ اسید آمینه می‌باشند. این نواحی دارای نواحی بسیار محافظت شده سیستئین و تریپتوفان می‌باشد و ساختارهای پل مانند دی‌سولفیدی، در ایفای شکل سوم و کاربردی ایمونوگلوبولین‌ها مؤثرهستند. زنجیره سبک و سنگین بوسیله باندهای دی سولفیدی داخل زنجیره‌ای بهم متصل می‌گردند. نقاطی در انتهای اسیدهای آمینه زنجیره وجود دارد که بسیار متغیرند. نواحی متغیر زنجیره سنگین (VH) و نواحی متغیر زنجیره سبک (VL) پس از جفت شدن با هم، محل اتصال آنتی‌ژن را بوجود می‌آورند که خاصیت اتصال شوندگی اختصاصی با آنتی‌ژن اختصاصی خود دارند (Kumaran and Citarasu 2016). سندروم اسهال گوساله یکی از بیماری‌های شایع مؤثر در اکثر گوساله‌های گوشتی یا شیری، بره‌ها و خوک‌ها در هفته‌های اول زندگی می‌باشد. شیوع بیماری در حالت شدید می‌تواند منجر به مرگ یک سوم از گوساله‌ها شود. سندروم اسهال گوساله در هفته‌های اول تولد منجر به مرگ و میر، شیوع بیماری و کاهش بهروری که شامل: کندی در افزایش وزن گوساله‌ها، تأخیر در شروع بلوغ، کاهش تولید شیر در اولین دوره

شیردهی و تأخیر در زمان پرواربندی گوساله‌های گوشتی می‌شود، بنابراین شیوع اسهال در واحد دامپروری دارای اهمیت می‌باشد. از عوامل مهم و شناخته شده سندروم اسهال در واحدهای دامپروری روتاویروس،کروناویروس، اشرشیاکلی، آنتروتوکسینها، سالمونلاها، کریپتوسپریدیا و کوکسیدیا می‌باشند (Radostits et al. 2000). در بین عوامل فوق اشرشیاکلی، روتا و کروناویروس به لحاظ پراکندگی، کثرت بروز و خسارات اقتصادی، در نخستین روزهای تولد گوساله‌ها مهم بوده و بایستی پیشگیری شوند (Zeman and Thomson 1998). استراتژی‌های اخیر برای کنترل عوامل بیماریزای اسهال در گوساله‌ها برمبنای واکسیناسیون مادر می‌باشد، تا توسط انتقال آنتی بادی‌های غیرفعال از نتاج شان محافظت شود (Fernandez et al. 1998). این استراتژی اسهال را کاهش می‌دهد اما عفونت ویروسی یا ظهور نشانه‌های بالینی را نمی‌تواند مهار بکند (Parreño et al. 2010). اگرچه تیتر بالای آنتی‌بادی‌های گردش خون در گوساله‌های تازه متولد شده نقش مهمی در محافظت آنها در برابر عوامل عفونت باکتریایی و ویروسی مسبب اسهال به دلیل IgG بدست آمده از کلستروم دارند که این آنتی‌بادی از سرم به روده کوچک گوساله‌ها قابل انتقال می‌باشد (Besser et al. 1988). شدت بیماری اسهال توسط عوامل متعددی از جمله مدیریت گله، محیط زیست و وضعیت تغذیه و ایمونولوژیک میزبان افزایش می‌یابد (Carlander et al. 2000). این بیماری معمولا در گوساله‌ها در سنین بین دو تا هشت هفته ای مشاهده می‌شود و شدت آن با افزایش سن افزایش می‌یابد. دوره انکوباسیون بسیار کوتاه است (۱۲ تا ۲۴ ساعت) و اسهال در عرض ۵ تا ۷ روز خود محدود می‌شود، مگر اینکه عفونت‌های ثانویه باکتریایی رخ‌دهد، ایمونوگلوبولین (IgY) آنتی‌بادی زرده تخم مرغ است که به طور گسترده‌ای برای درمان و پیشگیری از عفونت‌ها در انسان و حیوانات مورد استفاده قرار گرفته است (Fernandez et al. 1998; Jahandar et al. 2019). اسهال، بیشترین میزان گزارش شده از نوزادان گوساله و علت اصلی مرگ و میر است، و به عنوان یک علامت انتوریت یکی از معضلات مهم سلامتی در بسیاری از مزارع مرتبط با گوساله‌های تازه متولد شده است که شمار قابل توجهی را می‌تواند از بین ببرد (Carlander et al. 2000). عفونت معمولا در گوساله‌های ۵ تا ۱۴ روزه رخ می‌دهد. خون و کیست روده ممکن است در مدفوع دیده شود. گوساله ها به کندی به درمان پاسخ می‌دهند و اغلب برای ۱ تا ۲ هفته بیمار می‌شوند. سالمونلا تیفی موریوم یک علت شایع در مبتلایان به عفونت در گوساله‌های تازه متولد شده است. بیماری به طور معمول به روده منتهی می‌شود و با اسهال حاد و درد شکمی مشخص می‌شود (Carlander et al. 2000). هدف از انجام این تحقیق تولید IgY اختصاصی علیه باکتری های سالمونلا انتریتیدیس و سالمونلا تیفی‌موریوم در زرده تخم‌مرغ مرغ‌های تخم‌گذار بود.

