مقاله تحقیقی

مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۹۳، دوره ۶۹، شماره ۴، ۳۵۴-۳۴۷

Original Article

Journal of Veterinary Research. 69,4:347-354, 2014

تأثیر پادتن اختصاصی زرده تخم مرغ بر مرفولوژی مخاط روده وکاهش موضعی شدن باکتری اشریشیاکلی در جوجه‌های گوشتی

مریم شفیعی [۱] شعبان رحیمی [۱*] محمدامیر کریمی ترشیزی [۱] تقی زهرایی صالحی [۲]

۱) گروه علوم طیور، دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس، تهران- ایران

۲) گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران- ایران

(دریافت مقاله: ۱۵ آبان ماه ۱۳۹۳، پذیرش نهایی: ۲۰ آذر ماه ۱۳۹۳)

چکیده

زمینه مطالعه: بیماری کلی باسیلوز در طیور باکاهش رشد، کاهش عملکرد، تلفات بالا و خسارات اقتصادی زیادی همراه است. **هدف:** هدف از انجام این تحقیق بررسی تأثیر مصرف ایمونوگلوبین (IgY) اختصاصی اشریشیاکلی سروتیپ O2:K1، برمیزان کاهش باکتری مزبور در محتویات ایلئوم و تأثیر آن بر مرفولوژی مخاط روده بوده است. **روش کار:** درآزمایش اول، مرغ‌های تخم‌گذار تترا-اس ال قهوه‌ای (TSL) باآنتی‌ژن کامل اشریشیاکلی سروتیپ O2:K1 ایمن شدند. در تزریق نخست، از ۲۵۰µg آنتی-ژن همراه با ۲۵۰µg ادجوانت کامل فروند استفاده شد. دو یادآور، سه مرتبه و در فواصل ۱۴ روز، تزریق دوم و سوم با ماده ادجوانت ناقص فروند و تزریق چهارم بدون ادجوانت انجام شد. خون گیری و جمع‌آوری تخم‌مرغ‌ها ۱۰ روز پس از نخستین تزریق آنتی‌ژن انجام گرفت. درآزمایش دوم، ۱۸۰ قطعه جوجه نرگوشتی یک‌روزه (سویه کاب) در ۶ گروه، شامل ۳ تکرار و هر تکرار شامل ۱۰ قطعه پرنده به مدت ۴۲ روز پرورش داده شدند گروه‌های آزمایشی شامل گروه ۱ کنترل مثبت با تلقیح باکتری ولی بدون دریافت پادتن، گروه ۲ کنترل منفی بدون تلقیح باکتری و بدون دریافت پادتن، گروه ۳ تلقیح باکتری + دریافت پادتن در جیره غذایی، گروه ۴ تلقیح باکتری + دریافت پادتن در آب آشامیدنی، گروه ۵ دریافت پادتن در آب آشامیدنی، و گروه ۶ دریافت پادتن در جیره غذایی بوده است. **نتایج:** شمارش باکتری در محتویات ایلئوم گروه‌هایی که پادتن اختصاصی ضد اشریشیاکلی دریافت کرده بودند به طور معنی‌داری کاهش یافت ($p<0/05$). همچنین پادتن اختصاصی سبب بهبود سلامت روده در گروه‌های دریافت کننده پادتن نسبت به گروه کنترل مثبت (تلقیح باکتری بدون دریافت پادتن) گردید ($p<0/05$). **نتیجه‌گیری نهایی:** براساس یافته‌های این تحقیق می‌توان نتیجه‌گیری نمود که مصرف پادتن اختصاصی اشریشیاکلی در آب یا خوراک جوجه‌های گوشتی سبب کاهش موضعی شدن این باکتری در روده می‌شود.

واژه‌های کلیدی: جوجه گوشتی، ایمونوگلوبولین Y، مرفولوژی روده، اشریشیاکلی، پودرزرده

مقدمه

بیماری کلی باسیلوز عموماً مربوط به ماکیان بوده و اشاره به هرگونه عفونت موضعی و سپتی سمی داشته که به طور کامل و یا تا حدودی توسط اشریشیاکلی ایجاد می‌شود. به طوری که این بیماری مهلک از مهمترین دلایل ضررهای اقتصادی به صنعت طیور و علت اصلی کاهش رشد، کاهش تولید تخم مرغ، کاهش راندمان غذایی، افت لاشه و تلفات می‌باشد(۹). در چند سال اخیر بروز وشیوع کلی باسیلوز به سرعت افزایش یافته که ممکن است به یک مشکل جدی در صنعت طیور تبدیل شود (۱). اگرچه اشریشیاکلی جزو جمعیت طبیعی میکروبی دستگاه گوارش طیور است، اما مجموعه‌ای از آن به عنوان آسیب رسان‌ترین سروتیپ اشریشیاکلی در طیور شناخته می‌شوند و اشریشیاکلی پاتوژن پرندگان (Avian Pathogenic *Escherichia coli*) نامیده می‌شوند. در عفونت‌های ویروسی (ایجاد شده در انسان و حیوانات)، عفونت‌های مایکوپلاسمایی و یا تنش‌های زیست محیطی، اشریشیاکلی پاتوژن پرندگان (APEC) سروتیپ های O۱، O۲ و O ۷۸، (مخصوصاً سروتیپ‌های O۷۸، O ۲) بیش از ۸۰٪ علل عفونت ثانویه را در این بیماریها شامل می‌شود(۱،۹،۱۲).

رویکرد پیشگیری و کنترل عفونت (APEC) در صنعت طیور شامل بهبود روش‌های بهداشتی، واکسیناسیون، استفاده از روش‌های حذف رقابتی و ضد میکروبی می‌باشد. اگرچه سال‌ها است که اثرات مثبت آنتی بیوتیک‌های خوراکی در جهت مهار عوامل باکتریایی و همچنین بهبود سرعت رشد ثابت گردیده، اما با توجه به نگرانی‌های رو به گسترش جوامع انسانی مبنی بر حضور بقایای آنتی بیوتیک‌ها در محصولات حیوانی و محیط زیست و هم چنین امکان انتقال و گسترش مقاومت‌های باکتریایی به انسان، تمایل جهت دست یابی به جایگزین‌های مؤثر، بی خطر و ارزان قیمت افزایش یافته است.

