DOI: 10.22092/vj.2020.128365.1647
شماره ۱۳۰ بهار ۱۴۰۰
تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های بیولوژیک

تولید ایمونوگلوبولین Y اختصاصی در زرده تخم مرغ علیه برخی پاتوژن‌های اسهال گوساله

• **زهرا موسوی**
گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
• **مرجان ازغندی**
گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
• **سعیده اسدزاده**
گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
• **الهه شهریاری**
گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
• **وحید کاظمی**
گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
• **فواد گاراژیان**
گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
• **امین کاظمی**
گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
• **علی جوادمنش (نویسنده مسئول)**
گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
تاریخ دریافت: ۱۳۹۸-۰۸-۱۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸-۱۲-۰۳
Email: javadmanesh@um.ac.ir

چکیده

بیماری اسهال در گوساله‌های شیری یکی از مشکلات عمده در صنعت دامپروری است که اغلب استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها برای درمان آن کارآمد نیستند و نیز ممکن است باعث ایجاد مشکلاتی نظیر مقاومت به آنتی‌بیوتیک شوند، در نتیجه استفاده از جایگزینی طبیعی برای آن‌ها همانند ایمونوگلوبولین Y (IgY) زرده‌ی تخم مرغ ممکن است راه حل مناسبی باشد. هدف از تحقیق حاضر، تولید ایمونوگلوبولین‌های اختصاصی Y علیه پاتوژن‌های مهم اسهال گوساله از قبیل کروناویروس، روتاویروس، اشریشیا کلی و کلستریدیوم پرفرجنس در زرده تخم مرغ بود. این آزمایش بر روی مرغان تخم‌گذار نژادهای لاین W۳۶ با دو تیمار (گروه شاهد و گروه واکسینه شده با واکسن سه گانه‌ی کروناویروس، روتاویروس، اشرشیا کلی و همچنین واکسن کلستریدیوم پرفرجنس) و هفت تکرار در هر گروه انجام شد. از SDS-PAGE جهت بررسی کیفی و از روش بردفورد به منظور بررسی کمی ایمونوگلوبولین Y استفاده گردید. نتایج نشان داد، باندهای مربوط به زنجیره‌ی سبک و سنگین IgY در گروه تیمار نسبت به گروه شاهد اختلاف قابل مشاهده‌ای داشت. بررسی با روش بردفورد نشان داد که غلظت IgY ترشح شده در زرده‌ی تخم‌مرغ گروه تیمار ۴,۷۲۹ mg/mL بود. نتایج مربوط به روش‌های پودر کردن نیز نشان داد که خشک نمودن پاششی موجب تخریب ولی خشک نمودن انجمادی باعث حفظ IgY زرده‌ی تخم‌مرغ شد. مطالعات تکمیلی در مورد سنجش فعالیت زیستی IgY اختصاصی تولید شده در این تحقیق ضروری است.

کلمات کلیدی: اسهال، گوساله، آنتی‌بیوتیک، ایمونوگلوبولین زرده تخم مرغ

Veterinary Researches & Biological Products No 130 pp: 69-75

Production of Specific Immunoglobulin Y in Egg Yolk Against Some Calf Diarrhea Pathogens

By: Mousavi, Z., Animal Breeding and Genetics, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran. Azghandi, M., Animal Breeding and Genetics, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran. Asadzahe, S., Animal Breeding and Genetics, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.. Shahriyari, E., Animal Breeding and Genetics, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran. Kazemi, V., Animal Breeding and Genetics, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran. Garajian, F., Animal Breeding and Genetics, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran. Kazemim, A., Animal Breeding and Genetics, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran. and Javadmanesh, A., (Corresponding Author) Animal Breeding and Genetics, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