مواد و روش‌ها

تهیه باکتری‌های سالمونلا انتریتیدیس و سالمونلا تیفی‌موریوم: باکتری سالمونلا تیفی موریوم سویه ۱۴۰۲۸ و سالمونلا انتریتیدیس سویه ۱۶۲۴ از مرکز کلکسیون ملی ایران تهیه شد و با استفاده از محیط مک‌کانکی آگار به منظور شناسایی سویه های باکتری تخمیرکننده لاکتوز کشت داده شدند. همچنین مورفولوژی کلونی و سویه استاندارد به‌وسیله رشد بر روی محیط‌های

نوترینت آگار و محیط انتخابی دی اکسی کولات سیترات آگار[۲]، بیسموت سولفیت آگار[۳]، سالمونلا–شیگلا آگار[۴] و اکسیلوز لیزین داکسیکولات آگار[۵] تایید شدند. سویه‌های باکتریایی رشد کرده بر روی محیط مک‌کانکی آگار انتخاب شدند و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در محیط کشت[۶] BHI برای ۲۴ ساعت انکوباسیون شد. بعد از رشد در این محیط، سلول ها در ۳۰۰۰ دور برای ۱۵دقیقه سانتریفیوژ شدند. سلول‌ها با بافر PBS شسته شدند، و سپس با فرمالین ۳/۷ درصد به مدت یک شب در انکوباتور قرار گرفتند. سوسپانسیون به‌دست آمده سه بار در بافر PBS سانتریفیوژ و شستشو شد. سپس سوسپانسیون سلول‌ها در PBS و چگالی نوری معادل استاندارد $۱/۵ \times ۱۰^{۶}$ به میکروتیوب منتقل شد و سپس محلول سلول برای استفاده در یخچال نگهداری شد.

شرایط پرورش مرغ‌های تخم گذار: قفس‌های پرورش مرغ‌های تخم‌گذار جهت ایمن‌زایی و جمع‌آوری تخم‌مرغ‌ها آماده‌سازی شد. در مرحله بعد تعداد شش قطعه مرغ تخم گذار نژاد لگهورن سفید با سن ۱۱ هفته و شرایط دمایی ۱۹ درجه و روشنایی۱۲ ساعت به اتاق حیوانات آزمایشگاهی گروه علوم دامی‌دانشکده دانشگاه فردوسی مشهد منتقل شد. تعداد سه قطعه مرغ نیز به عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شد. برای شروع تخم‌گذاری در مرغ‌ها بتدریج مدت روشنایی تا ۱۶ ساعت افزایش یافت.

تزریق باکتری‌ها: اولین تزریق در هفته ۱۱ انجام گرفت. ادجوانت کامل فروند را به خوبی همزده تا روان گردد و در مرحله بعد ۰/۵ سی سی ادجوانت کامل را با ۰/۵ سی‌سی آنتی‌ژن محلول در PBS مخلوط گردید. این مقدار برای تزریق یک مرغ کافی است. جهت تزریق مرغ‌ها را مقید کرده و محل تزریق را ضدعفونی کرده و تزریق با عمق یک سانتی‌متر بصورت عمود بر عضله سینه، در دوطرف و در چهار ناحیه صورت گرفت. در مورد گروه شاهد تزریقات مشابه گروه کنترل بود ولی محلول تزریق فاقد آنتی‌ژن سالمونلا بود و فقط حاوی بافر فسفات سالین بود. ۰/۵ سی‌سی ادجونت کامل فروند و ۰/۵ سی‌سی PBS مخلوط و به گروه شاهد تزریق شد. دومین و سومین تزریق هر دو هفته بعد از اولین تزریق صورت گرفت.