استفاده از تخم مرغ به عنوان حامل فاکتورهای بیولوژیک مختلف در چند دهه اخیر مورد توجه قرار گرفته و از آن جایی که تخم مرغ در سبد غذایی انسان‌ها به طور معمول استفاده می‌شود تحقیقات در مورد تخم مرغ‌های غنی سازی شده با آنتی بادی‌های اختصاصی جهت درمان و کاهش میزان مصرف داروها و آنتی بیوتیک‌ها به طور وسیع در حال انجام است.

*)نویسنده مسؤول: تلفن: ۰۲۱-۴۴۸۲۹۲۰۰۴، نمابر: ۰۲۱-۴۴۸۲۹۲۲۰۰ Email: rahimi_s@modares.ac.ir

مواد و روش کار

تهیه تعلیق پادگنی: اشریشیاکلی سروتیپ O2: K1 مورد نیاز برای آزمایش‌های مزرعه‌ای، که از گروه میکروب‌شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران تهیه شده بود مورد استفاده قرار گرفت. برای تهیه آنتی‌ژن مورد نیاز جهت ایمن‌سازی مرغ‌های تخم‌گذار، پس از دو مرحله کشت باکتری در محیط Broth Nutrient و برآورد مقدار مورد نیاز جهت تزریق، باکتری مورد آزمون در دمای $37^{o}C$ و با سرعت گردش ۱۸۰ دور در دقیقه به مدت ۶h (انتهای فاز لگاریتمی) کشت گردید. سپس سلول‌ها توسط سانتریفوژ با سرعت g×۵۰۰۰ برای ۱۵min در دمای $4^{o}C$ رسوب داده شدند. رسوب حاصله ۳ بار با بافر نمکی فسفات (PBS و pH= ۷/۲) شستشو گردید. سپس برای حصول غلظت 10^{9} CFU/mL با PBS مخلوط گردید و کدورت آن با لوله‌مک فارلند شماره ۹ مقایسه گردید. برای تهیه واکسن کشته ۵۰mL از سوسپانسیون باکتریایی، در شرایط حمام یخ تحت تأثیر دستگاه سونیکاتور با حداکثر جریان برای ۱۵min قرار گرفت. سپس برای استریل نمودن سوسپانسیون باکتریایی از فیلترهای ۰/۴۵μm استفاده گردید. و در نهایت واکسن به‌دست آمده تا زمان استفاده در $-20^{o}C$ قرار گرفت.

تهیه پادتن: اولین مرحله در تولید پادتن، ایمونیزه نمودن مرغ‌های تخم‌گذار با آنتی‌ژن بود. در آزمایش حاضر جهت تهیه پادتن ۱۰ قطعه مرغ تخم‌گذار تترا-اس ال قهوه‌ای (TSL) به روش Ruan و همکاران در سال ۲۰۰۵ با اندکی تغییرات ایمونیزه شدند. به‌طوری که ابتدا در اولین مرحله ایمن سازی به ازای هر مرغ ۰/۲۵۰ mL سوسپانسیون حاوی 10^{9} CFU باکتری اشریشیاکلی سونیکه شده به همراه ۰/۲۵۰ mL ادجوانت کامل فروند مخلوط و در دو جایگاه سینه‌ای به روش عضلانی تزریق گردید. هم‌زمان گروه کنترل ۰/۵mL از محلول سرم فیزیولوژی استریل را از طریق عضلانی دریافت کردند. تزریق‌های یادآور نیز ۲، ۴و۶ هفته بعد از اولین ایمن‌سازی به ترتیب با ادجوانت ناقص فروند و بدون ادجوانت انجام پذیرفت. یک هفته پس از اولین تزریق تخم‌مرغ‌ها جهت استخراج پادتن و تهیه پودر زرده جمع‌آوری گردید و تا زمان تهیه پادتن در دمای $4^{o}C$ نگه‌داری گردید. استخراج پادتن مطابق روش فولتون(۱۰) انجام پذیرفت. طبق این روش ابتدا زرده تخم مرغ به طور کامل از سفیده جدا شد و غشاء محافظ زرده نیز جدا گردید. هم حجم زرده به دست آمده محلول PBS [pH=7.2 (0.15 M)NaCl، $(0.02M)Na_2HPO_4$] اضافه کرده و مخلوط حاصل به مدت ۳min با سرعت بالا در دستگاه مخلوط کن همگن شد و سپس در g۱۸۰۰ در دمای $4^{o}C$ به مدت ۱۵min سانتریفوژ شد. پس از سانتریفوژ سه لایه تشکیل شد. لایه چربی بسیار نازک سطحی خارج شد و محلول شناوری که بین لایه سطحی و رسوب تشکیل شده و حاوی IgY بود، جمع‌آوری و رسوب حاصل دور ریخته شد.

برای تهیه پودر زرده ابتدا زرده تخم‌مرغ‌های حاوی IgY اختصاصی اشریشیاکلی سروتیپ O2:K1 را از سفیده و شالاز جدا کرده، سپس لایه نازکی از زرده حاصل را در ظروف مخصوص دستگاه فریز درایر ریخته و به مدت ۱۲h در فریزر $-80^{o}C$ نگهداری شد. بعد از این مرحله زرده‌های منجمد شده ۲۴h در دستگاه فریز درایر قرار گرفت، پس از طی کردن این مدت کاملاً خشک و به پودر زرده تبدیل شد. برای حفظ کارایی بیشتر پودر زرده تا زمان مصرف در دمای $-20^{o}C$ نگهداری شدند.