Received: 2019-11-06 Accepted: 2020-02-22

Emali: javadmanesh@um.ac.ir

Calf diarrhea is a commonly reported disease and a major problem to the livestock industry. Although, antibiotics are used to treat diarrhea in calves, they are not effective against viruses as well as they may cause some other problems such as antibiotic resistance. As a result, natural antibodies such as immunoglobulin Y (IgY) from egg yolk could be a possible replacement for traditional antibiotics with less side effects. The objective of this research was production of specific IgY againt major calf diarrhea pathogens such as coronavirus, rotavirus, *E. coli*, and *Clostridium perfringens* in the egg yolk. For this purpose, this experiment was performed with two treatments (control and vaccinated group with the trivalent vaccine of coronavirus, rotavirus, and *E. coli* as well as *Clostridium perfringens* vaccine) and seven replicates in each group on W-36 Hy-Line laying hens. SDS-PAGE and Bradford methods were used for quality and quantity evaluations of IgY, respectively. Finally, the effect of freeze-drying and spray drying on IgY degradation was assessed by SDS-PAGE. The results showed that heavy and light chains of IgY were visible in the treatment group. The control group did not show any visible IgY fragments. Furthermore, the quantity of IgY secreted in egg yolk was estimated at 4.729 mg/ml. Finally, the comparison between two drying methods showed that freeze-drying did not damage IgY although spray-drying caused a substantial damage. Furthur experiments are required to validate the biological activity of the specific IgY produced in this study.

Key words: Diarrhea, Calf, Antibiotic, Egg yolk immunoglobulin

مقدمه

بیماری اسهال در گوساله‌های شیری یکی از مشکلات عمده در صنعت دامپروری است. این بیماری سهم قابل توجهی از هزینه‌های گاوداری‌ها را از طریق تلفات، درمان، کاهش وزن، افزایش حساسیت به بیماری‌های دیگر اعمال می‌کند (۱۱). از عوامل رایج در ایجاد این بیماری می‌توان به باکتری‌های کلستریدیوم پرفرجنس، اشرشیاکلای و ویروس‌هایی نظیر روتاویروس و کروناویروس اشاره کرد (۴ و ۱۹). اغلب برای درمان اسهال در گوساله‌ها از آنتی‌بیوتیک‌ها استفاده می‌کنند اما از آن‌جایی که آنتی‌بیوتیک‌ها در برابر ویروس‌ها کارآمد نیستند، استفاده از آن‌ها به عنوان ضد اسهال کارایی بسیار پایینی دارد. علاوه بر این استفاده از آنتی‌بیوتیک موجب ایجاد مشکلاتی از جمله، از بین بردن باکتری‌های مفید روده و آسیب به سلامت دستگاه گوارش، آزاد شدن اندوتوکسین‌ها و لیپوپلی ساکاریدهای دیواره‌های سلولی باکتری‌های گرم منفی، ایجاد سویه‌های باکتریایی مقاوم به آنتی‌بیوتیک (۱۲) و انتقال آن‌ها به انسان می‌شود. پیش‌بینی می‌شود که تا سال۲۰۵۰؛ تعداد مرگ و میر ناشی از مقاومت دارویی به ۱۰ میلیون نفر برسد که این رقم بیش‌تر از تمام مرگ

و میرهایی است که بوسیله سرطان در هر سال اتفاق می‌افتد (۲۳). در نتیجه استفاده از ترکیبات جایگزین آنتی‌بیوتیک‌ها با اثرات جانبی کمتر امری حیاتی است.

زرده‌ی تخم‌مرغ حاوی مقادیر بالایی از آنتی‌بادی‌های پلی کلونال است که ایمونوگلوبولین Y(IgY) نامیده می‌شود. استفاده از آنتی‌بادی زرده تخم‌مرغ به عنوان یک جایگزین موثر برای آنتی‌بیوتیک‌ها در کنترل بیولوژیکی بیماری‌ها اثرات آشکاری را نشان داد و می‌توان از آن به‌عنوان یک راه جدید در پیشگیری از بروز بیماری اسهال گوساله‌ها استفاده کرد (۱۹). بسیاری از گزارشات نشان می‌دهد که IgY دارای عملکرد ایمنی‌زایی در عفونت‌های باکتریایی و ویروسی در موجودات زنده می‌باشد. از مزایای استفاده از IgY می‌توان به موارد زیر اشاره کرد: ۱) می‌تواند بر علیه طیف وسیعی از پاتوژن‌ها تولید شود. ۲) هزینه‌ی تولید آن نسبتا پایین است. ۳) معمولاً فرآیند تولید سریع می‌باشد. ۴) تولید آنتی‌بادی اختصاصی به میزان زیاد با نیاز آنتی‌ژنی پایین (۹ و ۱۵). نتایج حاصل از بسیاری از مطالعات نشان داد که تجویز خوراکی IgY برای درمان انواع عفونت‌ها، مثل روتاویروس‌های گاوی، کروناویروس گاوی، اشرشیاکلای انتروتوکسیژنیک، گونه‌های سالمونلا، استافیلوکوکوس و زودوموناس موفقیت‌آمیز بوده است. همچنین پژوهشگران نشان دادند، ایمن کردن مرغ‌ها با واکسن‌های سه گانه‌ی روتاویروس، ایکلای و کروناویروس که عوامل ایجاد اسهال در گوساله هستند موجب تولید IgY اختصاصی علیه آن‌ها در تخم‌مرغ می‌شود (۱۹). از سوی دیگر وگا و همکاران ۲۰۱۱ از IgY اختصاصی برای روتا ویروس‌ها در ۱۴ روز اول زندگی گوساله‌های تازه متولد شده استفاده کردند که سبب جلوگیری از بروز اسهال شد (۲۲).

