

## Production of Egg Yolk Immunoglobulin (IgY) Against Recombinant LTB of Enterotoxigenic Escherichia coli (ETEC) and Evaluation of Its Protective Effect in Animal Model

Maryam Mafi<sup>1</sup>, Seved Latif Mousavi Gargari<sup>2</sup>, Shahram Nazarian<sup>3</sup>, Fatemeh.Mohammad khani<sup>4</sup>

1-Ms.C Microbial Biotechnology, Department of Cell Biology, Faculty of Basic Sciences, Shahed University, Tehran, Iran. ORCID ID:0000-0002-8442-020X

2-Ph.D Biochemistry Department of Cell Biology, Faculty of Basic Sciences, Shahed University, Tehran, Iran. (Corresponding Author), Tel:021-51212232, Email:slmousavi@shahed.ac.ir. ORCID ID:0000-0002-4635-8716

3-Ph.D Microbiology, Biology Research Center, Basic Science Faculty, Imam Hossein University, Tehran, Iran. ORCID ID:0000-0002-4693-877X

4- Ms.C Microbial Biotechnology, Department of Cell Biology, Faculty of Basic Sciences, Shahed University, Tehran, Iran. ORCID ID:0000-0002-8802-471X

### ABSTRACT

**Background and Aim:** Enterotoxigenic Escherichia coli is one of the most common bacterial causes of diarrhea worldwide. One of the most important ETEC colonization factors is B subunit of the heat labile enterotoxin, which forms the connecting part of the toxin. In the present study, egg yolk immunoglobulin (IgY) against recombinant LTB protein was produced and its protective effect was evaluated in the animal model.

**Material and methods:** Hens were injected intramuscularly with 100 µg of recombinant LTB protein. Antibody titers of the sera were estimated and the eggs were collected. IgYs were purified from egg yolk and the antibody titers were subsequently estimated by ELISA method. Efficacy of different concentrations of IgY against the effect of LT toxin on Y1 cells was also studied. In order to investigate the effect of IgY-treated bacteria on intestinal epithelial cells we used standard ileal loop technique.

**Results:** Induction of protein expression led to the production of recombinant LTB with molecular weight of about 14 kDa. Concentration of purified protein was 4.5mg/ml. Immunization of the hens induced serum antibody rise. IgY against LTB was purified from egg yolk at a concentration of 12mg/ml. 125 µg per ml of IgY against LTB prevented the effects of heat labile enterotoxin on Y1. In the ileal loop test, 1.5 mg / ml of IgY neutralized the toxin effect of LTB on the intestine. Accumulation of fluid in the test loops decreased by 74.8% compared to that in the untreated control loops.

**Conclusion:** The results obtained indicated that specific egg yolk immunoglobulin was effective against recombinant LTB protein and can be used as a preventive antibody to inhibit the heat labile enterotoxin function of ETEC bacteria.

**Keywords:** Enterotoxigenic Escherichia coli, Heat labile enterotoxin, Passive immunity, Egg yolk immunoglobulin, Virulence factor

**Received:** April 20, 2020

**Accepted:** Jan 11, 2021

**How to cite the article:** M.Mafi ,S.L.Mousavi Gargari,Sh.Nazarian ,F.Mohammad khani. Production of Egg Yolk Immunoglobulin (IgY) Against Recombinant LTB of Enterotoxigenic Escherichia coli (ETEC) and Evaluation of Its Protective Effect in Animal Model. *SJKU*2021;26(6):107-123.

Copyright © 2018 the Author (s). Published by Kurdistan University of Medical Sciences. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Non Commercial License 4.0 (CCBYNC), where it is permissible to download, share, remix, transform, and build up the work provided it is properly cited. The work cannot be used commercially without permission from the journal

## تولید ایمونوگلوبولین مرعی (IgY) علیه پروتئین نوترکیب LTB از اشرشیاکلی انتروتوکسیژنیک (ETEC) و ارزیابی اثر محافظتی آن در مدل حیوانی

مریم مافی<sup>۱</sup>، سید لطیف موسوی گرگری<sup>۲</sup>، شهرام نظریان<sup>۳</sup>، فاطمه محمد خانی<sup>۴</sup>

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی میکروبی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شاهد، تهران، ایران. کد ارکید: ۰۰۰۰-۰۰۰۲-۸۴۴۲-۰۲۰X
۲. دکتری تخصصی بیوشیمی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شاهد، تهران، ایران. پست الکترونیک: [slmousavi@shahed.ac.ir](mailto:slmousavi@shahed.ac.ir)، تلفن: ۵۱۲۱۲۳۲-۰۲۱، کد ارکید: ۰۰۰۰-۰۰۰۲-۴۶۳۵-۸۷۱۶
۳. دکتری تخصصی میکروبیولوژی، مرکز تحقیقات زیست‌شناسی، دانشکده و پژوهشکده علوم پایه، دانشگاه جامع امام حسین (ع)، تهران، ایران. کد ارکید: ۰۰۰۰-۰۰۰۲-۴۶۹۶-۸۷۷X
۴. دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی میکروبی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شاهد، تهران، ایران. کد ارکید: ۰۰۰۰-۰۰۰۲-۸۸۰۳-۴۷۱X

### چکیده

**زمینه و هدف:** اشرشیاکلی انتروتوکسیژنیک یکی از رایج‌ترین عوامل باکتریایی مولد اسهال در جهان است. از مهم‌ترین فاکتورهای حدت‌زا (ETEC) Enterotoxigenic Escherichia coli، می‌توان به زیر واحد B توکسین حساس به حرارت اشاره کرد که قسمت اتصال توکسین را شکل می‌دهد. در مطالعه پیش رو آنتی‌بادی مرعی علیه پروتئین نوترکیب Lymphotoxin Beta (LTB) تولید و اثر محافظتی آن در مدل حیوانی مورد آزمایش قرار گرفت.

**مواد و روش‌ها:** ۱۰۰ میکروگرم پروتئین نوترکیب LTB به صورت داخل عضلانی به مرغ‌ها تزریق شد. تیتراژ آنتی‌بادی در سرم مرغ‌ها اندازه‌گیری و تخم‌مرغ‌ها جمع‌آوری و IgY Immunoglobulin Y (IgY) ها از زرده تخم‌مرغ با کمک سدیم کلراید تخلیص و تیتراژ آنتی‌بادی با روش ELISA بررسی شد. توانایی IgY در ممانعت از عملکرد LT توکسین بر سلول‌های Y1 در رقت‌های متفاوت IgY سنجیده شد. به منظور بررسی اثر باکتری‌تیمار شده با IgY بر سلول‌های اپیتلیال روده، از روش استاندارد لوپ ایلنل استفاده گردید.

**یافته‌ها:** القاء بیان پروتئین منجر به تولید LTB نوترکیب با وزن تقریبی ۱۴ کیلو دالتون شد. غلظت پروتئین تخلیص شده ۴/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. با ایمن‌سازی مرغ‌ها تیتراژ آنتی‌بادی سرمی افزایش یافت. آنتی‌بادی مرعی علیه پروتئین LTB با غلظت ۱۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از زرده تخم‌مرغ تخلیص شد. IgY علیه پروتئین نوترکیب LTB در رقت ۱۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر اثرات توکسین حساس به حرارت LT بر سلول‌های Y1 را خنثی کرد. در تست لوپ ایلنل خنثی‌سازی توکسین با رقت ۱/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر IgY، مانع از عملکرد توکسین در روده شد. تجمع مایع درون لوپ ۷۴/۸ درصد در مقایسه با لوپ‌های کنترل کاهش یافت.

**نتیجه‌گیری:** نتایج به دست آمده بیانگر آن است که می‌توان از آنتی‌بادی مرعی اختصاصی علیه پروتئین نوترکیب LTB به عنوان آنتی‌بادی پیشگیرانه جهت جلوگیری از عملکرد توکسین حساس به حرارت باکتری ETEC استفاده نمود.