آزمایش‌های مزرعه‌ای (گروه‌های آزمایشی): آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۶ گروه آزمایشی و ۳ تکرار و ۱۰ مشاهده برای هر تکرار صورت پذیرفت. گروه اول به عنوان شاهد منفی، باکتری زنده و پادتن دریافت نکردند. گروه دوم از یک روزگی تا پایان دوره آزمایش، روزانه ۳mL پادتن استخراج شده در ۲/۷L آب آشامیدنی دریافت نمودند. گروه سوم: همانند گروه A1 از یک روزگی تا پایان دوره آزمایش ،روزانه مقدار ۰/۴٪ جیره غذایی پودر زرده دریافت نمودند. گروه چهارم در سن ده روزگی، با ۱mL از محلول سوسپانسیون اشریشیاکلی حاوی $10^{9}\times1$ CFU باکتری به روش دهانی (گاواژ) چالش داده شدند. گروه پنجم پرندگانی که روزانه مقدار ۳mL پادتن علیه اشریشیاکلی را در آب آشامیدنی دریافت‌کرده‌اند در سن ده روزگی با ۱mL از محلول سوسپانسیون *E. coli* حاوی CFU $10^{9}\times1$ باکتری به روش دهانی (گاواژ) چالش داده شدند. گروه ششم پرندگانی که روزانه مقدار ۰/۴٪ پودر زرده حاوی پادتن اختصاصی علیه اشریشیاکلی سروتیپ O2 را در جیره غذایی دریافت کرده‌اند در سن ده روزگی با ۱mL از محلول سوسپانسیون E. coli حاوی CFU $10^{9}\times1$ باکتری به روش دهانی (گاواژ) چالش داده شدند. مقدار خوراک مصرفی، میانگین افزایش وزن و ضریب تبدیل غذایی به صورت هفتگی مورد بررسی قرار گرفت.

شمارش باکتری محتویات ایلئوم پرندگان: جهت شمارش کلنی باکتری در سن‌های ۲۱ و ۴۲ روزگی از محتویات ایلئوم، زائده مکل تا ایلئوسکال یک پرنده از هر تکرار به صورت تصادفی نمونه‌گیری گردید. نمونه‌ها در داخل پلیت استریل در مجاورت یخ قرار داده شد و به سرعت به آزمایشگاه جهت کشت میکروبی انتقال داده شد. یک گرم از هر نمونه برداشت شد و تا سری رقت 10^{6} رقیق سازی انجام گرفت. از هر سری رقت ۲۰μL در پلیت حاوی محیط کشت مکانکی آگار به روش قطره‌ای کشت داده شد. پلیت‌های کشت داده شده برای ۲۴ h در دمای $37^{o}C$ انکوبه شدند. سپس کلنی‌های باکتری شمارش گردیدند. برای تأیید کلنی‌های شمارش شده از تست‌های بیوشیمیایی واکنش‌های IMViC استفاده گردید. در نهایت تعداد واحدهای تشکیل دهنده کلنی در هر پلیت با استفاده از روش کشت سطحی مورد شمارش قرار گرفت تا تعداد CFU در هر گرم محتویات ایلئوم محاسبه گردید.

مرفولوژی مخاط روده: در سن ۴۲ روزگی از هر واحد آزمایشی یک قطعه پرنده انتخاب و به روش انسانی کشتار گردید. سپس از قسمت میانی ژژونوم هر پرنده، قطعه‌ای به طول ۳Cm جدا گردید. قطعات جدا شده

پس از شستشو با بافر فسفات، توسط محلول فرمالدئید ۱۰٪ تثبیت شدند. و پس از طی مراحل تثبت و قالب گیری، لایه نازکی از بافت روده به ضخامت ۵µm روی لام قرار داده شد. پس از رنگ‌آمیزی، نمونه‌ها بوسیله میکروسکوپ نوری مورد مشاهده قرار گرفتند. ارتفاع پرز و عمق کریپت اندازه‌گیری و ثبت گردید.

مدل و طرح آزمایش: آزمایش‌های in vivo بر پایه یک طرح کاملاً تصادفی با ۶ تیمار، ۳ تکرار و ۱۰ مشاهده در هر تکرار انجام گرفت. پس از ثبت و ویراش داده‌ها، تجزیه وتحلیل نهایی با استفاده ازرویه GLM نرم افزار SAS انجام شد(میانگین داده‌ها با استفاده از روش حداقل مربعات مورد مقایسه قرار گرفتند.

نتایج

پس از آلوده نمودن جوجه‌های گوشتی با اشریشیاکلی *O2:K1*، جمعیت اشریشیاکلی در محتوای ایلئومی به طور بسیار معنی‌داری افزایش یافت. میانگین جمعیت اشریشیاکلی در نمونه‌های ایلئومی جوجه‌های آلوده در روز ۲۱، ($\log_{10}$ CFU/g ± SE)۵/۶۶ ± ۰/۰۳۵ رسید. در طول دوره آزمایش، جمعیت اشریشیاکلی محتوای ایلئومی جوجه‌های آلوده، به طور بسیار معنی‌داری بالاتر از گروه‌های غیر آلوده حفظ گردید ($p<0/05$)(جدول ۱).

مطابق جدول ۱ از نظر شمار باکتری در محتویات ایلئوم تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های آزمایش مشاهده شد ($p\leq0/05$). در سن ۲۱ روزگی بیشترین تعداد باکتری در گروه دریافت کننده باکتری بدون دریافت پادتن در آب و پودر زرده حاوی پادتن در جیره غذایی و کمترین میزان باکتری در گروه دریافت کننده پودر زرده بدون چالش باکتریایی مشاهده گردید. در بین گروه‌های چالش داده شده با باکتری و دریافت کننده پادتن، گروه دریافت کننده زرده تخم‌مرغ حاوی پادتن اختصاصی نسبت به گروه دریافت کننده پادتن در آب آشامیدنی کاهش بیشتری مشاهده گردید. در سن ۴۲ روزگی نیز این روند حفظ گردید.