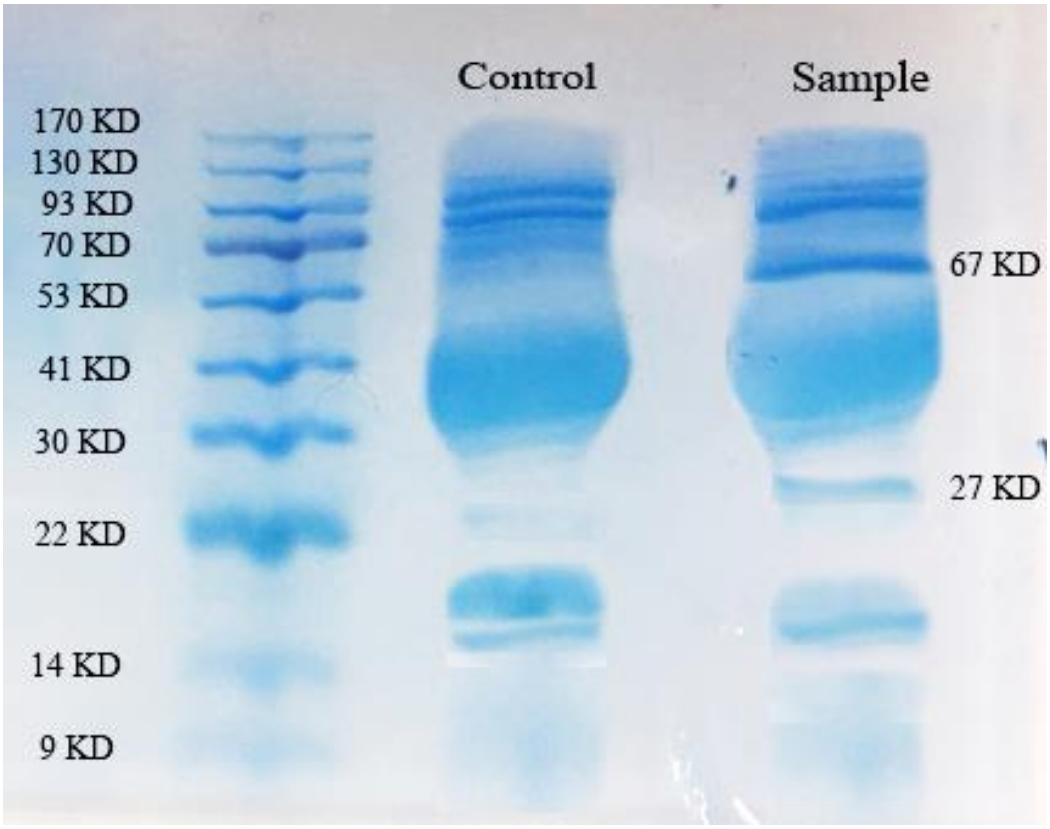
جمع‌آوری و ذخیره تخم‌مرغ‌ها: از آنجایی که هدف بررسی تولید آنتی‌بادی Y در تخم‌مرغ بود، تخم‌مرغ‌ها یک هفته بعد از آخرین تزریق (۲۳ هفتگی) روزانه جمع‌آوری شدند و برای خالص سازی IgY در یخچال و در دمای ۴ درجه سانتی گراد با ثبت تاریخ جمع‌آوری و ذخیره گردید. جداسازی IgY با استفاده از پلی‌اتیلن‌گلیکول ۶۰۰۰ انجام شد (Polson et al. 1980) و بررسی بررسی IgY به روش الکتروفورز SDS-PAGE انجام گردید (Mousavi et al. 2021). الایزای غیرمستقیم نیز طبق روش توصیف‌شده توسط بصیری و همکاران انجام گرفت (Basiri et al. 2012).