**کلمات کلیدی:** اشرشیاکلی انتروتوکسیژنیک، انتروتوکسین حساس به حرارت، ایمنی غیرفعال، ایمونوگلوبولین، فاکتور بیماری‌زایی

وصول مقاله: ۹۹/۲/۱ اصلاحیه نهایی: ۹۹/۱۰/۱۱ پذیرش: ۹۹/۱۰/۲۲

## مقدمه

عفونت‌های روده‌ای و بیماری‌های اسهالی هنوز هم یکی از اساسی‌ترین مشکلات و معضلات درمانی-بهداشتی جامعه جهانی به ویژه در کشورهای در حال توسعه به شمار می‌آیند. بر اساس آمارهای جهانی، پس از بیماری‌های سرطان و قلبی-عروقی، این بیماری‌ها یکی از مهم‌ترین علل مرگ انسان‌ها به حساب می‌آیند (۱)، چنانچه اسهال عفونی حاد در سال جان تقریباً ۱/۶-۲/۵ میلیون کودک را در سراسر جهان می‌گیرد (۲، ۳). باکتری اشیرشیاکلی انتروتوکسیژنیک (ETEC) رایج‌ترین علت اسهال مسافران و همچنین عامل نسبتاً رایج اسهال در بره‌ها و گوساله‌ها و خوک‌ها است. ETEC دارای عوامل حدت‌زا است که از جمله آن‌ها می‌توان به فاکتورهای کلونیزاسیون، توکسین مقاوم به حرارت و حساس به حرارت اشاره نمود. ETEC از طریق فاکتورهای کلونیزاسیون به سطح سلول‌های اپیتلیال روده اتصال پیدا کرده و با ترشح توکسین حساس به حرارت (LT) و مقاوم به حرارت (ST) باعث ایجاد بیماری می‌شود (۴) ETEC به طور معمول نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های متفاوت از جمله تتراسایکلین، اریتروماکسین، استرپتوماکسین، آمپی‌سیلین، نئوماکسین، سولفونامیدها و تری‌متوپریم حساس می‌باشد. اگرچه این آنتی‌بیوتیک‌ها برای اسهال شدید تجویز می‌شوند؛ اما مقاومت آنتی‌بیوتیکی و سویه‌های مقاوم، به دلیل توانایی زیاد این باکتری در تبادل پلاسمیدهای مقاوم، هر روزه افزوده می‌شوند (۱، ۶-۴). مطالعات نشان می‌دهد که ۷۹ تا ۹۰ درصد سویه‌های ETEC به آمپی‌سیلین و ۲۸ تا ۳۷ درصد به تری‌متوپریم و تعداد اندکی هم به افلوکساسین مقاوم هستند (۷). همچنین، این سویه‌ها در حال مقاوم شدن در برابر اریتروماکسین هستند. استفاده بیش از حد از آنتی‌بیوتیک‌ها تهدیدی واقعی برای جوامع بشری است که روش‌های جدید درمانی باید جایگزین آن‌ها شود، این موضوع باعث بالا رفتن آمار مرگ و میر به جهت ناکارآمد بودن درمان شده است (۸). اصلی‌ترین تهدید، افزایش میکروب‌ها در سراسر جهان است. به این منظور سازمان بهداشت جهانی به دنبال

ساخت داروهای جدید می‌باشد (۸). آنتی‌بادی‌های پرندگان می‌توانند جایگزین ارزشمند آنتی‌بیوتیک‌ها برای کاهش مقاومت آنتی‌بیوتیکی و ضد میکروبی باشند (۹). یکی از راه‌های ممکن جهت پیشگیری و درمان این عفونت، تولید آنتی‌بادی مرغی (IgY) کارآمد است که توانایی القای ایمنی در برابر اغلب سویه‌های باکتریایی را داشته باشد. IgY با اتصال به باکتری مانع از اتصال به سلول‌های میزبان و در نهایت مانع از کلونیزاسیون و حمله به سلول‌های هدف و ایجاد ایمنی غیرفعال می‌شود (۱۱، ۱۰). تجویز خوراکی IgY برای درمان موفقیت‌آمیز باکتری ETEC، اثبات شده است (۱۲). ویژگی‌های IgY مانند تولید آسان و ارزان، حفاظت از حقوق حیوانات، عدم واکنش با سیستم کمپلمان و عدم پاسخ به فاکتورهای روماتوئیدی، راه را برای استفاده از آن بر علیه عفونت‌های روده‌ای در پستانداران باز کرده است. برای طراحی IgY از مولکول‌های کاندیدای واکنشی استفاده می‌شود که علاوه بر ویژگی ایمنی زایی و بی‌ضرر بودن، شیوع زیادی بین انواع سویه‌ها داشته و همچنین دارای اپی‌توب‌های مشترک و محافظت شده باشند. یکی از اصلی‌ترین کاندیدای واکنشی برای ETEC، ژن زیر واحد B توکسین حساس به حرارت است که قسمت اتصال توکسین را شکل داده و به گیرنده‌های (GM1) monosialotetrahexosylganglioside سطح سلول‌های اپیتلیالی روده اتصال می‌یابد. گزارش‌های زیادی مبنی بر استفاده از زیر واحد LTB به عنوان کاندید واکنش وجود دارد (۱۶-۱۳). با توجه به نکات ذکر شده در بالا، هدف از این مطالعه تولید IgY علیه پروتئین نوترکیب LTB و ارزیابی تیر آنتی‌بادی و بررسی اثر حفاظت بخشی IgY تولید شده بر مهار کلونیزاسیون و اثرات توکسین حساس به حرارت باکتری ETEC در مدل حیوانی و محیط *In vitro* است.

## مواد و روش‌ها

## نوع مطالعه

و مرحله طولیل شدن در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۴۰ ثانیه و سیکل پایانی مربوط به مرحله طولیل شدن در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه اجرا گردید.

بیان و تخلیص پروتئین نو ترکیب LTB:

بهینه سازی بیان پروتئین نو ترکیب با سه متغیر زمان، دما و غلظت IPTG (کالازیست، ایران) انجام گردید. بیان مطلوب پروتئین نو ترکیب LTB با اضافه کردن ۷۰ میلی گرم بر لیتر کانامایسین (کالازیست، ایران) به محیط کشت، افزودن IPTG با غلظت نهایی ۱ میلی مولار در  $OD_{600} = 0.6$  و دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۵ ساعت انجام گرفت (۱۸). جهت بررسی بیان و خلوص پروتئین، از الکتروفورز SDS-PAGE (Bio-Rad، آمریکا) استفاده شد (۱۹). تخلیص پروتئین نو ترکیب LTB از فاز نامحلول عصاره سلولی به علت خلوص بالای ۹۰ درصد در این فاز بدون نیاز به ستون و تنها از طریق شستشوی اجسام توده ای (inclusion bodies) صورت پذیرفت. در این روش به رسوب سلولی به ازای هر میلی لیتر، ۸۰ میکرو لیتر بافر TE ( $NaH_2PO_4$ ، HCl، Tris- $pH=8$ ) اضافه گردید، سپس ۶ بار عمل سونیکاسیون (قدرت ۷۰ درصد، پالس ۰/۵) به مدت ۴۵ ثانیه هر بار همراه با ۴۵ ثانیه استراحت در یخ، روی نمونه انجام گرفت. سلول های لیز شده به مدت ۱۵ دقیقه در ۴ درجه سانتی گراد و با سرعت ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شده و محلول رویی جمع آوری شد. رسوب حاصل بار دیگر مانند مرحله قبل در بافر TE یکنواخت و سانتریفیوژ گردید. رسوب به دست آمده از مرحله دوم به ازای هر میلی لیتر در ۸۰ میکرو لیتر بافر B حاوی اوره ۸ مولار حل شده و سپس به مدت ۴۵ دقیقه در دمای محیط روی شیکر اوربیتال (vision، هند) قرار داده شد و در نهایت سانتریفیوژ گردید. محلول رویی حاوی پروتئین نو ترکیب LTB جدا و به میکروتیوب جدید منتقل شد. تعیین غلظت پروتئین موجود در محلول های حاصل از تخلیص، با روش برادفورد صورت گرفت. به منظور رسم منحنی استاندارد، از محلول های حاوی پروتئین آلبومین گاوی (BSA) با

در این مطالعه تجربی-آزمایشگاهی که در سال ۱۳۹۸ با کد اخلاق ۹۶۷۵۸۶۴۰۰ در دانشگاه شاهد انجام شد، سازه ژنی و کتور بیانی pET28a واجد ژن کد کننده LTB اهدا شده توسط دکتر نظریان (۱۶)، میزبان بیانی اشیریشیا کلی (E.coli BL21-DE3)، جفت پرایمرهای طراحی شده جهت تایید سازه ژنی، محیط های کشت واجد و فاقد آنتی بیوتیک برای کشت میزبان بیانی، محیط کشت های سلولی برای رشد سلول های Y1 و آنتی بادی کانژوگه برای روش الیزا مورد استفاده قرار گرفت.

