ارزیابی واکسن تهیه‌شده از باکتری کشته‌شده *Vibrio fluvialis* در مرغ تخم‌گذار نژاد هایلاین W36

مجتبی میرزائی*[۱]، محسن نجیمی[۲]، محمد جهانتیغ[۳]، فیروز ابراهیمی[۴]، عباس جمشیدیان[۵]، نرجس حسن فخرآبادی[۶]

۱-دانش آموخته دکتری دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه زابل، زابل
۲-گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه زابل، زابل
۳-گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه زابل، زابل
۴-مرکز تحقیقات زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه امام حسین(ع)، تهران
۵-گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه زابل، زابل
۶-دانشجوی دکتری دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه زابل، زابل

دریافت مقاله: ۱۸ دی ۱۳۹۶، بازنگری:۱۰ بهمن ۱۳۹۶، پذیرش نهایی: ۲۰ اسفند ۱۳۹۶

چکیده

باکتری Vibrio fluvialis موجب بیماری در ماهیان پرورشی و ضررهای اقتصادی قابل توجه می‌شود. این باکتری پاتوژن انسانی و چندین نوع از ماهیان پرورشی دریایی می‌باشد. استفاده از تکنولوژی ایمونوگلوبولین زرده تخم‌مرغ (IgY) تا کنون برای کنترل عفونت‌های میکروبی فراوانی مورد استفاده قرار گرفته است. هدف از مطالعه حاضر بررسی و ارزیابی واکسن تهیه شده از باکتری V. fluvialis پس از تزریق به مرغ تخم‌گذار می‌باشد. باکتری V. fluvialis پس از کشت در محیط مایع، با فرمالئین ۰/۰۵ درصد مجاور شد. سپس سلول باکتری به همراه اجوانت فروند به عنوان واکسن به مرغ‌های تخم‌گذار نژاد هایلاین در ۷ نوبت تزریق شد، افزایش وزن مرغ‌ها تا بلوغ جسمی و تولید تخم‌مرغ مورد ارزیابی قرار گرفت، سپس آزمایش الایزا غیر مستقیم برای شناسایی IgG ضد باکتری V. fluvialis طراحی و اجرا شد. تزریق واکسن تهیه شده در افزایش وزن مرغ‌ها در طول آزمایش و تعداد و وزن تخم‌مرغ‌ها معنی‌دار نبود و آزمایش الایزا نشان داد تیتر آنتی‌بادی در سرم مرغ‌های هایپر ایمن شده پس از تزریق چهارمین بوستر به ۱:۱۲۸۰۰ رسیده است. با توجه به نتایج به دست آمده و نتایج مطالعات سایر محققین به نظر می‌رسد، آنتی‌بادی زرده تخم‌مرغ (IgY) که همان IgG منتقل شده به زرده است، توانایی مهار بیماری‌زایی این باکتری را در حیوان آزمایشگاهی و مزرعه دارد.

واژگان کلیدی: *اجوانت فروند، مرغ تخم‌گذار، Vibrio fluvialis*

* پست الکترونیک نویسنده مسئول مکاتبه: moj.mirzaei@uoz.ac.ir

مقدمه

باکتری‌های جنس *ویبریو* ساکنین اکوسیستم‌های آبی دریایی، خلیج‌ها و آب‌های محل پرورش میگو و ماهی هستند، باکتری‌های گرم منفی و خمیده *ویبریو* اکثراً پاتوژن‌های فرصت‌طلب ماهی، خزندگان و پستاندارانند (۱). *ویبریو فلاویالیس* (*V. Fluvialis*) یک باکتری گرم منفی نسبتاً هالوفیل می‌باشد. مورفولوژی این باکتری به شکل میله‌ای صاف تا کمی خمیده است، توانایی حرکت این باکتری از طریق تاژک‌های قطبی آن می‌باشد.