نتایج

[2] Deoxycholate citrate agar
[3] Bismuth sulfite agar
[4] Salmonella – Shigella agar
[5] Xylose Lysine Deoxycholate agar
[6] Brain Heart Infusion

نتایج ایمنی‌زایی جوجه‌ها بوسیله آنتی‌ژن سالمونلا انتریتیدیس و سالمونلا تیفی‌موریوم: به منظور بررسی قابلیت ایمنی‌زایی و همچنین تولید IgY اختصاصی علیه آن، به‌عنوان یک آنتی‌ژن همراه با ادجوانت فروند به گروه مرغ‌های مورد مطالعه تزریق شد. نتایج خالص‌سازی با استفاده از پلی‌اتیلن‌گلیکول ۶۰۰۰ نشان دادند که IgY از زرده تخم‌مرغ با روش پولسون و استفاده از پلی‌اتیلن‌گلیکول ۶۰۰۰ با موفقیت خالص‌سازی گردید.

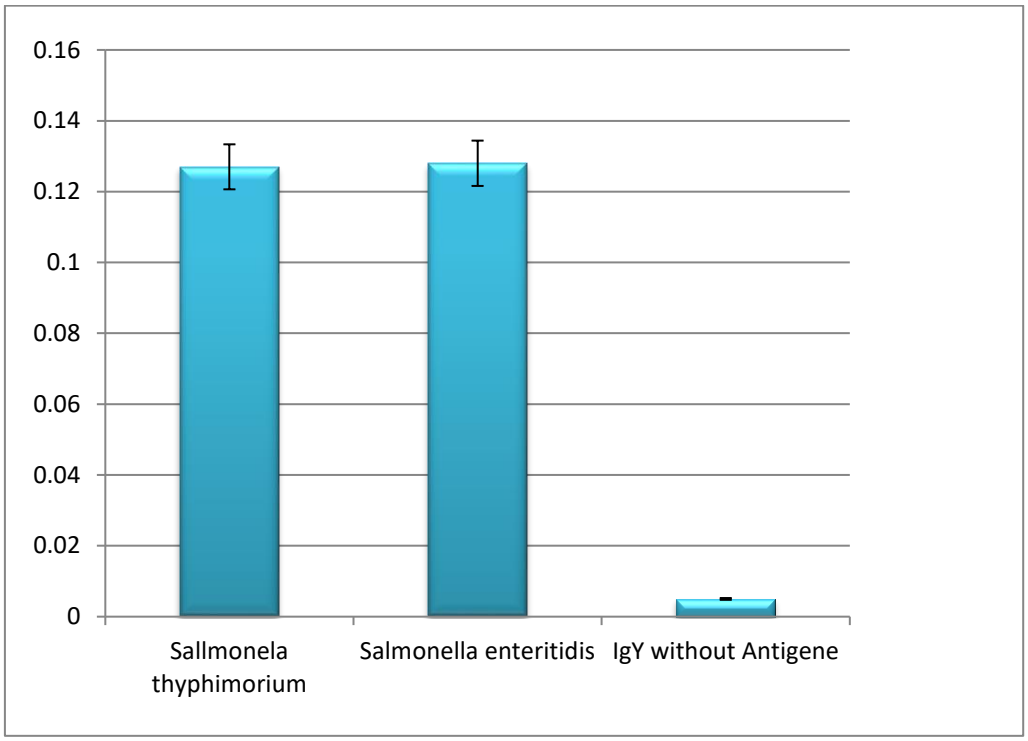
نتایج استخراج و سنجش IgY تولیدی در پاسخ به آنتی‌ژن سالمونلا : نتایج بدست آمده از الکترفورز SDS-PAGE حضور باندهای پروتئینی ۲۷ و ۶۷ کیلودالتون که موید حضور زنجیره‌های سبک و سنگین IgY است را نشان داد (شکل ۱).



شکل ۱. الکتروفورز ژل SDS-PAGE نشان‌دهنده باندهای IgY تخصصی در گروه تیمار نسبت به شاهد

Figure 1. SDS-PAGE showed specific IgY bands in control vs. treated groups

آزمون الایزای غیرمستقیم: اتصال ۰,۱۳ درصد آنتی‌بادی IgY با آنتی ژن ها نشان از تولید صحیح آنتی‌بادی IgY بر علیه گونه‌های مورد مطالعه و همچنین اختصاصیت این آنتی‌بادی‌ها برای دو گونه سالمونلا تیفی‌موریوم و سالمونلا انتریتیدیس می‌باشد (شکل ۲).