انتقال سازه ژنی به میزبان بیانی E.coli:

با استفاده از روش شوک حرارتی (۱۷)، پلاسمید حاوی ژن LTB به سلول های مستعد E.coli BL21(DE3) منتقل گردید. در نهایت سلول های E.coli نو ترکیب بر روی محیط کشت LB آگار حاوی آنتی بیوتیک کانامایسین با غلظت نهایی ۸۰ میکرو گرم بر میلی لیتر کشت داده و مرحله انکوباسیون به صورت شبانه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انجام گرفت. از میان کلون های به دست آمده، تعدادی کلنی انتخاب و به طور جداگانه در محیط LB مایع حاوی ۸۰ میکرو گرم بر میلی لیتر کانامایسین به مدت یک شب در شیکر انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و سرعت چرخش ۱۵۰ دور در دقیقه کشت داده شدند. پس از جمع آوری سلول ها، واکنش PCR با استفاده از سوسپانسیون سلول باکتری و پرایمرهای اختصاصی

TGTGCAGAATTCGCTCCTCAGTC  
TTACAAGCTTCTAGTTTCCATACTGA  
TTG در حجم ۲۵ میکرو لیتر شامل ۲/۵ میلی مولار  $MgCl_2$ ، ۰/۲ میلی مولار dNTPs، ۱۰ پیکومول از هر پرایمر، ۲ واحد آنزیم Taq DNA polymerase و ۲/۵ میکرو لیتر از بافر 10X PCR انجام شد. شرایط چرخه دمایی واکنش شامل مرحله واسرشته شدن اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه، که با ۳۰ سیکل با شرایط دمایی واسرشته شدن ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ ثانیه، مرحله اتصال در دمای ۵۸ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه

برای ایمنی‌زایی در مرغ‌ها (مرغ مادر پیوند، ایران)، مقدار ۱۰۰ میکروگرم پروتئین نوترکیب LTB به ازای هر مرغ با بافر PBS استریل، به حجم ۵۰۰ میکرولیتر رسانده شد و با ۵۰۰ میکرولیتر از ادجوانت مونتاناید (Seppic، فرانسه)، هموزن و به صورت داخل عضلانی به چهار قسمت از عضله سینه مرغ تزریق گردید. مرغ کنترل مخلوطی حاوی ۵۰۰ میکرولیتر بافر PBS به همراه ۵۰۰ میکرولیتر از ادجوانت مورد نظر را دریافت کرد. تزریق در سه نوبت با فاصله دو هفته در یک گروه دوتایی مرغ لگهورن سفید و یک گروه دوتایی مرغ کنترل انجام گردید. جمع‌آوری تخم مرغ با فاصله زمانی ۱۰ روز بعد از هر تزریق انجام شد. این کار تا ۴۵ روز بعد از آخرین تزریق نیز ادامه پیدا کرد.

#### تخلیص IgY:

در این تحقیق از روش ترقیق اسیدی و ترسیب نمکی برای تخلیص آنتی بادی مرغی از زرده تخم مرغ استفاده شد (۲۰). به منظور تخلیص IgY و تجزیه و تحلیل خواص آن، بخش محلول در آب با روش رقیق سازی از زرده تخم مرغ جدا شد، در این روش زرده تخم مرغ در شرایط اسیدی (pH=4) توسط آب رقیق شده و ۳ روز در ۴- درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس برای جداسازی IgY پس از عبور محلول فریز شده زرده تخم مرغ از کاغذ صافی، IgY توسط سدیم کلراید (کاسپین، ایران)، تغلیظ و به مدت ۲۰ دقیقه و با دور ۳۴۰۰ g رسوب داده شد. خلوص IgY توسط SDS-PAGE بررسی گردید.

#### بررسی تیتراژ آنتی بادی مرغی علیه پروتئین LTB:

برای سنجش اختصاصیت IgY تولید شده علیه پروتئین نوترکیب LTB از روش الایزا استفاده گردید (۲۱). در این تست پس از بهینه سازی رقت‌ها، ۵ میکروگرم پروتئین نوترکیب LTB که با بافر تثبیت کننده به حجم ۱۰۰ میکرولیتر رسانده شده بود در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه اضافه گردید. پلیت (کالازیست، ایران) به مدت یک شب در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد، برای جلوگیری از واکنش‌های ناخواسته آنتی‌بادی مرغی و آنتی‌بادی مرغی

غلظت‌های معین استفاده شد. جذب آن‌ها در طول موج ۵۹۵ نانومتر به کمک دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد، سپس از داده‌های به دست آمده منحنی استاندارد رسم گردید و معادله‌ی حاصل از آن برای محاسبه‌ی میزان پروتئین در نمونه‌های مجهول مورد استفاده قرار گرفت. برای باز کردن اجسام توده‌ای و فولد مجدد پروتئین نوترکیب LTB، از غلظت‌های مختلف محلول اوره (کاسپین، ایران) و کیسه دیالیز با قطع ۱۲ کیلودالتون (کالازیست، ایران) استفاده شد. در این روش محلول پروتئین داخل کیسه دیالیز، درون بشر حاوی محلول اوره ۶ مولار قرار داده شد و به مدت ۲ ساعت در ۴ درجه سانتی‌گراد روی همزن قرار گرفت، مشابه همین عمل به ترتیب در محلول‌های اوره ۴، ۲ و PBS خالص انجام گرفت تا بافر اوره به تدریج با PBS جایگزین شده و پروتئین ساختار اصلی خود را باز یابد.

#### تائید پروتئین نوترکیب LTB:

برای تائید پروتئین تخلیص شده از Anti CTxB (سیگما، آمریکا) و تکنیک الایزا استفاده شد (۱۷). پروتئین LTB تخلیص شده با سریال رقت ۵ میکروگرم تا ۱۲۵ نانوگرم بر چاهک‌های اول تا آخر به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد تثبیت شد. چاهک‌ها با بافر شستشو (PBS حاوی ۵ درصد توئین ۲۰) سه مرتبه شستشو داده شدند. در این مرحله داخل تمام چاهک‌ها به میزان ۱۰۰ میکرو لیتر بافر بلاکینگ (۵ درصد شیر خشک بدون چربی) در بافر شستشو ریخته و به مدت ۱ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. پس از شستشوی چاهک‌ها از رقت ۱/۵۰۰۰ آنتی بادی ضد CTxB و رقت ۱/۲۵۰۰ آنتی‌بادی کانژوگه موشی در الایزا استفاده گردید. در ادامه ۱۰۰ میکرولیتر از سوبسترای TMB به چاهک‌ها افزوده و بعد از ۱۵ دقیقه مهار واکنش با اسید سولفوریک صورت گرفت. پس از توقف کامل واکنش، جذب نوری چاهک‌ها توسط قرائت‌گر الایزا در طول موج ۴۵۰ نانومتر خوانده شد. ایمنی‌زایی مرغ‌ها:

کانزوگه با کف چاهک‌های میکروپلیت، مناطق خالی از آنتی‌ژن بلاک گردید. برای این کار، ۲۰۰ میکرولیتر از بافر بلاکینگ ۵ درصد شیر خشک بدون چربی (کاسپین، ایران) در هر چاهک ریخته شد و به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. در این تست ۵ میکروگرم Igy و رقت ۱/۲۰۰۰ آنتی‌بادی کانزوگه (Sigma، آمریکا) به عنوان آنتی‌بادی اولیه و ثانویه مورد استفاده قرار گرفت. چاهک‌ها در فواصل هر مرحله سه بار و هر بار با ۴۰۰ میکرولیتر بافر PBST شستشو داده شده و در نهایت با ضربه زدن روی دستمال خشک گردید. در ادامه سوبسترای TMB به چاهک‌ها افزوده و بعد از ۱۵ دقیقه مهار واکنش با اسید سولفوریک صورت گرفت. پس از توقف کامل واکنش، جذب نوری چاهک‌ها توسط قرائت‌گر الایزا (Perlong، انگلستان) در طول موج ۴۵۰ نانومتر خوانده شد. نتایج الایزا و تیتراژ آنتی‌بادی گروه اصلی با گروه کنترل مورد ارزیابی و مقایسه قرار گرفت.

بررسی ممانعت آنتی‌بادی از عملکرد توکسین بر سلول Y1: روش کشت سلول Y1 (انستیتو پاستور، ایران) برای سنجش فعالیت Igy در مهار عملکرد توکسین حساس به حرارت باکتری ETEC مورد استفاده قرار گرفت (۲۲). در این روش برای کشت سلول Y1 از محیط کشت Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (کالازیست، ایران) و ۱۰٪ FBS درصد استفاده شد. تعداد ۱۰<sup>۵</sup> سلول تریپسینه شده Y1 به درون چاهک‌ها اضافه گردید. پلیت تا مدت زمان تشکیل تک لایه سلولی در گرمخانه CO<sub>2</sub> دار در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد، پس از آن به مدت ۱۸ ساعت در مجاورت رقت‌های ۳۵۰-۲۷۵-۲۰۰-۱۲۵-۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر Igy قرار گرفت و سپس با ۱ نانوگرم توکسین LT به مدت یک ساعت انکوبه شد. در نهایت چاهک‌ها با PBS سترون، سه بار شستشو و با یک میلی‌لیتر از الکل متانول به مدت ۵ دقیقه ثابت شدند. سلول‌ها با استفاده از رنگ گیمسا (کاسپین، ایران) به مدت ۵ دقیقه رنگ‌آمیزی و با بافر PBS شسته شدند. شکل ظاهری

سلول‌های مجاور شده با نمونه‌های مرغ ایمن و غیر ایمن بررسی گردید. از توکسین LT و PBS به عنوان کنترل مثبت و منفی استفاده شد.