V. fluvialis نیاز به سدیم کلراید دارد، اکسیداز مثبت و نیترات مثبت است که می‌تواند دی-گلوکز و دیگر کربوهیدرات‌ها را تخمیر کند و اسید و گاز تولید کند. این باکتری از آب، مدفوع حیوانات، مدفوع انسان، فاضلاب و محصولات غذایی دریایی جدا شده است. این باکتری در همه بخش‌های سواحل آبی وجود دارد و موجب بیماری در ماهیان پرورشی و ضررهای اقتصادی قابل توجه می‌شود (۲).

آنتی‌بادی Immunoglobulin of Yolk (IgY) در واقع (IgG) منتفل شده از سرم مرغ به زرده تخم‌مرغ می‌باشد (۳). استفاده از زیست فناوری ایمونوگلوبولین زرده تخم‌مرغ (IgY) با اهداف کاربرد درمانی و تشخیصی در حال پیشرفت است (۴). استفاده از ایمونوگلوبولین‌ها علیه عفونت‌ها اولین بار به وسیله‌ی Bartz و همکاران مطرح شد و تا کنون برای کنترل عفونت‌های میکروبی فراوانی مورد استفاده قرار گرفته است (۵). نتایج مطالعات مختلف ثابت کرده است که ایمونوگلوبولین IgY اثر مهاری بر رشد بسیاری از باکتری‌ها دارد و به طور کلی روز به روز تمایل به استفاده از زرده تخم‌مرغ جهت تولید آنتی‌بادی پلی‌کلونال برای اهداف کاربردی و اقتصادی افزایش می‌یابد (۶).

مزیت‌های استفاده از مرغ به عنوان میزبان ایمن‌سازی شامل: حجم بالای آنتی‌بادی در یک زرده تخم‌مرغ، نیاز کم به آنتی‌ژن برای ایمن‌سازی، سادگی و هزینه کم برای تخلیص آنتی‌بادی، رعایت حقوق حیوانات (نیازی به خونگیری از مرغ نیست)، طول عمر مرغ نسبت به حیوانات آزمایشگاهی، عدم فعال شدن سیستم کمپلمان پستانداران و عدم تداخل با فاکتور رماتوئید توسط IgY، پایداری نسبی در شرایط اسیدی، بازی و دمایی می‌باشد (۱۴-۷).

آنتی‌بادی‌های زرده تخم‌مرغ تا کنون به طور موفقیت‌آمیزی جهت اهداف علمی (۱۳) تشخیصی (۱۵) پیشگیرانه (۱۶) و درمانی (۱۷) و همچنین در دامپزشکی در مقابله با باکتری‌های بیماری‌زای متنوعی استفاده شده است.

این تحقیق مقدمه‌ای برای تولید آنتی‌بادی IgY اختصاصی ضد باکتری *V. Fluvialis* از زرده تخم‌مرغ‌های هایپر ایمن شده می‌باشد. در این تحقیق غیر فعال شدن باکتری در واکسن تهیه شده بررسی گردید و نیز تأثیر تزریق واکسن بر میزان تولید مرغ تخم‌گذار مورد بررسی قرار گرفت. همچنین اثر واکسن تهیه شده بر تیتر آنتی‌بادی سرمی مرغ نیز تعیین گردید.

مواد و روش‌ها

کشت باکتری: سویه استاندارد باکتری *V. fluvialis* از مرکز ملی ذخایر زیستی و ژنتیکی ایران (IBRC) با کد IBRC-M 10800 تهیه شد، سپس محیط کشت Blood Agar و محیط کشت Brain heart infusion broth طبق دستور شرکت سازنده ساخته شد و در اتوکلاو قرار گرفت و سایر تجهیزات و لوازم مورد نیاز از قبیل سوآپ، لوله‌های آزمایشگاهی، فالکون ۱۵میلی‌لیتری، سرسمپلر و سایر تجهیزات مورد نیاز با استفاده از اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه

استریل شدند. سپس پلیت حاوی کشت فعال باکتری در زیر هود لامینار باز شد و بر روی محیط جامد Blood Agar تجدید پاساژ یافت. پلیت در انکوباتور با دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شد. پس از اطمینان از عدم آلودگی، باکتری در محیط مایع BHI در انکوباتور شیکردار با دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شد. سپس با ۲۰ درصد گلیسرول مخلوط شد و در فریزر با دمای ۷۳- درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و در مراحل بعد از آن به عنوان ذخیره باکتری استفاده شد.