هدف از این پژوهش بررسی تولید آنتی‌بادی اختصاصی علیه باکتری‌های کلستریدیوم پرفرجنس، ای کلای و ویروس‌های روتاویروس و کروناویروس مسبب ایجاد اسهال در گوساله و نیز بررسی روش‌های مختلف خشک کردن در ایجاد ماندگاری این آنتی‌بادی بود.

مواد و روش‌ها

مدیریت و تغذیه

در ابتدا جهت کاهش خطا در طول دوره‌ی آزمایش پرندگانی با وزن و تولید نسبتا یکسان در آغاز تخم‌گذاری انتخاب شدند. در طول آزمایش دسترسی پرنده به آب و خوراک به‌صورت آزاد بود. برنامه نوردهی سالن بر اساس پیشنهاد کاتالوگ سویه‌ی های‌لاین W۳۶ بود. در طول دوره آزمایش دمای سالن در حدود ۱۶ تا ۱۸ درجه سانتی‌گراد تنظیم و توسط دماسنج کنترل شد. جیره‌های این پژوهش بر اساس جداول احتیاجات و ترکیب اقلام خوراکی گزارش شده در راهنمای پرورش و تغذیه‌ای سویه‌ی های‌لاین W۳۶ سال ۲۰۱۶ با استفاده از نرم‌افزار UFFDA فرموله شدند.

برنامه‌ی واکسیناسیون

از واکسن سه گانه‌ی کروناویروس، روتاویروس و ای کلای و همچنین واکسن کلستریودیوم پرفرجنس جهت تولید ایمنوگلوبولین Y در زرده‌ی تخم‌مرغ مرغان تخم‌گذار استفاده شد. واکسیناسیون در دو گروه تیمار و شاهد با هفت تکرار در هر گروه و در دوره سنی ۱۸ هفتگی در مرغان تخم‌گذار آغاز شد. دو هفته دوره‌ی عادت پذیری به شرایط تغذیه‌ای و محیطی صورت گرفت و پس از آن به میزان ۰٫۵ mL به صورت عضلانی در دو طرف قفسه‌ی سینه واکسیناسیون انجام شد (۱۹). واکسن اول در ۲۰ هفتگی و واکسن دوم پنج روز پس از آن تزریق شد. نمونه گیری به فاصله‌ی دو هفته پس از تزریق صورت گرفت.

تخلیص ایمونوگلوبولین Y

به منظور تخلیص از روش پولسون استفاده شد (۱۴). ۱۴ عدد زرده‌ی تخم‌مرغ جداشده از سفیده (از هر دو گروه شاهد و تیمار به صورت مجزا) به داخل فالکون ریخته شده (حدود ۱۵ mL) و سپس به حجم ۵۰ mL با استفاده از بافر سالین ۱۰۰mM، PH= ۷٫۶ رسانده شد. محلول به خوبی در همزن مغناطیسی هم زده تا محلول کاملا یکنواخت مات زرد رنگی بدست آمد. سپس ٪ ۳٫۵ (W/V) پلی‌اتیلن گلیکول ۶۰۰۰ افزوده و آنقدر به هم زده تا هیچ اثری از پلی‌اتیلن گلیکول وجود نداشته باشد. پس از انکوباسیون در دمای اتاق به مدت ۱۰ دقیقه نمونه به دو فاز تقسیم می‌شود. یک بخش حاوی مواد جامد و چربی‌هاست و بخش دوم حاوی ایمونوگلوبین و دیگر پروتئین‌ها. نمونه‌ها را در دور ۱۳۰۰۰g به مدت ۲۰ دقیقه در دمای چهار درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ کرده و مایع رویی را جدا کرده و در ظرف دیگر برای جداسازی چربی نگهداری می‌شود. حذف چربی به کمک فیلتراسیون از پنبه (این مرحله چهار بار تکرار می‌شود) صورت گرفت و حجم مایع فیلتر شده را سنجیده و یادداشت شد. مجدداً غلظت پلی اتیلن گلیکول را به ٪ ۸٫۵ (W/V) رسانیده شد. پس از آنکه پلی اتیلن گلیکول به خوبی حل گردید، محلول را در دور ۱۳۰۰۰g به مدت ۲۰ دقیقه در دمای چهار درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ کرده و محلول رویی را دور ریخته و رسوب را در ۱۰ mL از بافر فسفات سالین حل گردید. رسوب بدست آمده مجدداً در پلی اتیلن گلیکول ٪ ۱۲ حل کرده و در دور ۱۲۰۰۰g به مدت ۲۰ دقیقه در دمای چهار درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ کرده و محلول رویی دور ریخته و رسوب را نگهداری شد. در نهایت معادل ۱٫۶ mL بافر فسفات سالین اضافه شد. همچنین اثر خشک نمودن انجمادی (با استفاده از دستگاه Freez_Dry (آلمان- Vacuubrand) و خشک نمودن پاششی (۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه) بر فعالیت این پروتئین نیز مورد آزمایش قرار گرفت.