شکل ۲- اختصاصیت IgY تولید شده

Figure 2- Specificity of the produced IgY

بحث

نیاز به جایگزینی درمان‌های آنتی‌بیوتیکی علیه سالمونلا از یک سو و سهولت تولید انبوه آنتی‌بادی زرده تخم‌مرغ از سوی دیگر، IgY را به عنوان گزینه مناسبی برای کاربرد درمانی علیه این باکتری مطرح ساخته است. تولید IgY مستلزم ایمن سازی پرنده با آنتی‌ژن مورد نظر است که برای این منظور در تحقیقات مختلف از عصاره لیز سلولی یا آنتی‌ژن خالص و یا DNA رمز کننده آنتی‌ژن استفاده می‌شود. مطالعات به‌منظور افزایش اختصاصیت و پیشگیری از بروز واکنش‌های متقاطع با سایر باکتری های موجود در دستگاه گوارش، بیشتر بر استفاده از آنتی‌ژن‌های خالص باکتری معطوف شده اند که در این مطالعه از باکتری‌های سالمونلا تیفی‌موریوم و انتریتیدیس استفاده شده است. بهترین زمان تزریق سن تخم‌گذاری مرغ‌ها می‌باشد (Leenaars and Hendriksen 2005). یک هفته بعد از اولین تزریق تخم‌ها حاوی IgY اختصاصی موردنظر خواهند بود (Bollen and Hau 1996) اما مقدار بیشینه تیتر آنتی‌بادی IgY در تخم‌مرغ بعد از سه هفته از اولین تزریق (Trott et al. 2008) و یا ۲ هفته بعد از دومین تزریق یادآور (Schade et al. 2005) ایجاد شد. در مطالعه حاضر، سن ۱۵ هفتگی برای تزریق انتخاب شد.

در پژوهشی Pauly et al. (2009) سطوح IgY را در یک دوره دو ساله مورد بررسی قرار دادند و نتایج آن‌ها نشان داد که ظرفیت تخم‌گذاری درمرغ‌های تخم گذار در سال دوم کاهش می‌یابد اما محتوای IgY کل بیشتر شده بود (Pauly et al. 2009). در این پژوهش جهت تخلیص IgY از زرده تخم مرغ روش مبتنی بر استفاده از پلی‌اتیلن‌گلیکول (PEG) به دلیل خلوص بالا، هزینه پایین و سهولت فرایند نمونه‌گیری نسبت به روش‌های دیگر استخراج IgY انتخاب شده است (Santos et al. 2014). یافته های Bollen and Hau (1996) نشان می‌دهد که از زمان القای پاسخ ایمنی در مرغ به‌علت مواجه با عوامل آنتی‌ژنیک، ۶ تا ۷ روز طول می‌کشد تا این ایمنی به صورت ترانس اوواریال (انتقال از مادر به جوجه از طریق تخم) به تخم منتقل شود (Bollen and Hau 1996). یک هفته بعد از اولین تزریق تخم‌ها حاوی IgY اختصاصی مورد نظر خواهند بود (Bollen and Hau 1996) اما پیک تیتر آنتی‌بادی IgY در تخم‌مرغ بعد از یک هفته از اولین تزریق (Trott et al. 2008) و یا ۲ هفته بعد از تزریق یادآور (Schade et al. 2005) ایجاد می‌شود. در مطالعه Lee et al. (2002) با استفاده از باکتری سالمونلا تیفی‌موریوم و اینتریدیس، فعالیت اختصاصی IgY بعد از یک هفته از تزریق شروع به افزایش کرده بود و سپس به طور ثابتی افزایش یافته بود (Lee et al. 2002). مطالعه Thibodeau et al. (2017) نشان داد که تخم‌مرغ‌های تولید شده پس از تزریق غلظت بالایی از هر دو آنتی‌بادی را دارا بودند (Thibodeau et al. 2017)، در مطالعه حاضر تخم‌مرغ‌های تولید شده پس از تزریق غلظت بالایی را نشان دادند. نتایج SDS-PAGE نشان دادند که بخش‌های مختلف IgY خالص سازی شده در تحقیق حاضر با زنجیره سنگین و سبک مورد انتظار برای IgY مطابقت داشت (Amro et al. 2018). در نتیجه، زنجیره سنگین با ۶۵ کیلو دالتون و زنجیره سبک با ۲۷ کیلو دالتون توسط SDS PAGE تایید شد. زنجیره سنگین تقریبا با ۶۵ کیلودالتون و زنجیره سبک با حدود ۲۷ کیلودالتون، نشان می‌دهد که پروتئین خالص از IgY زرده تخم مرغ بدست آمد. در این مطالعه، زنجیره سنگین با ۶۷ کیلو دالتون و زنجیره سبک با ۲۷ کیلو دالتون توسط SDS PAGE تایید شد.