تهیه آنتی‌ژن: پس از خارج کردن باکتری *V. Fluvialis* از فریزر، در محیط جامد آگار خون‌دار کشت داده شده و سپس در محیط مایع BHI در فالکون ۱۵ میلی‌لیتری کشت داده شد. سپس فالکون‌ها در سانتریفیوژ با دور ۳۲۰۰ دور در دقیقه (rpm) به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد، در این مرحله در شرایط استریل هود لامینار، محلول رویی دور ریخته شد و رسوب باکتری با ۱۵ میلی‌لیتر بافر فسفات سالین (PBS) به خوبی همگن شد و سپس در سانتریفیوژ قرار گرفت و مجدد محلول رویی دور ریخته شد و رسوب باکتری با ۱۵ میلی‌لیتر PBS همگن شد و مجدد در سانتریفیوژ قرار گرفت این کار ۳ مرتبه تکرار شد تا مطمئن شویم محیط کشت به خوبی از سلول‌های باکتری جدا شده است. سپس رسوب با ۱۰میلی‌لیتر فرمالئین ۰/۰۵ درصد همگن شده (فرمالئین ۰/۰۵ درصد از فرمالئین غلیظ ۳۷ درصد تهیه شد) و در طول شب در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، در انکوباتور شیکردار با دور ۶۰ دور در دقیقه (rpm) قرار گرفت. روز بعد فالکون‌ها در سانتریوفوژ با سرعت ۳۲۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریوفوژ شدند، سپس مایع رویی دور ریخته شد و رسوب سلول لیز شده باکتری‌ها مجدداً با ۱۰ میلی‌لیتر PBS همگن شد و این کار ۳ بار انجام شد تا مطمئن شویم فرمالدئین از سلول لیز شده باکتری‌ها به خوبی جدا شده است.

این رسوب با ۱۰ میلی‌لیتر PBS به خوبی همگن شد و سپس به غلظت معادل 1.5×10^8 CFU/ml رسانده شد. بدین صورت که جذب نوری حاصل از آن در طول موج ۶۰۰ نانومتر بر روی ۱ تنظیم شد. این محلول در دمای۷۳- سانتی‌گراد ذخیره شد و تا انتهای تحقیق به عنوان مخزن سلول لیز شده باکتری استفاده شد (۱۸).

آماده سازی واکسن: برای آماده سازی واکسن ۱ میلی‌لیتر از محلول ذخیره سلول لیز شده باکتری در تیوپ دو میلی‌لیتری ریخته شد، که این محلول حدوداً معادل 10^8 CFU/ml غلظت داشت. سپس تیوپ‌ها در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت 10000 rpm سانتریفیوژ شده و سپس ۵۰۰ میکرولیتر از محلول رویی برداشته شد و ۵۰۰ میکرولیتر اجوانت فروند به آن اضافه شد. (در تزریق اول از اجوانت کامل فروند (مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، کرج، ایران) استفاده شد و در تزریق‌های بعدی از اجوانت ناقص فروند استفاده شد). این ترکیب به عنوان واکسن مورد استفاده قرار گرفت.

تهیه و پرورش مرغ تخم‌گذار: تعداد ۸ عدد مرغ تخم‌گذار هایلاین W36 سال ۲۰۱۵ با سن ۸۳ روزگی که آخرین واکسن دوره پولتی را دریافت کرده بودند، (از کشت و صنعت بیدمشک، بیرجند، ایران) به محل نگهداری مرغ تخم‌گذار در دانشکده دامپزشکی انتقال یافت و به‌صورت تصادفی در ۲ گروه مساوی گروه‌بندی شد. دمای اتاق پرورش، رطوبت، طول روشنایی، ترکیبات جیره و سایر نکات پرورشی طبق دفترچه راهنمای پرورش مرغ هایلاین W36 سال ۲۰۱۵ کنترل شد. میزان نور تا بلوغ جسمی مرغ که تقریبا در سن ۱۸ هفتگی بود به‌صورت ۱۲ ساعت روشنایی (با شدت نور تقریباً ۵