بررسی مرفولوژی مخاط روده در سن ۴۲ روزگی: نتایج مربوط به خصوصیات پرز ژژونوم در جدول (۲) آورده شده است. نتایج نشان‌دهنده آن است که تیمارها از نظر ارتفاع پرز، عمق کریپت و نسبت ارتفاع پرز به عمق کریپت اختلاف معنی‌داری با هم دارند. بیشترین ارتفاع پرز در گروه دریافت کننده پادتن اختصاصی در آب آشامیدنی و کمترین ارتفاع پرز در گروه کنترل مثبت (چالش باکتریایی و عدم دریافت پادتن) مشاهده شده است. همچنین بیشترین و کمترین نسبت طول پرز بر عمق کریپت به ترتیب در تیمارهای دریافت کننده پودر زرده در جیره غذایی و کنترل مثبت (چالش با باکتری بدون دریافت پادتن) مشاهده شد.

بحث

سویه‌های بیماریزای اشریشیاکلی توانایی موضعی شدن در روده

جدول ۱. شمارش باکتری اشریشیاکلی در محتویات ایلیوم جوجه‌های گوشتی.[(abc)] میانگین‌ها با حروف غیر مشابه در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح خطای ۵٪ می‌باشد. SEM خطای استاندارد.

تیمار	شمار میکروبی محتویات ایلیوم (Log_{10} CFU/ g)	
	۲۱ روزگی	۴۲ روزگی
چالش با باکتری	۶۶/۵[a]	۳۹۲/۷[a]
چالش با باکتری+ پودر زرده	۳۷/۵[bc]	۲۲/۷[b]
چالش با باکتری+ پادتن	۵۳/۵[ab]	۲۹/۷[ab]
شاهد	۳۲/۵[bc]	۸۶/۶[c]
پادتن	۱۸/۵[c]	۸۵/۶[c]
پودر زرده	۲۱/۵[c]	۶۳/۶[d]
p-value	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱
SEM	۰/۰۳۵	۰/۰۶۸

جدول ۲. تغییرات مرفولوژی روده جوجه‌های گوشتی چالش یافته با باکتری اشریشیاکلی.[(abc)] میانگین‌ها با حروف غیر مشابه در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح خطای ۵٪ می‌باشد. SEM خطای استاندارد.

تیمار	صفات پرز ژژونوم		
	ارتفاع پرز (µm)	عمق کریپت (µm)	نسبت طول پرز بر عمق کریپت
شاهد	۱۰۳۲/۰۰[b]	۱۴۸/۶۷[bc]	۶/۹۵[b]
چالش با باکتری+ پودر زرده	۱۰۵۱/۰۰[b]	۱۵۰[ab]	۶/۹۹/۰۰[b]
چالش با باکتری+ پادتن	۱۰۳۶/۶۷[b]	۱۴۹/۳۳[b]	۶/۹۴[b]
پودر زرده	۱۱۳۸/۰۰[a]	۱۴۵/۳۳[c]	۷/۵۴[a]
پادتن	۱۱۴۶/۳۳[a]	۱۴۷/۳۳[bc]	۷/۷۸[a]
چالش با باکتری	۹۵۵/۶۷[c]	۱۵۳/۳۳[a]	۶/۲۳[c]
SEM	۱۷/۴۸	۰/۷	۰/۱۴۵
p-value	۰/۰۰۰۳	۰/۰۰۶۲	۰/۰۰۰۲

میزبان را دارند. این سویه‌ها از روده به عنوان یک محل مناسب برای رسیدن به اندام‌های هدف استفاده می‌کنند. احتمالاً مژه‌های نوع یک، Curli و هم‌چنین تاژک‌های موجود بر روی سروتیپ O2:K1 دارای نقش اساسی در اتصال به سلول‌های روده‌ای می‌باشند. Edelman و همکاران در سال ۲۰۰۳ بیان داشتند که مژه نوع۱ سویه‌های APEC به طور قابل توجهی می‌تواند به سلول‌های بالغ و نابالغ موجود در رأس پرزها، به سلول‌های لامیناپروپریای روده، سلول‌های نابالغ موجود در عمق کریپت، موکوس، ماکروفاژ و همچنین سلول‌های مربوط به سیستم ایمنی مخاطی متصل گردد (۷). لذا با توجه به این یافته‌ها و نتایج به‌دست آمده در آزمایش حاضر مبنی بر ابقای اشریشیاکلی در روده پرندگان می‌توان این‌گونه نتیجه گرفت که این باکتری می‌تواند به خوبی به سلول‌های روده‌ای اتصال یافته و زمینه بروز عفونت‌های گوارشی و متعاقب آن سپتی‌سمی را فراهم کند. علت کاهش بیشتر در شمار باکتری در محتویات ایلئوم در گروه دریافت کننده پودر زرده می‌تواند به این دلیل باشد که اجزایی از زرده تخم‌مرغ (ماتریس پروتولیپیدیک) به میزان قابل توجهی در حفاظت از پادتن از فرآیند گوارشی مؤثر می‌باشد (۱۸،۲۹).

استفادهٔ خوراکی از IgY زردهٔ تخم‌مرغ توسط بسیاری از محققین علیه عوامل بسیاری از بیماریهای گوارشی مثل، اشریشیاکلی انتروتوکسیژنیک (Enterotoxigenic *E.coli*)(۲۲)، روتاویروس‌های (Rotaviruses) انسانی (۶،۲۷)، و سودوموناس آئروژنزا (*Pseudomonas aeruginosa*)(۳۱) با موفقیت به کار گرفته شده است. IgY همچنین لایه‌گزینی استرپتوکوکوس موتانس (*Streptococcus mutans*) را بر روی دندان‌ها مهار می‌کند، بنابراین از تشکیل پلاک‌های دندانی در انسان ممانعت به عمل می‌آورد (۱۷). مطالعات نشان می‌دهند که زردهٔ تخم‌مرغ حاصل از مرغ‌های ایمن شده حاوی مقدار زیادی پادتن است که قادر به شناسایی اختصاصی آنتی‌ژن هستند که از نظر اقتصادی نیز مقرون به صرفه است (۱۶،۲۱،۳۲).