همچنین Amro et al. (2018) امکان تولید آنتی‌بادی IgG از تخم‌مرغ‌های مرغ با سیستم ایمنی بوسیله واکسیناسیون با سالمونلا تیفی‌موریوم، تایید کردند. در مطالعه حاضر، تولید IgY بر علیه باکتری های سالمونلا تیفی‌موریوم و سالمونلا انتریتیدیس تایید شد (Amro et al. 2018). در مطالعه حاضر اثر محافظتی آنتی‌بادی‌های تخم‌مرغ بر عفونت سالمونلا انتریتیدیس در دو آزمایش عفونی بر روی مرغ‌های دارای خصوصیات پاتوژن با دوزهای مختلف کنترل شده است. پودر تخم‌مرغ حاوی آنتی‌بادی که از تخم‌مرغ، مرغ تخمگذار توسط جوجه‌های ایمن شده با سالمونلا انتریتیدیس تهیه شده بود به عنوان خوراک افزودنی مورد استفاده قرار گرفت (Jahandar et al. 2019; Nassiri et al. 2016) در بین ایمونوگلوبولین‌های پرندگان بیشترین مطالعه روی ایمونوگلوبولین‌های بوقلمون و مرغ انجام شده است. IgY مرغ دارای ۵ جایگاه است (V و C1-C4) که در پستانداران این تعداد ۴ جایگاه می‌باشد. در مقابل، دارای نواحی تعویض می‌باشد که به IgY انعطاف‌پذیری محدود در نواحی C2-C1 و C3-C4 می‌دهد. همین محدودیت انعطاف‌پذیری IgY پرندگان معرف خواص بیوشیمیایی منحصر به فرد است. در ناحیه Cv2 ناحیه ی بسیار متراکمی وجود دارد که به دنبال تکامل صورت گرفته در پستانداران، تشکیل و بیان این نواحی لولایی توسط ژن‌ها صورت می‌گیرد، آزمایش‌ها

نشان می‌دهد که IgY دارای زنجیره سنگین بزرگتری نسبت به IgG پستانداران بوده و ازنظر آنتی‌ژن متفاوت تر از زنجیره‌ی سنگین پستانداران عمل می‌کند. استفاده از ایمونوگلوبولین Y (IgY)به عنوان یک روش جایگزین توسط مرکز اروپایی اعتبارسنجی روشهای جایگزین برای اصلاح و کاهش استفاده از حیوانات آزمایشگاهی توصیه شده است (Schade et al. 2005). در عرصه کاربردهای متنوع آنتی‌بادی‌ها، تکنولوژی جدید استخراج IgY از زرده تخم‌مرغ در حال گسترش می‌باشد. این ایمونوگلوبولین توسط مرغ تولید شده و به درون زرده تخم‌مرغ برای ایجاد ایمنی غیرفعال برای جنین، منتقل می‌شود که می‌توان با تزریق باکتری کشته‌شده ایکلای به عنوان منبع آنتی‌ژن به مرغ‌های تخمگذار و تکمیل دوره ایمنی‌زایی در مرغ به IgY اختصاصی دست یافت و می‌توان با توجه به بوجود آمدن سویه‌های مقاوم باکتریایی، از این محصول در کنار یا به جای آنتی‌بیوتیک‌ها استفاده کرد و از آن به عنوان مکمل‌های درمانی استفاده کرد (Nassiri et al. 2016).