تا ۱۵ لوکس) و ۱۲ ساعت تاریکی بود که در نیمه شب ۱ ساعت نور شبانه جهت افزایش مصرف دان در نظر گرفته شد، پس از بلوغ جسمی تحریک نوری انجام شد (۲۵ لوکس، و هفته ای ۳۰ دقیقه به طول روشنایی افزوده شد) تا میزان روشنایی به ۱۶ ساعت رسید و تا پایان دوره به همین صورت ادامه یافت.

قرنطینه محل نگهداری مرغ‌ها: جهت ضد عفونی هوای ورودی سالن از فیلتر لامپ اولترا ویولت (UVC) ۳۰ وات (فیلیپس لهستان) استفاده شد. جهت جلوگیری از ورود آلودگی از طریق درب سالن به ترتیب از فشار منفی و مثبت در اتاق ورودی و محل نگهداری مرغ‌ها استفاده شد. بدین طریق ورود هوا فقط از طریق تهویه‌ها صورت می‌گرفت. برای تهویه از دو عدد فن VPH-15S2S با قدرت تهویه (m^3/h۲۰۰) (شرکت دمنده، ایران) استفاده شد. ورود به داخل اتاق پرورش مرغ‌ها با تعویض لباس‌ها و کفش‌ها و ضدعفونی دست‌ها بود.

جیره: برای هر مرغ متناسب با نیاز روزانه‌اش که در ۱۲ هفتگی در حدود ۵۵ گرم و در ۳۲ هفتگی در حدود ۹۰ گرم بود در دانخوری ریخته شد. فرمول جیره مرغ‌ها در دوره پرورش برای ۱۰۰ کیلوگرم در جدول ۱ آمده است.

جدول ۱- میزان مواد اولیه استفاده شده در جیره برای ۱۰۰ کیلو گرم

ذرت	۶۸ کیلو گرم	دی کلسیم فسفات	۱۱۵۰ گرم
سبوس	۳۲۰۰ گرم	کربنات کلسیم	۱۰۰۰ گرم
سویا	۲۰/۵ کیلوگرم	مکمل	۳۷۵۰ گرم
پودر گوشت دامی	۳۰۰۰ گرم	نمک	۳۲۰ گرم
متیونین	۱۰۰ گرم	روغن سویا	گرم

برنامه ایمن سازی و خونگیری از مرغ‌ها: در روز صفر اولین خونگیری انجام شد سپس در همان روز اولین واکسن تزریق شد پس از آن در هفته اول خونگیری دوم انجام شد و در هفته دوم واکسن دوم (بوستر اول) تزریق شد و تا هفته ۱۳ این عملیات طبق جدول ۲ ادامه یافت. تزریق واکسن با حجم ۵۰۰ میکرولیتر با استفاده از سرنگ انسولین در سینه سمت راست و سمت چپ مرغ انجام شد و در هر سمت نیمی از حجم واکسن در داخل عضله (IM) و نیمی دیگر در زیر پوست (SC) تزریق شد. به گروه مواجهه آنتی‌ژن همراه با اجوانت فروند تزریق شد و به گروه کنترل PBS همراه با اجوانت فروند تزریق شد. تزریقات با فاصله دو هفته تکرار شد در نوبت اول آنتی‌ژن به همراه اجوانت کامل فروند و در نوبت‌های بعدی (بوستر) تزریق آنتی‌ژن به همراه اجوانت ناقص فروند انجام شد.