بررسی ممانعت آنتی‌بادی از عملکرد توکسین در لوپ ایلنال: به منظور سنجش توانایی آنتی‌بادی در ممانعت از عملکرد توکسین حساس به حرارت باکتری ETEC در روده خرگوش (موسسه تحقیقاتی واکسن و سرم‌سازی رازی، ایران) از روش لوپ ایلنال استفاده شد (۲۳). به منظور انجام آزمایش، ۳۶ ساعت قبل از جراحی، غذای یک سر خرگوش سفید نیوزیلندی قطع و تنها با آب دارای گلوکز (کاسپین، ایران) ۱۰ درصد تغذیه شد. خرگوش با تزریق ۶۰۰ و ۸۰۰ ماکرولیتر زایلزین و کتامین (داروخانه دامپزشکی دانشگاه تهران، ایران)، درون عضله بیهوش شد. پس از شکافتن شکم از بخش ایلوم روده کوچک حیوان ۸ لوپ به طول میانگین ۳ سانتی‌متر به وسیله نخ بخیه (داروخانه دامپزشکی دانشگاه تهران، ایران) جدا گردید. به لوپ‌های ایجاد شده ۲۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون حاوی ۵×۱۰<sup>۶</sup> باکتری ETEC H10408 (۱ ساعت انکوبه با رقت‌های ۵ و ۱/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر Igy تلقیح گردید. پس از گذشت ۱۸ ساعت از جراحی، لوپ‌ها با دقت از بدن حیوان بیرون آورده و وزن هر لوپ و میزان ترشحات موجود در آن اندازه‌گیری شد و در نهایت با تقسیم وزن هر لوپ بر اندازه آن ضریب تجمع مایع محاسبه گردید.

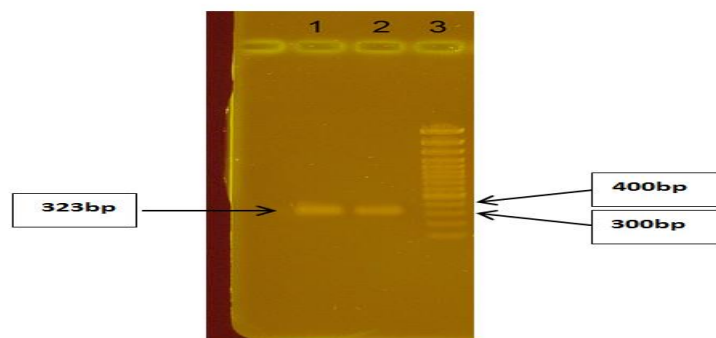
تجزیه و تحلیل آماری:

برای تعیین نرمال بودن داده‌ها از آزمون کلموگراف-ایرنوزوف استفاده شد و آنالیز واریانس داده‌ها با استفاده از انوای یک طرفه و مقایسه میانگین گروه‌های تست و کنترل با استفاده از آزمون دانکن انجام گرفت. کلیه عملیات آماری با استفاده از نرم افزار SPSS 22 انجام شد.

#### یافته‌ها

با استفاده از روش شوک حرارتی، پلاسمید حاوی ژن LT<sub>B</sub> به سلول‌های مستعد E.coli BL21(DE3) منتقل گردید.

شکل ۱ دیده می‌شود محصول PCR با اندازه ۳۲۳ جفت باز تائید کننده سازه ژنی pET28a-ltb بود.

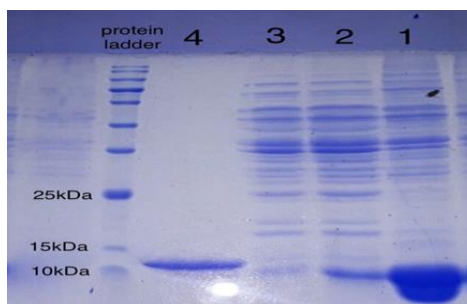


شکل ۱. الکتروفورز محصولات PCR تکثیر شده جهت بررسی کلون‌های نو ترکیب

بهبود سازی بیان پروتئین نو ترکیب LTB با وزن ملکولی ۱۴ کیلودالتون در فاز نامحلول، بیان و خلوص آن روی ژل SDS-PAGE بررسی گردید. همان‌طور که در شکل ۲ مشاهده می‌شود ستون ۳ و ۴ مربوط به بیان پروتئین نو ترکیب LTB در فاز نامحلول است. وجود نشانگر پروتئینی در کنار ستون ۴ بیانگر وزن ملکولی پروتئین بیان شده می‌باشد.

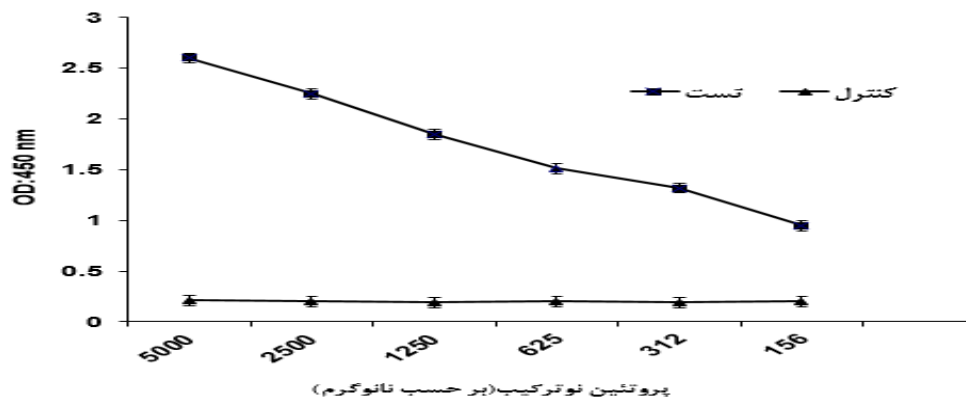
با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن کد کننده LTB، کلونی‌های رشد یافته باکتری بررسی شد. همان‌طور که در

ردیف ۳: نشانگر اندازه DNA (100bp DNA ladder) plus)، ردیف‌های ۱ و ۲: محصول PCR تکثیر شده ژن ltb از کلون‌های نو ترکیب. تکثیر قطعه ژنی ۳۲۳ جفت بازی تائید کننده وجود قطعه ژنی کد کننده ltb در وکتور بیانی pET28a بود.



شکل ۲. بررسی بیان و تخلیص پروتئین نو ترکیب LTB بر روی ژل SDS-PAGE ۱۲ درصد با رنگ آمیزی کوماسی بلو. برای تائید پروتئین نو ترکیب از روش الیزا و آنتی‌بادی ضد کلرا توکسین که بیش از ۸۵ درصد با پروتئین LTB همخوانی آمینواسیدی دارد استفاده شد. همان‌طور که در نمودار ۱ دیده می‌شود با کاهش رقت‌های متوالی غلظت آنتی‌ژن نو ترکیب از ۵۰۰۰ نانوگرم به ۱۵۶ نانوگرم، جذب نوری واکنش الیزا از ۲/۶ واحد به ۰/۹۵ واحد کاهش یافت. نتایج نشان داد که آنتی‌بادی ضد کلرا توکسین توانسته پروتئین نو ترکیب LTB را شناسایی و با آن واکنش دهد.

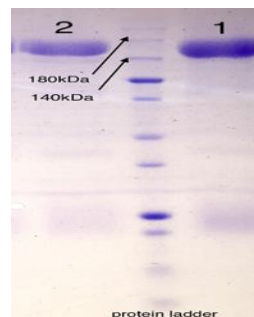
ردیف ۱: عصاره سلولی واجد پلاسمید نو ترکیب pET28a-ltb القاء شده با غلظت ۱ میلی مولار IPTG، ردیف ۲: عصاره سلولی فاقد پلاسمید نو ترکیب pET28a-ltb القاء شده با غلظت ۱ میلی مولار IPTG، ردیف ۳: عصاره حاصل از لیز رسوب سلول‌های القاء شده با IPTG در بافر TE، ردیف ۴: پروتئین نو ترکیب LTB تخلیص شده. (نشانگر اندازه پروتئین PM2600)



نمودار ۱. تأیید پروتئین نو ترکیب LTB به روش الایزا با استفاده از آنتی بادی استاندارد ضد کلرا توکسین.

شد. شکل ۳ الگوی الکتروفورز IgY ضد پروتئین نو ترکیب LTB تخلیص شده از زرده تخم مرغ با استفاده از کلرید سدیم بر روی SDS PAGE ۱۰ درصد با رنگ آمیزی کوماسی بلو را نشان می دهد. باند قطور مولکول کامل IgY خالص شده در شکل دیده می شود. آنتی بادی مرغی علیه پروتئین LTB با غلظت ۱۲ میلی گرم بر میلی لیتر تخلیص شد.

با کاهش غلظت آنتی ژن نو ترکیب از ۵۰۰۰ نانوگرم به ۱۵۶ نانوگرم، جذب نوری واکنش آنتی بادی اختصاصی و آنتی ژن نیز از ۲/۶ به ۰/۹۵ کم می شود که تأیید کننده اتصال اختصاصی آنتی بادی با پروتئین نو ترکیب است. به منظور ارزیابی آنتی بادی مرغی تولید شده، تخم مرغ های ایمن شده ده روز پس از هر تزریق و ۴۵ روز پس از تزریق نهایی جمع آوری و فرایند تخلیص از زرده تخم مرغ ها انجام



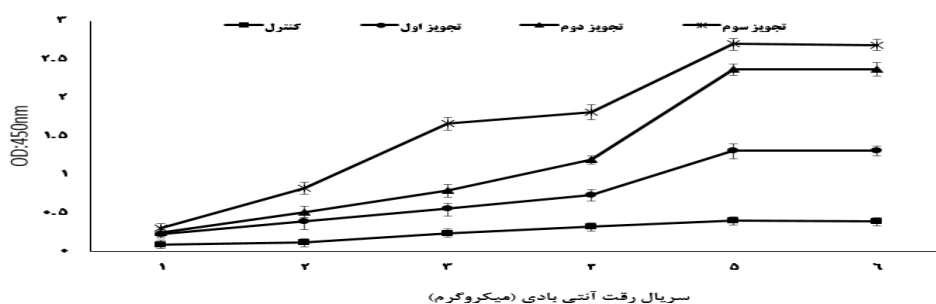
شکل ۳. الکتروفورز IgY ضد پروتئین نو ترکیب LTB تخلیص شده از زرده تخم مرغ با استفاده از کلرید سدیم بر روی SDS PAGE ۱۰ درصد با رنگ آمیزی کوماسی بلو.