نتیجه گیری: مرغ‌های ایمن شده با سالمونلا تیفی‌موریوم و سالمونلا انتریتیدیس ایمنی قابل توجهی به آن نشان دادند و سطح بالایی از IgY اختصاصی علیه آن تولید کردند. اولین واکنش بین هفته اول تا دوم پس از اولین تزریق مشاهده شد و بیشترین سطح آنتی‌بادی اختصاصی در ۸ هفته پس از اولین تزریق ایجاد شد. ممکن است بتوان از زرده تخم‌مرغ‌های حاوی IgY اختصاصی برای سالمونلا، با ایجاد ایمنی غیرفعال جهت جلوگیری از برخی از بیماری‌های گوساله مثل اسهال استفاده کرد

تشکر و قدردانی

این پژوهش با حمایت مالی دانشگاه فردوسی مشهد با گرنت شماره ۳/۴۵۶۷۱ انجام شد.

منابع

بصیری حسین، سید لطیف موسوی گرگری، رسولی ایرج، و همکاران (۱۳۹۱) همسانه سازی، بیان و تخلیص انتهای کربوکسیل زیرواحد C آنزیم اوره آز هلیکوباکتر پیلوری به منظور تولیدIgY در زردۀ تخم مرغ. مجله علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی. ۲۲ (۱)، ۳۱-۲۳.

نصیری محمد رضا، حق پرست علیرضا، محسن زاده محمد، و همکاران (۱۳۹۵) تولید و تخلیص ایمنوگلوبولین علیه اشریشیاکلای در زرده تخم مرغ. پژوهش های علوم دامی‌ایران: ۱ (۲)، ۱۵۴-۱۶۱.

موسوی زهرا، ازغندی مرجان، اسدزاده سمیه، و همکاران (۱۴۰۰) تولید ایمونوگلوبولینY اختصاصی در زرده تخم مرغ علیه برخی پاتوژن های اسهال گوساله. تحقیقات دامپزشکی و فرآورده های بیولوژیک. ۱۳۰، پذیرفته شده. 10.22092/vj.2020.128365.1647

References

Amro WA, Al-Qaisi W, Al-Razem F (2018) Production and purification of IgY antibodies from chicken egg yolk. J Genet Eng Biotechnol 16, 99-103.

Basiri H, Mousavi Gargari S L, Rasuli I et al. (2012) Cloning, expression and purification of C-terminal of Helicobacter pylori urease enzyme C subunit for production IgY in chicken egg yolk. Med Sci 22, 23-31 (In Persian)

Besser TE, McGuire TC, Gay CC, Pritchett LC (1988) Transfer of functional immunoglobulin G (IgG) antibody into the gastrointestinal tract accounts for IgG clearance in calves. J Viro 62, 2234-2237.

Bollen L, Hau J (1996) Immunoglobulin G in the developing oocytes of the domestic hen and immunospecific antibody response in serum and corresponding egg yolk. In vivo (Athens, Greece) 11, 395-398.

Carlander D, Kollberg H, Wejaker PE, Larsson A (2000) Peroral immunotherapy with yolk antibodies for the prevention and treatment of enteric infections. Immun Res 21, 1–6.

Carlander D, Wilhelmson M, Anders Larsson (2003) ImmunoglobulinY Levels in egg yolk from three chicken genotypes, Food Agri Immun 15, 35-40.

Chen C, Lehmeyer J, Cooper M (1982) Evidence for an IgD homologue on chicken lymphocytes. The J Immunol 129, 2580-2585.

Fernandez FM, Conner ME, Hodgins DC, et al. (1998) Passive immunity to bovine rotavirus in newborn calves fed colostrum supplements from cows immunized with recombinant SA11 rotavirus core-like particle (CLP) or virus-like particle (VLP) vaccines. Vaccine 16, 507-516.

Gassmann M, Thommes P, Weiser T, Hubscher U 1990. Efficient production of chicken egg yolk antibodies against a conserved mammalian protein. FASEB J 4, 2528–2532.

Jahandar MH, Nassiri M, Nasiri K, Haghparast A (2019) Production and Purification of Specific IgY Against InvG Protein of Salmonella typhimurium. Int J Infec 6 , e87683.

Kumaran T, Citarasu T (2016) IgY-technology: Produc-tion of antibodies in chickens and use in therapy of infectious diseases. Int J Sci Res Mod Educ 1, 29–35.