جدول ۲- تزریقات و خونگیری (B نشان دهنده خونگیری است و عدد مجاور آن شماره خونگیری می‌باشد، V نشان دهنده تزریق واکسن است و عدد مجاور آن نشان دهنده شماره تزریق واکسن می‌باشد)

	روزصفر	هفته۱	هفته۲	هفته۳	هفته۴	هفته۵	هفته۶	هفته۷	هفته۸	هفته۹	هفته۱۰	هفته۱۱	هفته۱۲	هفته۱۳
خونگیری	B0		B1		B2		B3		B4		B5		B6	B7
واکسن	V1		V2		V3		V4		V5		V6		V7	

الایزا غیر مستقیم: در این مرحله جهت بررسی حضور آنتی‌بادی اختصاصی ضد باکتری *ویبریو فلاویالیس* میزان تیتر آنتی‌بادی در سرم ۲ مرغ از ۴ مرغ هر گروه توسط روش الایزا غیر مستقیم، مورد بررسی قرار گرفت.

جهت تثبیت آنتی‌ژن در کف چاهک‌های پلیت

الایزا (100 SPL, Korea) میکرولیتر بافر کربنات بی کربنات (pH=9.8) که 10^7 CFU/ml سلول لیز شده باکتری داشت، ریخته شد و پلیت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در طول شب انکوبه گردید. به منظور کنترل اجزاء واکنش یک چاهک فقط حاوی بافر کوت‌کننده در نظر گرفته شد. شستشوی چاهک‌ها ۳ مرتبه با بافر PBS (PBST حاوی ۰/۵٪ توئین ۲۰) انجام شد. جهت بلاک کردن از ۱۵۰ میکرولیتر شیرخشک ۵ درصد در بافر PBST (حجمی/ وزنی) در هر چاهک استفاده شد و در طول شب در ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس شستشوی چاهک‌ها ۴ مرتبه با بافر PBST انجام شد و رقت‌سازی سرم‌ها از ۱:۱۰۰ تا ۱:۱۲۸۰۰ انجام شد و سپس میکروپلیت در انکوباتور شیکردار در دمای ۳۷ درجه به مدت ۲ ساعت انکوبه شد، برای کنترل منفی یک چاهک با NaCl ۹درصد بلاک شد. چاهک‌ها مجددا ۴ مرتبه با بافر PBST شسته شده و ۱۰۰ میکرولیتر از anti-chicken IgG conjugated HRP (Sigma, USA, 1:2000) در هر چاهک اضافه شد و پلیت به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. مجدداً چاهک‌ها ۵ مرتبه شستشو داده شد. سپس ۳ میلی‌گرم سوبسترا OPD (Sigma,USA) در ۵ میلی‌لیتر بافر سیترات فسفات حل شده و ۳ میکرولیتر آب اکسیژنه (H_2O_2) اضافه شد و ۱۰۰ میکرولیتر از محلول حاضر به هر چاهک اضافه شد و پلیت در محل تاریکی قرار گرفت تا واکنش انجام شد. سپس ۵۰ میکرولیتر اسید سولفوریک ۲/۵ مولار جهت توقف واکنش به هر چاهک اضافه شد. برای قرائت جذب نوری از دستگاه الایزا ریدر(Hiperion MPR4+, Readermark, Germany) در طول موج ۴۹۲ نانومتر استفاده شد. زمانی که OD سرم مرغ‌های گروه مواجهه تقسیم بر OD سرم مرغ‌های گروه کنترل، بزرگتر یا مساوی ۲,۱ شد ($OD_{sample/control} \geq 2.1$) آن چاهک به عنوان تیتر آن سرم انتخاب شد (۱۸).

تجزیه و تحلیل آماری داده‌های حاصل از این تحقیق با استفاده از نرم افزار SPSS Statistics 19 انجام شد. از آزمون Independent sample T test برای بررسی معنی‌دار بودن نتایج به‌دست آمده استفاده شد، تفاوت‌های که سطح P value < 0.05 بود معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج

نتایج کشت باکتری غیر فعال شده توسط فرمالدئید بر روی محیط کشت Blood Agar که با ۳ تکرار انجام شد، نشان داد هیچ کلونی پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون بر روی محیط کشت ایجاد نشد، که نشان دهنده غیر فعال شدن باکتری در شرایط ایجاد شده بود. همچنین نتایج تزریق واکسن به ۴ مرغ در گروه مواجهه و ۴ مرغ در گروه کنترل و بررسی سلامت مرغ‌ها در طول دوره پرورش در جدول ۳ آورده شده است. با توجه به اینکه P value برای هیچ کدام از فاکتورهای در نظر گرفته شده، کوچکتر از ۰/۰۵ به‌دست نیامد، لذا تفاوت آماری معنی‌داری در میزان رشد مرغ‌ها و همچنین تعداد تولید تخم‌مرغ و وزن تخم‌مرغ‌ها و وزن کل تخم‌مرغ‌ها حاصل نشد.