نتایج حاصل از این آزمایش نشان می‌دهد که استفاده از پادتن خوراکی می‌تواند نقش مؤثری در کنترل باکتری اشریشیاکلی از طریق کاهش معنی‌دار در دفع باکتری و تعداد پرندگان مبتلا داشته باشد، پادتن خوراکی با اتصال به رسپتورهای میکروب‌ها از فعالیت آنها در میزبان جلوگیری می‌نماید (۲۴،۲۵).

نتایج اکثر آزمایش‌ها بیان‌گر آن است که بیشترین اثر مهاری پادتن اختصاصی تنها بر روی باکتری‌های هومولوگ با باکتری هدف بروزکرده است (۲). لذا با توجه به یافته‌های قبلی، این امر محتمل به نظر می‌رسد که کاهش تعداد اشریشیاکلی در نمونه‌های ایلئومی پرندگان آلوده دریافت کننده پادتن عمدتاً مربوط به کاهش سروتیپ O2:K1 می‌باشد.

کاهش شمار باکتری در محتویات ایلئوم پرندگان دریافت کننده پادتن، چه به‌صورت پودر زرده حاوی پادتن اختصاصی، چه به‌صورت دریافت پادتن در آب آشامیدنی نسبت به گروه کنترل می‌تواند به این دلیل باشد که باکتری اشریشیاکلی سویه O2: K1 جزیی از فلور طبیعی روده پرندگان می‌باشد که با مصرف پادتن اختصاصی این باکتری‌ها از بین رفتند. علاوه بر این، عموماً پس از مصرف پادتن‌های پلی‌کلنال به دست آمده از بخش‌های مختلف باکتری، واکنش‌های متقاطع آنتی‌بادی- آنتی‌ژن نیز بین پادتن تولید شده وگونه‌های دیگر باکتریایی بروز می‌نماید. این امر به عنوان یک سودمندی خوشایند و اضافه بر خواص ویژه پادتن اختصاصی، درجهت مهار تغذیه‌ای دیگر عوامل پاتوژن مورد توجه قرار گرفته است (۲۰). واکنش متقاطع با باکتری‌های بیماریزا از مزایای نسبی کاربرد پادتن است. اما واکنش متقاطع با باکتری‌های غیربیماریزای روده‌ای ممکن است منجر به تغییر فلور طبیعی روده شود و زمینه ایجاد بعضی از بیماریها را فراهم سازد.

همانطور که در جدول (۲) مشاهده می‌شود چالش باکتریایی پرندگان با باکتری اشریشیاکلی سروتیپ O2:K1 سبب کاهش ارتفاع پرز و نسبت ارتفاع به عمق کریپت شد. این یافته‌ها، نتایج قبلی مبنی بر تغییر در عملکرد پرزهای روده مانند افزایش نفوذپذیری، افزایش تولید آنزیم و ایمنوگلوبولین‌ها و کاهش ارتفاع پرز و نسبت ارتفاع پرز به عمق کریپت پس از چالش باکتریایی را تأیید می‌کند (۲۳).

عمق کریپت پرزها حاوی سلول‌های تخصیص یافته شامل، سلول‌های جذبی، سلول‌های گابلت و سلول‌های تولیدی که مسئول تولید مخاط و جایگزینی سلول‌های پیر هستند، می‌باشد. به دلیل اینکه سلول‌های گابلت در کریپت تولید می‌شوند، کریپت عمیق تر می‌تواند منعکس کننده افزایش تراکم سلول‌های گابلت باشد(۳). بنابراین عمق کریپت بیشتر، نشان دهنده افزایش فعالیت تکثیری سلول‌های آن است. سلول‌های گابلت ترکیبات گلیکوپروتئینی که به عنوان موکوس شناخته می‌شوند را ترشح می‌کنند که لایه مخاطی را که از سطح روده‌ای در برابر آسیب باکتری‌ها و سموم محیطی محافظت می‌کند شکل می‌دهند. همچنین مخاط به عنوان سوبسترا برای تخمیر مورد استفاده باکتری‌های مقیم روده قرار می‌گیرد و نیز می‌تواند به عنوان یک محل اتصال باکتری‌ها به سطح روده‌ای محسوب شوند. از این نکته نتیجه گرفته می‌شود که بین باکتری‌های مفید و بیماریزا برای چسبیدن به این گیرنده‌ها رقابت وجود دارد. بنابراین مخاط نقش مهمی را در محافظت روده در برابر باکتری‌های بیماریزا ایفا می‌کند. سنتز و ترشح موکوس تحت تأثیر جیره قرار می‌گیرد.

مطالعات اخیر نشان داد که همزیستی باکتری با پرزهای روده، اثر مستقیم بر فعالیت سلول‌های گابلت و بافت پوششی مخاط روده خواهد داشت. همچنین به صورت غیر مستقیم با افزایش ترشح سیتوکنین‌های التهابی باعث افزایش پاسخ‌های ایمنی به پاتوژن‌ها می‌گردد(۳۰).

در مطالعه حاضر چالش باکتریایی با سروتیپ O2: k1 سبب کاهش ارتفاع پرز و کاهش نسبت ارتفاع پرز به عمق کریپت شده است. این نتیجه گزارش محققان مبنی بر توانایی اتصال باکتری‌های APCE به پرزهای روده را تایید می‌کند (۷،۸،۱۵). این موضوع نشان‌دهنده آن است که باکتری اشریشیاکلی *O2:K1* توانایی اتصال به پرزهای روده را داشته و اثرات مخربی بر بافت روده خواهند گذاشت، که با استفاده از پادتن اختصاصی به میزان ۳ mL به ازای هر پرنده در ۲/۷ L آب آشامیدنی یا استفاده از ۰/۴٪ پودر زرده حاوی پادتن اختصاصی بر علیه باکتری مورد آزمون به مدت ۳ هفته یا بیشتر شاخص‌های سلامت روده را بهبود خواهند بخشید.