تجویزهای اول، دوم، سوم و تخم مرغ های تست و شاهد جمع آوری و بعد از تخلیص آنتی بادی آن ها، آزمایش الایزا انجام گرفت. تجزیه واریانس اثرات تعداد دفعات تجویز بر تیتراژ آنتی بادی انجام شد. بر این اساس طرح آماری برای فاکتورهای مورد ارزیابی در این تحقیق، از لحاظ آماری معنی دار بود ( $p < 0.05$ ).

ردیف ۱ و ۲: نمونه تخلیصی تیمار شده با سمپل بافر فاقد ۲- مرکاپتواتانول. در این حالت IgY به صورت تک باند با وزنی در حدود ۱۸۰ کیلودالتون مشاهده می شود. (نشانه گر مولکولی پروتئین PM2600) از آنتی بادی های تخلیص شده در واکنش الایزا استفاده گردید. نمودار ۲ واکنش الایزا مربوط به پروتئین نو ترکیب تخلیص شده و آنتی بادی مرغی را نشان می دهد. بعد از

مشاهده شد ( $p < 0.01$ )، در حالی که تیتراز آنتی بادی تجویز دوم و تجویز سوم تفاوت معنی داری را نشان نداد ( $p > 0.01$ ). همچنین بر اساس نمودار شماره ۳ تیتراز آنتی بادی پس از گذشت ۴۵ روز از تجویز آنتی ژن تفاوت معنی داری با تیتراز آنتی بادی پس از تجویز دوم و سوم نداشت ( $p > 0.01$ ).

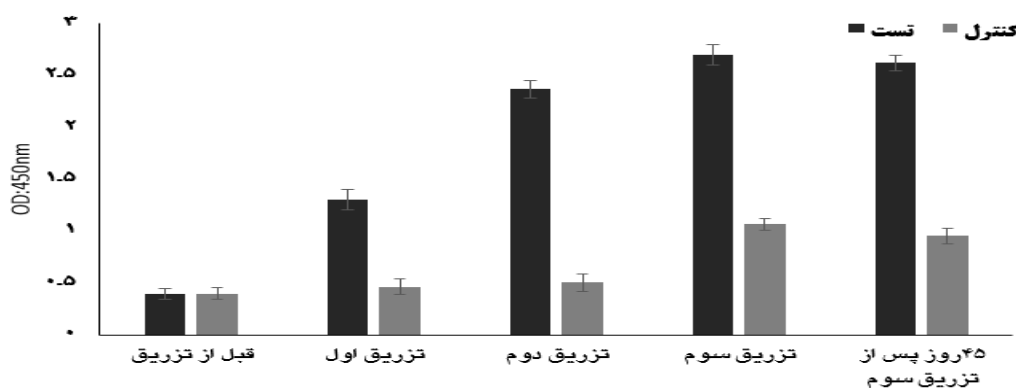
نتایج به دست آمده از تیتراز آنتی بادی نشان می دهد که در مرغ های ایمن شده تیتراز آنتی بادی به صورت معنی داری بالاتر از گروه کنترل ( $p < 0.01$ ) بود. در هر مرحله از تزریق شاهد افزایش تیتراز آنتی بادی بودیم به نحوی که بیشترین میزان جذب نوری مربوط به غلظت ۵ میکروگرم آنتی بادی در تزریق سوم ۲/۶۹ واحد بود. بر اساس نتایج به دست آمده تفاوت معنی دار تیتراز آنتی بادی تجویز اول با دوم و سوم



#### نمودار ۲. تیتراز آنتی بادی IgY تخلیص شده علیه ۵ میکروگرم پروتئین نوترکیب LTB در فواصل زمانی تزریق های اول، دوم، سوم و قبل از تزریق.

جذب نوری مربوط به غلظت ۵ میکروگرم آنتی بادی در تزریق سوم ۲/۶۹ واحد بود.

در مرغ های ایمن شده تیتراز آنتی بادی به صورت معنی داری بالاتر از گروه کنترل ( $p < 0.01$ ) بود. در هر مرحله از تزریق تیتراز آنتی بادی افزایش یافت به نحوی که بیشترین میزان



#### نمودار ۳. تیتراز آنتی بادی IgY تخلیص شده علیه ۵ میکروگرم پروتئین نوترکیب LTB در فواصل زمانی تزریق های اول، دوم، سوم و ۴۵ روز پس از تزریق سوم.

صورت معنی داری بالاتر از گروه کنترل ( $p < 0.01$ ) بود. در هر مرحله از تزریق تیتراز آنتی بادی مرغی افزایش یافت به

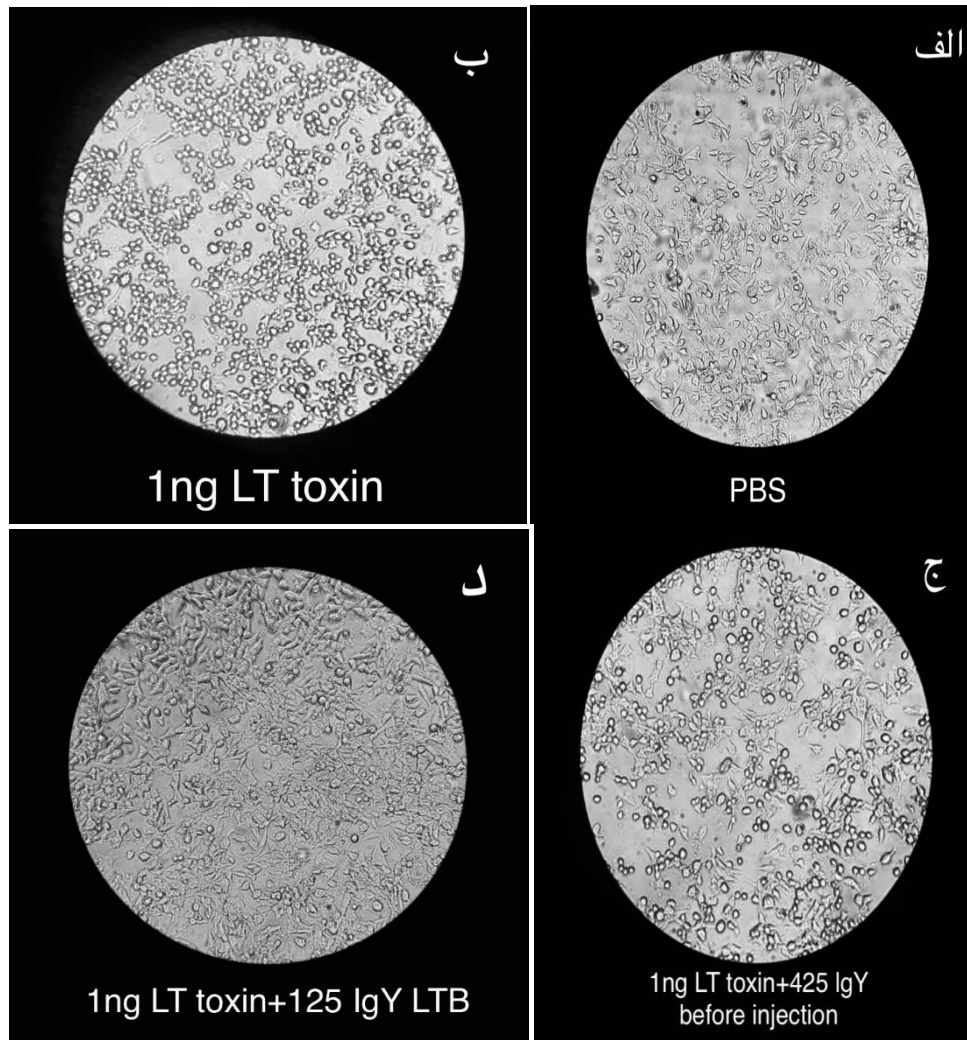
بررسی تیتراز آنتی بادی IgY تخلیص شده علیه پروتئین نوترکیب LTB در گروه ایمن و غیر ایمن. همانطور در نمودار دیده می شود در مرغ های ایمن شده تیتراز آنتی بادی به

مشاهده می‌شود رقت ۱۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر آنتی‌بادی تولید شده علیه پروتئین نوترکیب LTB دارای حفاظت‌بخشی علیه اثرات ۱ نانوگرم توکسین حساس به حرارت باکتری ETEC بر روی سلول Y1 است. در حالی که رقت ۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر آنتی‌بادی تولید شده علیه پروتئین نوترکیب LTB نتوانست به صورت مؤثری شکل طبیعی سلول‌ها را حفظ کند.