اندازه‌گیری کیفی به روش SDS-PAGE

از SDS-PAGE به منظور بررسی کیفی IgY استفاده شد. ۲۰ µL از محصول استخراج شده بر روی ژل پلی‌اکریل آمید ٪ ۱۶ الکتروفورز گردید. برای مشاهده‌ی باندهای مربوط به IgY از رنگ‌آمیزی به وسیله‌ی کوماسی بلو استفاده شد.

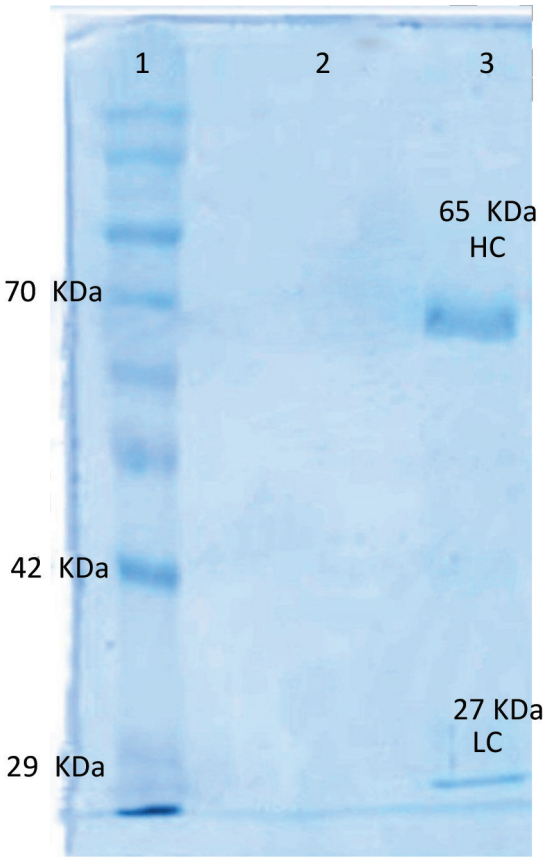
اندازه‌گیری کمی با روش بردفورد

روش کوماسی بلو یا برادفورد روشی ساده، کم هزینه و حساس و بر مبنای رنگ‌سنجی برای تعیین میزان کمی پروتئین می‌باشد. در این آزمایش، اندازه‌گیری غلظت پروتئین‌ها با روش برادفورد صورت گرفت (۳). به‌همین منظور ابتدا با استفاده از غلظت‌های ۰، ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰ و ۱۰۰ mg/mL از محلول پروتئین استاندارد هر کدام با دو تکرار، استاندارد

ساخته شد. در ادامه، از هر غلظت پروتئین استاندارد و همچنین نمونه‌های پروتئینی خالص‌سازی با دو تکرار به میزان ۲۰ میکرو لیتر داخل چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه ریخته شده و سپس ۲۰۰ میکرولیتر محلول برادفورد (که از قبل با دمای اتاق، هم‌دما شده بود) افزوده شده و به‌طور کامل مخلوط گردید و ۵ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد. سپس مقدار جذب نور در طول موج ۵۹۵ نانومتر توسط دستگاه میکرو پلیت ریدر ایپوک (بایوتک، آمریکا) اندازه‌گیری شد، و در نهایت، معادله خط همبستگی میزان جذب نور و غلظت پروتئین تعیین و غلظت نمونه‌ها محاسبه شد.