افزایش تکثیر سلول‌های کریپت باعث افزایش سلول‌های انتروسیت و گابلت نابالغ می‌شود، لذا انرژی لازم برای نوسازی مخاط دستگاه گوارش افزایش یافته و همچنین توانایی جذب مواد مغذی توسط سلول‌های مخاطی کم می‌شود. کاهش عمق کریپت‌ها با نزدیک شدن به انتهای روده نشان می‌دهد که فعالیت تکثیری در انتهای روده کمتر است.

کریپت‌های کوهن از طریق تقسیم میتوز مسئول تولید سلول‌های اپیتلیال پرزها هستند. بیشترین ظرفیت هضم و جذب به وسیله سطح لامینال وسیع و با پرزهای طویل دارای انتروسیت‌های بالغ حاصل می‌شود. بنابراین انرژی ذخیره شده از کاهش میزان بازسازی سلول‌های اپیتلیال می‌تواند توسط پرنده صرف تولید بافت‌های دیگر و در نتیجه

افزایش رشد شود (۴). در جریان مهاجرت سلول‌های انتروسیت به سوی رأس پرز، این سلول‌ها کارایی کامل خود را به‌دست می‌آورند، مهاجرت انتروسیت‌ها به سمت رأس پرز در تعادل با از دست رفتن آنها در اثر ریزش و صدمه دیدن آنها می‌باشد. هنگامی‌که در اثر حضور تعداد زیاد باکتری‌های بیماریزا، انتروسیت‌ها به مقدار زیادی از دست بروند، عمق کریپت‌ها افزایش خواهد یافت. بنابراین افزایش عمق کریپت مشاهده شده در گروه کنترل مثبت (گروه‌های چالش داده شده با باکتری) نیز مؤید این مطلب می‌باشد.

پادتن برای برخی از قسمت‌های پاتوژن (گیرنده‌های اتصال) جاذبه بسیار اختصاصی ایجاد می‌کند. این بازوهای اتصال برای اتصال پاتوژن به رسپتورهای میزبان استفاده می‌شوند. پادتن با ایجاد اتصال غیر قابل برگشت میان پادگن و پادتن، پادگن را تسخیر می‌کند. بدین ترتیب از اتصال پاتوژن به رسپتور میزبان که اولین مرحله لازم برای ایجاد بیماری است جلوگیری می‌کند. کمپلکس پادتن ـ پادگن به بدن اجازه می‌دهد تا به‌صورت بی‌ضرر توسط یک سری از وقایع ایمنی، پاتوژن را غیرفعال کند.

به هر حال مکانیسم عمده‌ای که آنتی بادی مانع از رشد باکتری‌ها می‌شوند این است که آنتی‌بادی به آنتی‌ژن‌های سطحی باکتری مانند غشاء خارجی (OMP)، لیپوپلی‌ساکارید (LPS)، تاژک و فیمبریه‌ها (پیلی‌ها) متصل می‌شوند. فرض بر این است که این اجزا سطحی می‌توانند براحتی با آنتی‌بادی‌ها باند شوند. از آنجایی که این اجزای سطحی نقش مهمی در چسبیدن باکتری به پرزها و ابقای باکتری در روده بازی می‌کنند (۳۳). درنتیجه آنتی‌بادی از چسبیدن باکتری‌ها به پرزهای روده جلوگیری می‌کند (۱۱،۳۱).

یافته‌های ما نشان داد که استفاده از IgY به مدت ۳ هفته یا بیشتر عملکرد پرندگان را بهبود می‌بخشد. به نظر می‌رسد اثرات مفید IgY در مهار باکتریایی، توسعه مرفولوژی روده، افزایش سطح جذب، کاهش التهاب مخاطات روده‌ای، کاهش غلظت واسطه‌های التهابی هم‌چون ایمنوگلوبولین‌های خون و بهبود وضعیت دستگاه گوارش و در نهایت افزایش عملکرد پرندگان می‌شود.

همان‌گونه که قبلا توضیح داده شد با استفاده از پادتن اختصاصی چه به‌صورت پودر زرده در جیره غذایی، چه به صورت پادتن محلول در آب آشامیدنی نسبت ارتفاع / عمق کریپت افزایش می‌یابد. کریپت‌های کوهن می‌توانند مشابه کارخانه سازنده پرزها فرض شوند. در سلول‌های جدید اپتلیال توسط سلول‌های بنیادی تولید شده در عمق کریپت رشد کرده و به همراه پرزها به سمت بالا مهاجرت می‌کنند (۲۸) . هرچه ارتفاع پرز نسبت به عمق کریپت بیشتر باشد. در حقیقت نشان‌دهنده این موضوع می‌باشد که سلول‌های جدید کمتری جهت جبران ریزش طبیعی و یا ریزش ناشی از التهاب به‌علت عوامل بیماریزا ساخته می‌شود. بنابراین نیاز انرژی کاهش می‌یابد. ارتفاع پرز نشان می‌دهد که سلول‌های اپیتلیوم بیشتر بالغ شده و سطح جذب افزایش می‌یابد. هم چنین افزایش ارتفاع پرز سبب افزایش فعالیت آنزیم مترشحه از نوک پرزها می‌شود (۱۴)، در نتیجه سبب بهبود هضم می‌شوند.

همچنین نتایج ما نشان می‌دهد که پادتن اختصاصی زرده تخم مرغ علاوه بر اثرات ضد التهابی نقطه‌ای، دارای اثرات ضد التهابی غیر مستقیم می‌باشد. این نتایج نشان‌دهنده آن است که یک رابطه منفی بین عملکرد و تحریک سیستم ایمنی وجود دارد و این ممکن است به دلیل فعالیت اینترلوکین ۱، اینترلوکین ۶، فاکتور a نکروز توموری، از دست دادن اشتها ناشی از پروتئین فاز حاد (۱۳)، تغییر نسبت آلبومین به گلوبولین (۵،۱۹) باشد. بنابراین این احتمال وجود دارد که اثرات تنظیمی آنتی‌بادی اختصاصی بر روی مکانیسم‌های التهابی می‌تواند عملکرد جوجه‌های گوشتی را بهبود بخشد.