Lee EN, Sunwoo HH, Menninen K, Sim JS (2002) In vitro studies of chicken egg yolk antibody (IgY) against Salmonella enteritidis and Salmonella typhimurium. Poult Sci 81, 632-641.

Leenaars M, Hendriksen CF (2005) Critical steps in the production of polyclonal and monoclonal antibodies: evaluation and recommendations. Ilar J 46, 269-279.

Mohammdabadi MR, Nikbakhti M, Mirzaei HR et al. (2010) Genetic variablity in three native Iranian chicken populations of the Khorasan province based on microsatellite markers. Rus J Gnet 46, 504-508.

Mohammadifar A, Mohammdabadi MR (2017) The Effect of Uncoupling Protein Polymorphisms on Growth, Breeding Value of Growth and Reproductive Traits the Indigenous Chicken. Iran J Apl Anim Sci 7, 679-685.

Mohammdifar A, Mohammadabdi MR (2018) Melanocortin-3 receptor gene association with growth and egg production traits in Fars indigenous chicken. Malys Apl Bol 47, 85–90.

Mousavi Z, Azghandi M, Asadzadeh S et al. 2021. Production of specific immunoglobulin Y in egg yolk against some calf diarrhea pathogens. J Vet Res Bio Prod. In Press. In Persian. DOI: 10.22092/vj.2020.128365.1647

Nassiri M, Haghparast A, Mohsenzadeh M et al. (2016) Production and Purification Immunoglobulin against E. coli in Egg Yolk. Iranian J Anim Sci Res 8, 154-161. In Persian.

Parreño V, Marcoppido G, Vega C et al. (2010) Milk supplemented with immune colostrum: Protection against rotavirus diarrhea and modulatory effect on the systemic and mucosal antibody responses in calves experimentally challenged with bovine rotavirus. Vet Immun Immunopa 136, 12-27.

Pauly D, Dorner M, Zhang X et al. (2009) Monitoring of laying capacity, immunoglobulin Y concentration, and antibody titer development in chickens immunized with ricin and botulinum toxins over a two-year period. Poult Sci 88, 281–90.

Polson A, vonWechmar MB, Van Regenmortel MHV (1980) Isolation of viral IgY antibodies from yolks of immunized hens. Immunol Commun 9, 475-493.

Radostits OM, Bloodm DC, Gay CC (2000) Veterinary Medicine. A textbook of the diseases of cattle, sheep, pigs, goats and horses. Bailliere Tindall, London, 9th Edn PP, 779-809.

Richard AG, Thomas J, Kindt JK, Barbara OA (2002) Kuby Immunology. 5th Edition. P, 361-369.

Santos FN, Brum BC, Cruz PB et al. (2014) Production and characterization of IgY against canine IgG: prospect of a new tool for the immunodiagnostic of canine diseases. Brazil Arch Biol Tech 57, 523-531.

Schade R, Calzado EG, Sarmiento R et al. (2005) Chicken egg yolk antibodies (IgY-technology): a review of progress in production and use in research and human and veterinary medicine. Alt Lab Anim: ATLA, 129-154.

Shimizu M, Fittzsimmons RC, Nakai S (1988) Anti-E. coli lmmunoglobulin Y isolated from egg yolk of immunized chickens as a potential food ingredient. J Food Sci 53, 1360-1368.

Sun S, Mo W, Ji Y, Liu S (2001) Preparation and mass spectrometric study of egg yolk antibody (IgY) against rabies virus. Rapid Commun Mass Spectrom 15, 708-712.

Thibodeau A, Fravalo P, Perron A et al. (2017) Production and characterization of anti-Campylobacter jejuni IgY derived from egg yolks. Acta Vet Scand 59, 80.

Trott D, Hellestad E, Yang M, Cook M (2008) Additions of killed whole cell bacteria preparations to Freund complete adjuvant alter laying hen antibody response to soluble protein antigen. Poul Sci 87, 912-917.

Van Nguyen S, Umeda K, Yokoyama H et al. (2006) Passive protection of dogs against clinical disease due to Canine parvovirus-2 by specific antibody from chicken egg yolk. Can J Vet Res 70, 62.

Zeman DH, Thomson IU (1998) Diagnosis, treatment and management of enteric colibacillosis. Vet Med 21, 12-15.