نتایج

به منظور بررسی کیفی نتایج استخراج IgY، پروتئین استخراج شده توسط روش SDS-PAGE مورد بررسی قرار گرفت. در این روش با توجه به تفاوت وزنی زنجیره سبک و سنگین ایمونوگلوبین Y و اندازه تقریبی آن، می‌توان آن‌ها را بر روی ژل شناسایی نمود و از کیفیت و خلوص IgY بدست آمده اطمینان حاصل کرد. بر اساس روش الکتروفورز روی ژل پلی‌آکریل آمید وزن ایمونوگلوبین Y به طور تقریبی ۱۸۰ kDa می‌باشد که زنجیره سبک آن حدود ۲۷ kDa و زنجیره سنگین حدود ۶۵ kDa می‌باشند. باندهای مربوط به IgY نسبت به گروه شاهد در تصویر زیر قابل مشاهده است (شکل ۱). همچنین غلظت IgY ترشح شده در زرده‌ی تخم‌مرغ گروه تیمار ۴,۷۲۹ mg/mL اندازه‌گیری شد و میزان IgY ترشح شده در زرده‌ی تخم‌مرغ گروه شاهد نزدیک به صفر و قابل محاسبه نبود. بررسی اثر روش پودر کردن زرده‌ی تخم‌مرغ به روش خشک نمودن انجمادی و خشک نمودن پاششی با استفاده از SDS-PAGE انجام شد. همانطور که در شکل ۲ مشخص است نمونه پودر زرده تخم‌مرغ به روش اسپری درایر برخلاف فریز درایر دارای کشیدگی زیاد از بالا چاهک تا انتهای آن بود. در چاهک (۳) خالص‌سازی IgY با استفاده از پودر زرده تخم‌مرغ فریزدرای شده استفاده شد که باندهای مربوط به IgY به درستی قابل مشاهده است.

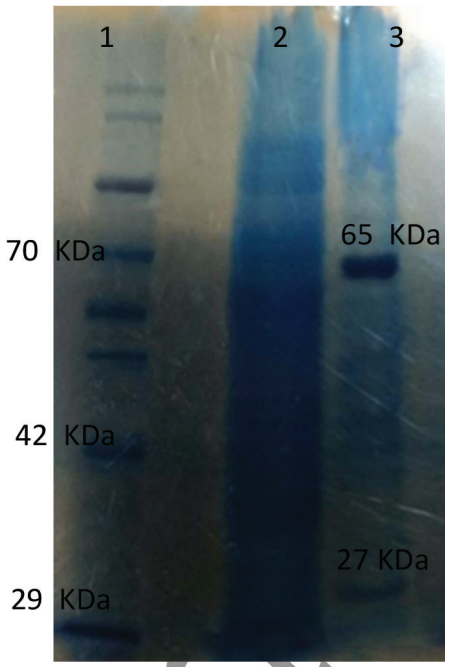


شکل۱- SDS-PAGE از IgY استخراج شده از زرده ی تخم مرغ واکسینه شده با واکسن سه گانه‌ی کروناویروس، روتاویروس و ای کلای و واکسن کلستریدیوم پرفرجنس.
۱) نشانگر پروتئینی ۲) گروه شاهد ۳) گروه تیمار که HC نشان دهنده ی زنجیره‌ی سنگین و LC نشان دهنده‌ی زنجیره ی سبک مربوط به IgY.