تشکر و قدردانی

از حمایت مالی دانشگاه تربیت مدرس در انجام این تحقیق تشکر و قدردانی می‌نماید.

References

1. Altekruse, S.F., Elvinger, F., Lee, K.Y., Tollefson, L. K., Pierson, E.W., Eifert, J., Sriranganthan, N. (2002) Antimicrobial Susceptibilities of *Escherichia coli* Strains from a Turkey Operation. J Am Vet Med Assoc. 221: 411-416. Doi: 10.2460/ Javrna 2002.221.
2. Amaral, J.A., De Franco, M.T., Zapata-Quintanilla, L., Carbonare, S.B. (2008) In vitro reactivity and growth inhibition of EPEC serotype O111 and STEC serotypes O111 and O157 by homologous and heterologous chicken egg yolk antibody. Vet Res Commun. 32: 281-290.
3. Ayabe, T., Satchell, D.P., Wilson, C.L., Parks, W.C., Selsted, M.E., Ouelette, A.J. (2000) Secretion of microbicidal defenses by intestinal Paneth cells in response to bacteria. Nat Immun. 1: 113-118.
4. Bradley, G.L., Savage, T.F., Timm, K.I. (1994) The effects of supplementing diets with *Saccharomyces cervisiae* var. boulardi on male poultry performance and ileal morphology. Poult Sci. 73: 1766-1770.
5. De Neve, L., Fargallo, J. A., Vergara, P., Lemus, J. A., Jaren-Galan, M., Luaces, I. (2008) Effects of maternal carotenoid availability in relation to sex, parasite infection and health status of nestling kestrels (*Falco tinnunculus*) J Exp Biol 211: 1414-

1425.

6. Ebina, T. (1996) Prophylaxis of rotavirus gastroenteritis using immunoglobulin. Arch Virol. 12 Suppl: 217-23.
7. Edelman, S., Leskela, S., Ron, E., Apajalahti, J., Korhonen, T. K. (2003) In vitro adhesion of an avian pathogenic *Escherichia coli* O78 strain to surfaces of the chicken intestinal tract and to ileal mucus. Vet Microbiol. 91: 41-56.
8. Ewers, C., Li, G., Wilking, H., Kiessling, S., Alt, K., Antáo, E.M., Laturnus, C., Diehl, I., Glodde, S., Homeier, T., Böhnke, U., Steinrück, H., Philipp, H.C., Wielerm L.H. (2007) Avian pathogenic, uropathogenic, and newborn meningitis-causing *Escherichia coli*: how closely related are they? Int J Med Microbiol. 297: 163-176.
9. Ewers, C., Janssen, T., Kiessling, S., Philipp, H.C., Wieler, L.H. (2004) Molecular epidemiology of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from colisepticemia in poultry. Vet Microbiol. 104: 91-101.
10. Fulton, R.M., Nersessian, B.N., Reed, W.M. (2002) Prevention of *Salmonella enteritidis* infection in commercial ducklings by oral chicken egg-derived antibody alone or in combination with probiotics. Poult Sci. 81: 34-40.
11. Girard, F., Batisson, I., Martinez, G., Breton, C., Harel, J., Fairbrother, J.M. (2006) Use of virulence factor specific egg yolk-derived immunoglobulins as a promising alternative to antibiotics for prevention of attaching and effacing *Escherichia coli* infections. FEMS Immunol Med Mic 46: 340-350.
12. Gomis, S., Babiuk, L., Godson, D.L., Allan, B., Thrush, T., Townsend, H., Willson, P., Waters, E., Hecker, R., Potter, A. (2003) Protection of chickens against *Escherichia coli* infections by DNA containing CpG motifs. Infect Immun. 71: 857-863
13. Grimble, R.F. (1994) Malnutrition and the immune response. 2. Impacts of nutrients on cytokine biology in infection. Trans R Soc Trop Med Hyg. 88:615-619.
14. Hampson, D.J. (1986) Alteration in piglet small intestinal structure at weaning. Res Vet Sci. 40: 32-40.
15. Harry, E.G., Hemsley, L.A. (1965) The association between the presence of septicemia strains of *Escherichia coli* in the respiratory and intestinal tracts of chickens and the occurrence of coli septicemia. Vet Rec. 77: 35-40.
16. Hatta, H., Tsuda, K., Akachi, S., Kim, M.,Yamamoto, T. (1993) Productivity and some properties of egg yolk antibody (IgY) against human rotavirus compared with rabbit IgG. Biosci Biotechnol Biochem. 57: 450-4.
17. Hatta, H., Tsuda, K., Ozeki, M., Kim, M., Yamamoto, T., Otake, S., Hirasawa, M., Katz, J., Childers, N.K., Michalek, S.M. (1997) Passive immunization against dental plaque formation in humans: effect of a mouth rinse containing egg yolk antibodies (IgY)specific to *Streptococcus* mutans. Caries Res. 31: 268-74.
18. Jaradat, Z.W., Marquardt, R.R. (2000) Studies on the stabilityof chicken IgY in different sugars, complex carbohydrates andfood materials. Food Agric Immunol. 12: 263-272.
19. Kilgas, P., Tilgar, V., Mand, R. (2006) Hematological health state indices predict local survival in a small passerine bird, the great tit (*Parus major*). Physiol Biochem Zool. 79: 565-572.
20. Lee, E.N., Sunwoo, H.H., Menninen, K., Sim, J.S. (2002) In vitro studies of chicken egg yolk antibody (IgY) against *Salmonella enteritidis* and *Salmonella typhimurium*. Poult Sci. 81: 632-641.
21. Li, X., Nakano, T., Sunwoo, H.H., Paek, B.H., Chae, H.S., Sim, J.S. (1998) Effects of egg and yolk weights on yolk antibody (IgY) production in laying chickens. Poult Sci. 77: 266-70.
22. Marquardt, R.R., Jin, L.Z., Kim, J.W., Fang, L., Frohlich, A.A., Baidoo, S.K. (1999) Passive protective effect of egg-yolk antibodies against enterotoxigenic *Escherichia coli* K88+ infection in neonatal and early-weaned piglets. FEMS Immunol Med Microbiol. 23: 283-8.
23. Mcfall-Ngai, M.J. (1998) The development of cooperative associations between animals and bacteria: Establishing détente among domains. Am Zool. 38:

593-608.