نحوی که بیشترین میزان OD مربوط به تزریق سوم و به میزان ۲/۶۹۷۲ واحد بود.

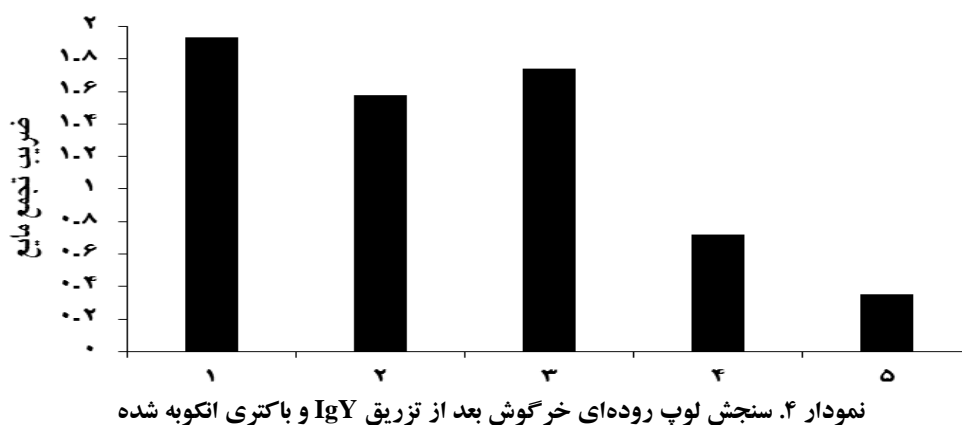
فعالیت آنتی‌بادی IgY در ممانعت از عملکرد توکسین بر سلول Y1:

آنتی‌بادی‌های ایجاد شده بر علیه پروتئین نوترکیب LTB نتوانست از اثرات توکسین حساس به حرارت LT جلوگیری نماید و مانع از گرد شدن سلول‌های Y1 و حفظ شکل دوکی و طبیعی سلول‌ها شود. همان‌طور که در شکل‌های شماره ۴



شکل ۴. بررسی ممانعت آنتی‌بادی IgY از عملکرد توکسین LT بر سلول Y1

برای ارزیابی اثرات محافظتی، تجمع مایع در لوپ‌های روده خرگوش مورد بررسی و اندازه‌گیری قرار گرفت و ضریب تجمع مایع که از تقسیم وزن هر لوپ به گرم به اندازه آن لوپ به سانتی‌متر به دست می‌آید، محاسبه شد (نمودار شماره ۴). ضریب تجمع مایع در لوپ‌های روده خرگوشی که رقت ۱/۵ میلی‌گرم IgY را بعد یک ساعت انکوبه کردن با  $5 \times 10^6$  cfu باکتری ETEC دریافت کرده بودند، ۰/۷۲۲ بود که به طور چشمگیری کمتر از میزان تجمع مایع در لوپ‌های روده خرگوشی که هیچ IgY دریافت نکرده بود با ضریب ۱/۹۳۵ یا IgY تخم‌مرغ قبل تزریق با ضریب ۱/۵۷۵، بود. بر این اساس تجمع مایع درون لوپ‌های حاوی IgY تا حدود ۶۵ درصد کاهش داشته است. (شکل شماره ۵)



۱: ضریب تجمع مایع در لوپ خرگوش حاوی  $5 \times 10^6$  cfu + LTB  
 ۲: باکتری ETEC. ضریب تجمع مایع در لوپ خرگوش حاوی ۱/۵ میلی‌گرم IgY نمونه کنترل به همراه  $5 \times 10^6$  cfu باکتری ETEC. ضریب تجمع مایع در لوپ خرگوش حاوی PBS به عنوان کنترل منفی.

الف: سلول Y1 طبیعی در مجاورت PBS (ترکیبات موجود در PBS و یا محیط تخلیص توکسین باعث گرد شدن سلول‌ها نمی‌شوند). ب: گرد شدن سلول Y1 بر اثر مجاورت با ۱ نانوگرم توکسین LT. ج: سلول Y1 در مجاورت با ۱ نانوگرم توکسین LT و ۴۲۵ میکروگرم IgY نمونه کنترل که توانایی مهار اثر توکسین را ندارد و نمی‌تواند مانع از گرد شدن سلول‌ها شود. د: سلول Y1 در مجاورت با ۱ نانوگرم توکسین LT و ۱۲۵ میکروگرم IgY تولید شده LT. ممانعت آنتی‌بادی از عملکرد توکسین و باقی ماندن سلول‌ها به شکل دوکی و کشیده در شکل د به وضوح دیده می‌شود. سنجش لوپ روده‌ای:

۳: باکتری ETEC. ضریب تجمع مایع در لوپ خرگوش حاوی ۱/۵ میلی‌گرم IgY تولید شده علیه پروتئین نوترکیب  
 ۴: باکتری ETEC. ضریب تجمع مایع در لوپ خرگوش حاوی ۱/۵ میلی‌گرم IgY تولید شده علیه پروتئین نوترکیب



شکل ۵. سنجش لوپ روده‌ای خرگوش و بررسی فعالیت آنتی بادی در ممانعت از اتصال باکتری ETEC، عملکرد توکسین LT و تجمع مایع درون لوپ‌های خرگوشی

باکتری ETEC در طی دو مرحله باعث بروز بیماری و عفونت اسهالی می‌شود در مرحله اول با استفاده از فاکتورهای اتصالی خود را به سطح سلول میزبان نزدیک و به آن متصل می‌گردد، در مرحله بعد با تولید و ترشح توکسین، علائم در فرد بروز می‌کند. بدیهی است که اگر بتوان مانع از اتصال و تولید توکسین شد، می‌توان از بروز بیماری و پاسخ مقاومتی علیه باکتری جلوگیری کرد. پروتئین LTB یکی از عوامل اصلی حدت‌زای باکتری می‌باشد و در بسیاری از سویه‌های بالینی وجود دارد. در مطالعات بسیاری از LTB به عنوان یک اجزای مناسب برای تحریک سیستم ایمنی علیه عوامل بیماری‌زا استفاده شده است (۱۳-۱۶). در سال ۲۰۰۵ مؤذنی و همکاران ژن LTB را در مخمر ساکارومایسس سرویزیه بیان کردند و مطالعات آن‌ها نشان داد که LTB یک کاندیدای واکسن مناسب و ارزان قیمت است (۱۵). خلصی و همکاران، ژن LTB را به وکتور pET28a انتقال داده و درون E.coli همسانه‌سازی کردند و پس از بیان و تخلیص پروتئین نوترکیب (۲۴)، آنتی بادی علیه آن در موش تولید شد، این آنتی بادی می‌توانست توکسین LT را خنثی نماید (۲۵). این زیر واحد پروتئینی علاوه بر اینکه سبب تولید آنتی‌بادی و ایجاد محافظت علیه توکسین LT می‌شود، خود به عنوان یک اجزای زیستی مهم مطرح است که می‌تواند

۱: لوپ حاصل از تزریق  $5 \times 10^6$  cfu باکتری ETEC + ۱/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از IgY تخم مرغ قبل از تزریق. ۲: لوپ حاصل از تزریق  $5 \times 10^6$  cfu باکتری ETEC. ۳: لوپ حاصل از تزریق  $5 \times 10^6$  cfu باکتری ETEC + ۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از IgY تولید شده علیه پروتئین نوترکیب LTB. ۴: لوپ حاصل از تزریق  $5 \times 10^6$  cfu باکتری ETEC + ۱/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از IgY علیه پروتئین نوترکیب LTB. ۵: لوپ حاصل از تزریق PBS

### بحث

کشورهای در حال توسعه با آب و هوای گرمسیری جزو مناطقی هستند که با معضلات بهداشتی از جمله اسهال ناشی از ETEC خصوصاً در کودکان زیر ۵ سال، مواجه است. به همین دلیل، تلاش برای درمان عفونت‌های ETEC یکی از اهداف اصلی محققان این رشته می‌باشد. با توجه به ظهور سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک، استفاده از آنتی‌بادی‌ها به منظور ایجاد ایمنی غیرفعال و مقابله با عفونت‌های اسهالی حائز اهمیت است. ETEC نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های بسیاری حساس است و به علت توانایی زیاد سویه‌های مقاوم ETEC در تبادل پلاسمیدهای مقاوم، مقاومت آنتی‌بیوتیکی آن‌ها رو به افزایش است (۱، ۶-۴). عملکرد