بحث

نتایج مطالعات فراوانی نشان داد که می‌توان از IgY تولید شده در زرده‌ی تخم‌مرغ جهت تولید جایگزین‌های آنتی‌بیوتیک برای مقابله با بسیاری از بیماری‌ها در گروه‌های مختلف جانوری استفاده کرد. در این راستا پژوهشگران نشان دادند ایمن‌سازی مرغ تخم‌گذار با واکسن‌های گاوی برای تولید آنتی‌بادی تخصصی برای این حیوانات هیچ عارضه جانبی بر سلامت و تولید به جز تورم موضعی در محل تزریق که در طی چهار هفته ناپدید می‌شود، ایجاد نمی‌کند (۱۹). در نتیجه می‌توان بدون هیچ آسیبی به میزان قابل توجهی آنتی‌بادی مورد نظر را با روشی ارزان تهیه نمود. مطالعات نشان دادند که IgY به دست آمده از مرغ واکسینه شده به طور همزمان با پاتوژن‌های مختلف، می‌تواند عملکردهای مختلفی را در برابر این عوامل بیماری‌زا نشان دهد. در این رابطه عوامل مختلفی بر تولید آنتی‌بادی در مرغ تخم‌گذار تاثیرگذار است. به‌عنوان مثال بررسی‌های انجام شده با نژادهای مختلف مرغ نشان داده است که پایه ژنتیکی حیوان تأثیر مستقیمی بر توانایی آن در تولید آنتی‌بادی‌ها دارد. این اثر به وجود پلی مورفیسم ژن‌های درگیر با تولید آنتی‌بادی‌ها مرتبط است (۷). به طور مثال زرده تخم‌مرغ نژاد Rhode Island Red بیش از دو برابر IgY (۸,۳۷ mg/mL) در مقایسه با نژاد لگهورن سفید (mg/mL ۳,۶۶) دارد (۱). در پژوهش حاضر آزمایش بر روی نژاد های لاین W۳۶ انجام شد که مقدار IgY تولیدی در زرده‌ی تخم‌مرغ آن چیزی بین این دو نژاد (۴,۷۲۹ mg/mL) می‌باشد که نشان می‌دهد تولید آنتی‌بادی IgY از تخم‌مرغ با تحریک سیستم ایمنی توسط واکسیناسیون با واکسن سه گانه‌ی کروناویروس، روتاویروس، اشرشیاکلای و همچنین کلستردیوم پرفرجنس به مقدار مطلوبی امکان پذیر است. عامل موثر دیگر بر میزان تولید IgY تغذیه است، زیرا عناصر مهم برای ایجاد پاسخ ایمنی مطلوب را فراهم می‌کنند (۵، ۶ و ۱۳). یکی از مهم‌ترین عوامل تاثیرگذار بر تولید آنتی‌بادی‌ها استفاده از ادجوانت‌ها است که از متداول‌ترین آن‌ها می توان به نمک‌های آلومینیوم و امولسیون‌های روغنی اشاره کرد (۸).

مطالعات فراوانی نشان دادند پس از اولین ایمنی‌زایی علیه بیماری توسط واکسیناسیون، فعالیت اختصاصی آنتی‌بادی در سرم مرغ‌های تخم‌گذار افزایش می‌یابد و از روز ۲۱ به بعد روند افزایشی قابل توجهی دارد که این افزایش در طول دوره آزمایش در سطوح بالا خود باقی می‌ماند (۲۰ و ۲۱). روش‌های مختلف برای ایمن‌سازی جهت تولید IgY در زرده‌ی تخم‌مرغ وجود دارد که از بین آن‌ها تزریق داخل عضله‌ی سینه برای



شکل ۲- SDS-PAGE از IgY استخراج شده زرده ی تخم مرغ پودر شده.

۱) مارکر پروتئینی

۲) IgY استخراج شده از زرده ی پودر شده به وسیله ی خشک نمودن پاششی

۳) IgY استخراج شده از زرده ی پودر شده به وسیله ی خشک نمودن انجمادی

مرغ‌های جوان و زیر پوست گردن برای مرغ‌های مسن، بهترین توصیه است. عموما انجام دو تا چهار تزریق یادآورد جهت فراهم آوردن سطوح بالای آنتی‌بادی برای چند هفته تا بیش از یکسال کفایت می‌کند (۲۱).