24. Rahimi, Sh., Moghadam Shiraz, Z., Zahraei Salehi, T., Karimi Torshizi, M.A., Grimes, J.L. (2007a) Prevention of *Salmonella* infection in poultry by specific egg-derived antibody. Int J Poult Sci. 6: 230-235.
25. Rahimi, Sh., Salehifar, E., Ghorashi, S.A., Grimes, J.L., Karimi Torshizi, M.A. (2007b) The effect of egg-derived antibody on prevention of avian influenza subtype H9 N2 in layer chicken. Int J Poult Sci. 6: 207-210.
26. 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 HL A- A*0201 heavy chain and light chain (β2m). Protein Expr Purif. 44: 45-51.
27. Sarker, S.A., Casswall, T.H., Juneja, L.R., Hoq, E., Hossain, I., Fuchs, G.J., Hammarstrom, L. (2001) Randomized, placebo-controlled, clinical trialof hyperimmunized chicken egg yolk immunoglobulin in children with rotavirus diarrhea. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 32: 19-25.
28. Schat, K., Myers, T. (1991) Avian intestinal immunity. Crit Rev Poult Biol. 3: 19-34.
29. Schmidt, P., Wiedemann, V., Kuhlmann, R., Wanke, R., Linckh, E., Losch, U. (1989) Chicken egg antibodies for prophylaxis and therapy of infectious intestinal diseases. In vitro studies on gastricand enteric digestion of egg yolk antibodies specific against pathogenic *Escherichia coli* strains. Zentralbl. Vet Med B. 36: 619-628.
30. Shirkey, T.W., Siggers, R.H., Goldade, B.G., Marshall, J.K., Drew, M.D., Laarveld, B., Van Kessel, A.G. (2006) Effects of commensal bacteria on intestinal morphology and expression of proinflammatory cytokines in the gnotobiotic pig. Exp Biol Med. 231: 1333-1345.
31. Sugita-Konishi, Y., Shibata, K., Yun, S.S., Hara-Kudo, Y., Yamaguchi, K., Kumagai, S. (1996) Immune functions of immunoglobulin Y isolated from egg yolk of hens immunized with various infectious bacteria. Biosci Biotechnol Biochem. 60: 886-888.
32. Verdoliva, A., Basile, G., Fassina, G. (2000). Affinity purification of immunoglobulins from chicken egg yolk using a new synthetic ligand. J Chromatogr B Biomed Sci Appl. 47: 233-242.
33. Yokoyama, H., Peralta, R.C., Umeda, K., Hashi, T., Icatlo, F.C.Jr., Kuroki, M., Ikemori, Y., Kodama, Y. (1998) Prevention of fatal Salmonellosis in neonatal calves, using orally administered chicken egg yolk *Salmonella*-specific antibodies. Am J Vet Res. 59: 416-420.

Effect of egg yolk specific antibodies on histomorphological changes of jejunum and reducing *Escherichia coli* colonization in intestine of broiler chickens

Shafiee, M.[1], Rahimi, S.[1*], Karimi Torshizi, M.A.[1], Zahraei Salehi, T.[2]

[1]*Department of Poultry Sciences, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran-Iran*

[2]*Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran-Iran*

(Received 6 November 2014, Accepted 11 December 2014)

Abstract:

BACKGROUND: Colibacillosis in poultry, reduces growth and performance, increases mortality and causes economic losses. **OBJECTIVES:** An experiment was conducted to study the effect of egg yolk powder and antibody (IgY) on intestinal morphology and reduction of bacterial colonization in broilers infected with *E. coli*. **METHODS:** Ten laying hens were immunized with *E. coli* O2: K1. The eggs were collected for providing IgY antibody and egg yolk powder with freeze dryer. In the second experiment,180 day-old broilers were randomly divided into 6 treatment groups with 3 replicates of 10 birds per replicate including: (1) positive control (challenged with *E.coli* but did not receive antibody); (2) negative control (did not challenge with *E.coli* and did not receive antibody); (3) the group was challenged with *E.coli* and received 0.4% yolk powder; (4) the group received specific antibody in drinking water and challenged with *E. coli*; (5) the group received specific antibody in drinking water; (6) the group received 0.4% yolk powder in diet. All groups received the same dietary energy and protein. FI, WG and FCR were measured on weekly basis. On days 21 and 42, one bird per pen was euthanized, samples of jejunum were collected for histo-morphological examination and samples of ileal contents were collected for *E. coli* O2: K1 enumeration. **RESULTS:** The results indicated that number of *E. coli* in positive group was significantly higher than other groups. Number of *E. coli* in ileum of the birds which received antibody in drinking water or fed with diet supplemented with egg yolk powder was significantly lower than the other infected groups ($p \leq 0.05$). Using specific antibody improved intestinal health compared to positive control group. **CONCLUSIONS:** According to results of this experiment it can be concluded that using *E. coli* specific antibody in food or water of chickens reduces intestinal colonization of this bacterium.

Key words: broiler, egg yolk antibody (IgY), intestinal morphology, *E. coli*, yolk powder

Figure Legends and Table Captions

Table 1. Enumeration of *Escherichia coli* in ileal contents of broilers. [(abc)] Means with no common superscript within each column are significantly ($p<0.05$) different. SEM Standard Error Mean

Table 2. Morphological changes in the intestinal tract of broiler chickens challenged with *E. coli*. [(abc)] Means with no common superscript within each column are significantly ($p<0.05$) different. SEM Standard Error Mean.

***Corresponding author's email: rahimi_S@ modares.ac.ir, Tel: 021-448292004, Fax: 021-448292200**