(۴،۳۰). همچنین درمان مؤثر IgY بر روی گونه‌های هلیکوباکتر پیلوری، سالمونلا و رتروویروس‌ها نشان داده شده است (۳۱). خانم ویس ملک‌شاهی و همکاران توانستند با گاوآز IgY به معده موش‌های دارای زخم معده ناشی از آلوده‌سازی با هلیکوباکتر پیلوری را در مان کنند (۳۲). Copelan در سال ۱۹۹۴ اثر محافظتی IgY در مدفوع را با توجه به تجزیه آن در معده و روده نشان داد (۳۳). در سال ۲۰۱۳ Bellingeri فعالیت آنتی‌بادی‌های تخم‌مرغی در مقابله با باکتری ETEC را در خوک بررسی کرد و مشاهده کرد که خوک‌هایی که IgY دریافت کردند از عفونت ETEC محافظت شدند (۳۴). مصرف طولانی مدت و هر روزه زرده تخم‌مرغ حاوی IgY بر ضد باکتری *p.aeruginosa* عوارض جانبی برای بیمار ایجاد نکرده است (۳۵). مطالعات بر روی دو نژاد مرغ Leghorn و Lohmann نشان داده است که مرغ نژاد Leghorn توانایی تولید آنتی‌بادی بیشتری دارد، در این پژوهش نیز از مرغ Leghorn استفاده شده است (۳۶). دو روش متداول برای تخلیص آنتی‌بادی مرغی عبارت‌اند از استفاده از پلی‌اتیلن گلیکول و نمک. در این مطالعه از روش تریقی اسیدی و ترسیب نمکی برای تخلیص و جداسازی IgY از زرده تخم‌مرغ استفاده شده است (۲۰). از آنجا که در الیزا از پروتئین نوترکیب LTB به عنوان آنتی‌ژن و پروتئین تخلیص شده از زرده تخم‌مرغ به عنوان آنتی‌بادی استفاده شده است، اتصال آنتی‌بادی کانژوگه مرغی با پروتئین تخلیص شده از زرده تخم‌مرغ تأیید کننده تخلیص آنتی‌بادی مرغی نیز می‌باشد؛ مضافاً اینکه استفاده از پروتئین تخلیص شده به روش نمکی از زرده تخم‌مرغ در تست لوپ روده‌ای نیز تأیید کننده وجود و تخلیص آنتی‌بادی مرغی علیه پروتئین نوترکیب LTB می‌باشد. IgY‌ها را پس از تخلیص می‌توان لیوفیلیزه کرد و به صورت پودری سفید رنگ درآورد که می‌توان آن‌ها را به شکل قرص یا کپسول مصرف کرد. مطالعات نشان داده که یخ زدن و یا خشک کردن در اثر سرما نمی‌تواند اثری بر آن داشته باشد و IgY‌هایی که بر اثر سرما خشک و پودر شده‌اند در برابر حرارت از خود مقاومت بالایی

سبب برانگیختن پاسخ‌های ایمنی از جمله ایمنی مخاطی شود (۲۶). این نتایج نشان می‌دهد که ایمنی علیه LT می‌تواند در محافظت علیه ETEC نقش مؤثری داشته باشد. سلیمیان و همکاران نیز اقدام به تولید پروتئین LTB به صورت الحاق با CfaB در گیاه نمودند و توانستند این فیوژن را در برگ گیاه تنباکو و دانه کلزا بیان کنند و گروه‌های مختلف موش را با برگ و دانه گیاه تراریخت تغذیه نمایند. نتایج حاصل از بررسی این موش‌ها نشان داد که آنتی‌بادی IgG در سرم موش و IgA در مدفوع موش علیه فیوژن پروتئین CfaB-LTB تولید شده بود. این موش‌ها در چالش با باکتری زنده ماندند (۲۷). در مطالعات سایر محققان بررسی ایمنی زائی پروتئین نوترکیب LTB به عنوان یک ایمونوژن مؤثر برای ایجاد ممانعت از عملکرد توکسین حساس به حرارت باکتری اشریشیاکلی انتروتوکسیژنیک مورد بررسی قرار گرفته است. عمده این تحقیقات متمرکز بر ایجاد ایمنی فعال بوده است. در تحقیق حاضر با توجه به نتایج کاربرد LTB در ایمنی فعال، بر استفاده از آن در جهت ایجاد ایمنی غیرفعال با استفاده از آنتی‌بادی با منشأ پرندگان تأکید شده است که تا کنون در کشور گزارشی در این مورد ارائه نشده است. استفاده از IgY دارای مزایای بسیاری است که از جمله آن‌ها می‌توان به مقرون به صرفه بودن، تخلیص آسان، تولید در مقادیر بالا، غیرتهاجمی بودن روش و عدم فعال نمودن سیستم کمپلمان پستانداران اشاره کرد (۲۸). IgY تولیدی در مرغ به راحتی در خون و تخم‌مرغ قابل شناسایی است. وجود IgY در زرده تخم‌مرغ باعث می‌شود بتوان آن را از طریق خوراکی مصرف کرد. اگرچه این احتمال وجود دارد که IgY پس از ورود به معده توسط آنزیم‌های معده مانند تریپسین، کموتریپسین، پپسین و یا پروتئازها مورد تجزیه قرار گیرد (۱۱)، با این حال مطالعات نشان می‌دهند که مقدار قابل توجهی از این IgY سالم باقی می‌ماند و می‌تواند به آنتی‌ژن متصل شوند (۲۹). مطالعات بسیاری مبنی بر استفاده از IgY جهت پیشگیری و درمان به صورت خوراکی یا تزریقی بر روی خوک، ماهی و گوساله انجام شده است

توکسین حساس به حرارت LT جلوگیری نماید و مانع از عملکرد توکسین LT بر سلول‌های Y1 شود. سلول Y1 پس از مواجهه با توکسین LT به واسطه افزایش cAMP و تغییر در اسکلت سلولی، از حالت پهن، صاف و زائد دار به صورت سلول‌های گرد درآمد، با خنثی سازی توکسین و افزودن آن به سلول‌های Y1 اکثر سلول‌ها شکل خود را حفظ کرده و در حالت طبیعی باقی ماندند. در تست سنجش لوپ روده‌ای خنثی سازی توکسین با رقت ۱/۵ میلی گرم بر میلی لیتر IgY مانع از عملکرد توکسین در روده خرگوش شد، به گونه‌ای که میزان تجمع مایع در لوپ‌های روده خرگوشی که IgY را دریافت کرده بود حدود ۶۵ درصد کمتر از میزان تجمع مایع در لوپ‌هایی بود که IgY دریافت نکرده بودند. به عنوان جمع بندی، نتایج تحقیق نشان می دهد که IgY تولید شده علیه پروتئین نوترکیب LTB می تواند به عنوان ترکیب پیشگیرانه جهت ایجاد ایمنی غیر فعال علیه اسهال ناشی از باکتری ETEC مورد توجه قرار گیرد.

### تشکر و قدردانی

بدین وسیله از شورای محترم پژوهشی دانشگاه شاهد به دلیل حمایت مالی و فراهم آوردن امکانات لازم جهت انجام این پژوهش (۹۶۷۵۸۶۴۰۰) قدردانی می شود. هیچ گونه تعارض منافع توسط نویسندگان وجود ندارد.

را نشان می دهند و تغییری نمی کنند. پایداری IgY پس از تخلیص آن بسته به شرایط می تواند تا چند سال باشد (۳۷). میزان IgY های تخلیص شده در مطالعات و روش های مختلف، متفاوت است. در مطالعاتی که توسط Pauly و همکاران انجام شده، توانستند تا مقدار ۶۰ میلی گرم از هر زرده تخم مرغ جداسازی کنند (۳۸). همچنین در مطالعاتی که در سال ۲۰۱۲ بر روی ویروس آنفولانزای B انجام گرفت، توانستند به کمک پلی اتیلن گلیکول ۷۶/۵ میلی گرم IgY از هر زرده تخم مرغ تخلیص کنند، این در حالی است که در این پژوهش IgY تخلیص شده از هر تخم مرغ ۱۴۴ میلی گرم است که در مقایسه با مطالعات پیشین از بازده بالایی برخوردار است (۳۹). با توجه به مزایای بسیار IgY، به نظر می رسد ایمنی غیر فعال (IgY) در برابر عفونت های ETEC می تواند جایگزین مناسب آنتی بیوتیک و یک روش ایمنوترایی مؤثر باشد. نتایج تست های الایزا در این پژوهش نشان دهنده ی توانایی شناسایی آنتی ژن توسط آنتی بادی است و همچنین آنتی بادی قادر است با اتصال به آنتی ژن از کلونیزاسیون و تکثیر باکتری جلوگیری نماید که با نتایج تست you و همکاران در سال ۲۰۱۴ هم خوانی دارد (۴۰).

### نتیجه گیری

در تحقیق انجام شده IgY اختصاصی علیه پروتئین نوترکیب LTB توانست در رقت ۱۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر از اثرات

### منابع

1. Svennerholm A-M, Tobias J. Vaccines against enterotoxigenic Escherichia coli. *Expert Rev Vaccines*. 2008;7(6):795-804.
2. Huilan S, Zhen LG, Mathan M, Mathew M, Olarte J, Espejo R, et al. Etiology of acute diarrhoea among children in developing countries: a multicentre study in five countries. *Bull. World Health Organ*. 1991;69(5):549.
3. Kosek M, Bern C, Guerrant RL. The global burden of diarrhoeal disease, as estimated from studies published between 1992 and 2000. *Bull. World Health Organ*. 2003;81(6):197-204.
4. Qadri F, Svennerholm A-M, Faruque A, Sack RB. Enterotoxigenic Escherichia coli in developing countries: epidemiology, microbiology, clinical features, treatment, and prevention. *Clin. Microbiol. Rev*. 2005;18(3):83-465.