به منظور استفاده از آنتی‌بادی‌ها در بخش صنعت برای افزایش مدت زمان نگهداری و پودر کردن آن‌ها روش های مختلفی وجود دارد که از جمله رایج‌ترین آن‌ها می‌توان به خشک نمودن انجمادی و خشک نمودن پاششی اشاره کرد. خشک نمودن پاششی با استفاده از حرارت انجام می‌شود که از معمول‌ترین روش‌ها می‌باشد. از جمله معایب این روش ناکارآمد بودن برای پروتئین‌ها و آنتی‌بادی های حساس به حرارت می‌باشد (۱۷). روش خشک نمودن انجمادی از جمله روش‌های رایج برای فرآیند پودر کردن طیف گسترده‌ای از محصولات حساس به حرارت کاربرد دارد. از جمله این محصولات می‌توان به آنزیم‌ها، طعم دهنده‌ها، مواد معدنی، پروتئین‌ها و آنتی‌بادی‌ها اشاره کرد. این روش به‌عنوان یک روش تجاری و نسبتا کم هزینه که برای افزایش ماندگاری و پایداری مواد حائز اهمیت است (۱۶). پایداری ساختمان فضایی IgY در برابر اسید، آنزیم‌های پروتئولیتیک و حرارت نسبت به IgG پستانداران کمتر است. آزمایشات انجام شده در ارتباط با تاثیرات دما بر فعالیت اختصاصی IgY نشان دهنده‌ی آن است که قدرت اتصال IgY به آنتی‌ژن با افزایش دما و یا دوره‌ی زمانی تیمار حرارتی کاهش می‌یابد. این کاهش در دمای ۷۰ درجه به بالا در طی مدت زمان بیش از ۱۵ دقیقه اتفاق می‌افتاد. دناتوره شدن کامل زمانی اتفاق می‌افتد که دمای بالای ۷۵ درجه سانتی‌گراد اعمال شود (۲). انجام فعالیت‌هایی مربوط به انجماد در حالت خشک تاثیر سویی بر فعالیت آن ندارد مگر اینکه اینکار چندین مرتبه تکرار شود (۱۸). لیوفیلیزه نمودن محلول زرده تخم‌مرغ به دست آمده از مرغ‌های واکسینه شده سبب تهیه حدود ۲۰۰ تا ۳۰۰ mg پودر زرد رنگ حاوی IgY می‌گردد. نشان داده شده که میزان تیتر حاصل از محلول زرده تخم‌مرغ لیوفیلیزه شده (حاصل روش خشک نمودن انجمادی)، ۱۵ برابر بیشتر از تیتر آنتی‌بادی حاصل از محلول زرده تخم‌مرغ اسپری درایر شده (حاصل از روش خشک نمودن به روش پاششی) به روش جدا سازی اولتراسانتریفیوژ بوده است (۱۰). در این مطالعه با توجه به بررسی‌های انجام شده دو احتمال برای کشیدگی در چاهک مربوط به روش خشک کن پاششی وجود دارد ۱. مخلوط شدن سفیده تخم‌مرغ به زرده آن در هنگام پودر کردن. با توجه به اینکه پروتئین‌ها و آنتی‌بادی‌های زیادی در سفیده تخم‌مرغ وجود دارند، به منظور جداسازی IgY توصیه شده که زرده از سفیده به شکل کامل جدا گردیده شده باشد. تنها ایمنوگلوبین حاضر در زرده تخم‌مرغ IgY می‌باشد. ۲. تخریب پروتئین‌ها در عملیات پودر کردن. به منظور پودر کردن زرده تخم‌مرغ توصیه شده از روش فریزدرای استفاده گردد. فرآیندهای حرارتی و مکانیکی می‌تواند سبب تخریب پروتئین شود.

نتیجه‌گیری کلی

مطالعه حاضر نشان داد که ایمنوگلوبولین Y اختصاصی علیه پاتوژن‌های کروناویروس، روتاویروس، اشرشیا کلی و همچنین کلستریدیوم پرفرجنس با موفقیت در زرده تخم‌مرغ تولید شد هر چند که آزمایشات تکمیلی در مورد سنجش فعالیت زیستی ایمونوگلوبولین Y اختصاصی تولید شده و نیز تزریق بهینه واکسن جهت رسیدن به حداکثر تولید ایمنوگلوبولین در زرده تخم‌مرغ ضروری است.

تشکر و قدردانی

از شرکت بامداد رسپینا و نیز دانشگاه فردوسی مشهد جهت حمایت از این طرح صمیمانه تشکر و قدرانی می‌شود.

منابع مورد استفاده

1. Amro, W. A., W. Al-Qaisi, and F. Al-Razem. 2018. Production and purification of IgY antibodies from chicken egg yolk. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology* 16: 99-103.

2.Babai, R., G. Blum-Oehler, B. E. Stern, J. Hacker, and E. Z. Ron. 1997. Virulence patterns from septicemic *Escherichia coli* O78 strains. *FEMS Microbiology Letters* 149: 99-105.

3.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: 248-254.

4.Cho, Y. I., and K. J. Yoon. 2014. An overview of calf diarrhea-infectious etiology, diagnosis, and intervention. *Journal of veterinary science* 15: 1-17.

5.Du, E., W. Wang, L. Gan, Z. Li, S. Guo, and Y. Guo. 2016. Effects of thymol and carvacrol supplementation on intestinal integrity and immune responses of broiler chickens challenged with Clostridium perfringens. *Journal of Animal Science and Biotechnology* 7: 19.

6.Forte, C., L. Moscati, G. Acuti, C. Mugnai, M. P. Franciosini, S. Costarelli, S. Costarelli, G. Cobellis, and M. Trabalza-Marinucci. 2016. Effects of dietary Lactobacillus acidophilus and Bacillus subtilis on laying performance, egg quality, blood biochemistry and immune response of organic laying hens. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 100: 977–987.

7.Gehad, A. E., M. M. Mashaly, H. S. Siegel, E. A. Dunnington, and P. B. Siegel. 1999. Effect of genetic selection and MHC haplotypes on lymphocyte proliferation and interleukin-2 like activity in chicken lines selected for high and low antibody production against sheep red blood cells. Veterinary Immunology and Immunopathology 68: 13–24.

8.Heegaard, P. M., Y. Fang, and G. Jungersen. 2016. Novel adjuvants and immunomodulators for veterinary vaccines. *Methods in Molecular Biology* 1349: 63–82.

9.Hodek H. P., P. Trefil, J. Simunek, J. Hudecek, and M. Stiborova. 2013. Optimized protocol of chicken antibody (IgY) purification providing electrophoretically homogenous preparations. *International Journal of Electrochemical Science* 8: 113–24.

10.Marquardt, R. R., L. Jin, J. W. Kim, L. Fang, A. A. Frohlich

and S. K. Baidoo. 1999. Passive protective effect of egg-yolk antibodies against enterotoxigenic Escherichia coli K88+ infection in neonatal and early-weaned piglets. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 23: 283-288.

11.Martella, V., K. Bányai, J. Matthijnssens, C. Buonavoglia, and M. Ciarlet. 2010. Zoonotic 6 aspects of rotaviruses. *Veterinary Microbiology* 140: 246–255.

12.Oliver, S. P., and S. E. Murinda. 2012. Antimicrobial resistance of mastitis pathogens. Veterinary Clinics: *Food Animal Practice* 28: 165-185.

13.Perween, S., K. Kumar, S. K. Chandramoni, P. K. Singh, M. Kumar, and A. Dey. 2016. Effect of feeding different dietary levels of energy and protein on growth performance and immune status of Vanaraja chicken in the tropic. Veterinary world 9: 893.

14.Polson, A., M. B. von Wechmar, and M. H. van Regenmortel. 1980. Isolation of viral IgY antibodies from yolks of immunized hens. Immunological Communications 9: 475-93.

15.Rose, M. E., E. Orlans, and N. Buttress. 1974. Immunoglobulin classes in the hen's egg: their segregation in yolk and white. *European journal of immunology* 4: 521-523.

16.Roy, I., and M. N. Gupta. 2004. Freeze-drying of proteins: some emerging concerns. *Journal of Biotechnology and Applied Biochemistry* 39: 165–177.

17.Shahidi, F., and X. Q. Han. 1993. Encapsulation of food ingredients. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition.* 33: 501-547.

18.Shimizu, M., R. C. Fitzsimmons, and S. Nakai. 1988. Anti-E. coli immunoglobulin Y isolated from egg yolk of immunized chickens as a potential food ingredient. *Journal of Food Science* 53: 1360-1366.

19.Sitnik, O., P. Jawor, W. Kopeć, T. Skiba, and T. Stefaniak. 2013. Production and characterization of egg yolk antibodies against bovine alimentary tract pathogens. *Polish Journal of Veterinary Science* 16: 283-91.

20.Sun, J. H., Z. Jiang, and S. Hu. 2008. Effect of four adjuvants on immune response to F4 fimbriae in chickens. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 121: 107-112.

21.Sunwoo, H. H., E. N. Lee, K. Menninen, M. R. Suresh, and J. S. Sim. 2002. Growth inhibitory effect of chicken egg yolk antibody (IgY) on *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of Food Science* 67: 1486-1494.

22.Vega, C., Bok, M., Chacana, P., Saif, L., Fernandez, F., and V. Parreño. 2011. Egg yolk IgY: protection against rotavirus induced diarrhea and modulatory effect on the systemic and mucosal antibody responses in newborn calves. *Veterinary immunology and immunopathology* 142: 156-169.

23.Wang, S., X. Zeng, Q. Yang, and S. Qiao. 2016. Antimicrobial peptides as potential alternatives to antibiotics in food animal industry. *International journal of molecular sciences* 17: 603.