5. DeBoy J, Wachsmuth I, Davis B. Antibiotic resistance in Enterotoxigenic and non-enterotoxigenic *Escherichia coli*. *J. Clin. microbiol.* 1980;12(2):264-70.
6. Nguyen TV, Van Le P, Le CH, Weintraub A. Antibiotic resistance in diarrheagenic *Escherichia coli* and *Shigella* strains isolated from children in Hanoi, Vietnam. *Antimicrob. Agent Chemother.* 2005;49(2):816-9.
7. Stauffer WM, Konop RJ, Kamat D. Traveling with infants and young children. Part III: travelers' diarrhea. *J. Travel Med.* 2002;9(3):141-50.
8. Nicklasson M. Studies on the expression and regulation of enterotoxins and colonization factors in enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC). *Inst of Biomedicine. Dept of Medical Microbiol. Immunol.* 2008; 28(3):60-71
9. Aarestrup FM. Occurrence, selection and spread of resistance to antimicrobial agents used for growth promotion for food animals in Denmark: Chapter 1: Introduction. *Apmis.* 2000;108(S101):5-6.
10. Chalghoumi R, Beckers Y, Portetelle D, Théwis A. Hen egg yolk antibodies (IgY), production and use for passive immunization against bacterial enteric infections in chicken: a review. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement.* 2009;13(3):295-308.
11. Reilly RM, Domingo R, Sandhu J. Oral delivery of antibodies. *Clin. Pharmacokinet.* 1997;32(4):313-23.
12. Hatta H, Tsuda K, Ozeki M, Kim M, Yamamoto T, Otake S, et al. Passive immunization against dental plaque formation in humans: effect of a mouth rinse containing egg yolk antibodies (IgY) specific to *Streptococcus mutans*. *Caries Res.* 1997;31(4):268-74.
13. Anosova N, Chabot S, Shreedhar V, Borawski J, Dickinson B, Neutra M. Cholera toxin, *E. coli* heat-labile toxin, and non-toxic derivatives induce dendritic cell migration into the follicle-associated epithelium of Peyer's patches. *Mucosal Immunol.* 2008;1(1):59-67.
14. Fingerut E, Gutter B, Meir R, Eliahoo D, Pitcovski J. Vaccine and adjuvant activity of recombinant subunit B of *E. coli* enterotoxin produced in yeast. *Vaccine.* 2005;23(38):4685-96.
15. Rezaee MA, Rezaee A, Moazzeni SM, Salmanian AH, Yasuda Y, Tochikubo K, et al. Expression of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit (LTB) in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Microbiol.* 2005;43(4):354-60.
16. Kordbacheh E, Nazarian S, Sadeghi D, Hajizadeh A. An LTB-entrapped protein in PLGA nanoparticles preserves against enterotoxin of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Iranian J. Basic Med sci.* 2018;21(5):517.
17. Kordbacheh E, Nazarian S, Hajizadeh A, Sadeghi D. Entrapment of LTB protein in alginate nanoparticles protects against Enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Apmis.* 2018;126(4):320-8.
18. Hopkins R, Esposito D, Gillette W. Widening the bottleneck: increasing success in protein expression and purification. *J Struct Biol.* 2010;172(1):14-20.
19. Smith BJ. Chemical Cleavage of Proteins at Cysteinyl-X Peptide Bonds. *Protein Prot. Handb.* 2002 (pp. 503-506).
20. Hodek P, Trefil P, Simunek J, Hudecek J, Stiborova M. Optimized protocol of chicken antibody (IgY) purification providing electrophoretically homogenous preparations. *Int J Electrochem Sci.* 2013 Jan 1;8:113-24.
21. Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Struhl K. *Current Protocols in Molecular Biology.* John Wiley & Sons, 1988; p2.4:1-2
22. Nazarian S, Gargari SL, Rasooli I, Alerasol M, Bagheri S, Alipoor SD. Prevalent phenotypic and genotypic profile of enterotoxigenic *Escherichia coli* among Iranian children. *Jpn J Infect Dis.* 2014;67(2):78-85.

23. De SN, Chatterje DN. An experimental study of the mechanism of action of *Vibrio cholerae* on the intestinal mucous membrane. *Bull. World Health Organ.* 2010 Mar 1;88(3):239-41.
24. Khalesi R NS, Amani J, Ehsani Z, Mansori M, Moazeni SM, et al. Cloning ,expression and purification of *Escherichia coli* heat-labile B subunit as a component of vaccine candidate. *Iran chem soci.* 2009;15(8):1765-1774
25. Khalesi R, Nazarian S, Ehsaei Z, Mansouri M, Amani J, Salimian J, et al. Optimization of gene expression and purification of enterotoxigenic *Escherichia coli* recombinant (2010): 141-147  
LTB protein and antibody production against it. *Kowsar Medical Journal.* 2010;15(3):141-7.۲۷.
26. Anosova N, Chabot S, Shreedhar V, Borawski J, Dickinson B, Neutra M. Cholera toxin, *E. coli* heat-labile toxin, and non-toxic derivatives induce dendritic cell migration into the follicle-associated epithelium of Peyer's patches. *Mucosal immunol.* 2008;1(1):59-67.
27. Moravec T, Schmidt MA, Herman EM, Woodford-Thomas T. Production of *Escherichia coli* heat labile toxin (LT) B subunit in soybean seed and analysis of its immunogenicity as an oral vaccine. *Vaccine.* 2007 Feb 19;25(9):1647-57.
28. Saadati M, Salimyan J, Ebrahimi F, Bahmani M, Gandomi A. Evaluation of antibody Y (IgY) raised against botulinum neurotoxin type A in an animal model. *J Med Sci.* 2003;108(2):129-40.
29. Akita E, Li-Chan E, Nakai S .Neutralization of enterotoxigenic *Escherichia coli* heat-labile toxin by chicken egg yolk immunoglobulin Y and its antigen-binding fragments. *Food agric immunol.* 1998;10(2):161-72.
30. Arasteh N, Aminirissehei A-H, Yousif A, Albright L, Durance T. Passive immunization of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with chicken egg yolk immunoglobulins (IgY). *Aquaculture.* 2004;231(1-4):23-36.
31. Shin J-H, Nam S-W, Kim J-T, Yoon J-B, Bang W-G, Roe I-H. Identification of immunodominant *Helicobacter pylori* proteins with reactivity to *H. pylori*-specific egg-yolk immunoglobulin. *J. Med microbiol.* 2003;52(3):217-22.
32. Malekshahi ZV, Gargari SLM, Rasooli I, Ebrahimizadeh W. Treatment of *Helicobacter pylori* infection in mice with oral administration of egg yolk-driven anti-UreC immunoglobulin. *Microb Pathog.* 2011;51(5):366-72.
33. Copelan E, Bechtel T, Klein J, Klein J, Tutschka P, Kapoor N, et al. Controlled trial of orally administered immunoglobulin following bone marrow transplantation. *Bone marrow transplant.* 1994;13(1):87-91.
34. Bellingeri RV, Busso L, Alustiza FE, Picco NY, Molinero DP, Grosso MC, et al. Characterization of egg yolk immunoglobulin (IgY) against enterotoxigenic *Escherichia coli* and evaluation of its effects on bovine intestinal cells. 2013.
35. Larsson A, Carlander D. Oral immunotherapy with yolk antibodies to prevent infections in humans and animals. *Ups. J. Med. Sci.* 2003;108(2):129-40.
36. Liou J, Shiau J, Tai C, Chen L. Production of egg yolk immunoglobulin against *Escherichia coli* from white Leghorn and Lohmann chickens. *J Anim Vet Adv.* 2011;10(18):2349-56.
37. Kovacs-Nolan J, Mine Y. Egg yolk antibodies for passive immunity. *Annu Rev food Sci Technol.* 2012;10(3):163-82.
38. Pauly D, Chacana PA, Calzado EG, Brembs B, Schade R. IgY technology: extraction of chicken antibodies from egg yolk by polyethylene glycol (PEG) precipitation. *JoVE (Journal of Visualized Experiments).* 2011(51): 30-84.
39. Wen J, Zhao S, He D, Yang Y, Li Y, Zhu S. Preparation and characterization of egg yolk immunoglobulin Y specific to influenza B virus. *Antiviral res.* 2012;93(1):154-9.

40. You J, Xu Y, Li H, Wang L, Wu F, Xu F, et al. Chicken egg yolk immunoglobulin (I g Y) developed against fusion protein LTB–ST a–ST b neutralizes the toxicity of E scherichia coli heat-stable enterotoxins. J applied microbiol. 2014;117(2):320-8.