یافته‌های آزمایش الایزا بر روی سرم مرغ‌ها در جدول ۴ آمده است. در روز ۱۴ $OD_{s/n}$ برابر با ۲/۸ بود که بزرگتر از ۲/۱ می‌باشد لذا ۱:۱۰۰ به عنوان تیتر در نظر گرفته می‌شود، همچنین در روز ۲۸ و ۴۲ و ۵۶ و ۷۲ این عدد به ترتیب در رقت‌های ۱:۱۶۰۰ و ۱:۳۲۰۰ و ۱:۱۲۸۰۰ و ۱:۱۲۸۰۰ بزرگتر یا مساوی ۲/۱ می‌باشد که این رقت‌ها به عنوان تیتر در نظر گرفته می‌شوند. همان‌طور که در نمودار ۱ مشخص است تیتر سرمی پس از تزریق بوستر ۳ به شدت افزایش پیدا کرده است، همچنین، بعد از روز ۵۶ تیتر سرمی بر روی ۱۲۸۰۰ باقی مانده است، که

نشـان می‌دهـد حـداکثر تیتـر سـرمی قابـل انتظـار بـرای این باکتری (آنتی‌ژن) می‌باشد.

جدول ۳- فاکتورهای بررسی شده در مرغ‌ها (نتایج به صورت Mean±SD نشان داده شده است)

	گروه مواجهه	گروه کنترل	آزمون آماری	P value
افزایش وزن	۲۱/۵۴±۱۵۴	۳۵/۵۵±۱۵۶	Independent samples t test	۰/۷۰۸
تعداد تخم‌مرغ تولید شده	۰/۹۸±۲۰	۰/۶۳±۲۰/۴	Independent samples t test	۰/۴۶۸
وزن تخم‌مرغ	۱۶/۵±۴۶/۶	۱۵/۶±۴۶/۹	Independent samples t test	۰/۸۷۷
وزن کل تخم‌مرغ‌ها	۷۱/۶۱±۹۷۸/۶	۵۲/۳۶±۹۸۳/۹	Independent samples t test	۰/۸۷۷

جدول ۴- نسبت میانگین OD در گروه مواجهه به میانگین OD در گروه کنترل (OD Sample/OD Control)

	زمان						
رقت	روز ۰	روز ۱۴	روز ۲۸	روز ۴۲	روز ۵۶	روز ۷۰
۱:۱۰۰	۱/۲	۲/۸	۳/۶	۳/۸	۴/۰	۴/۵
۱:۲۰۰	۱/۱	۲/۰	۳/۴	۳/۵	۳/۷	۴/۳
۱:۴۰۰	۱/۰	۱/۹	۲/۹	۳/۳	۳/۴	۴/۱
۱:۸۰۰	۰/۹	۱/۸	۲/۴	۲/۹	۳/۲	۳/۸
۱:۱۶۰۰	۰/۹	۱/۳	۲/۱	۲/۳	۲/۹	۳/۵
۱:۳۲۰۰	۰/۸	۰/۷	۱/۸	۲/۱	۲/۴	۳/۳
۱:۶۴۰۰	۰/۷	۰/۶	۱/۶	۱/۹	۲/۲	۲/۵
۱:۱۲۸۰۰	۰/۶	۰/۵	۱/۲	۱/۸	۲/۱	۲/۱

نمودار ۱- نمودار افزایش تیتر سرمی طی تزریق واکسن تهیه شده در طول ۱۴ هفته

بحث و نتیجه‌گیری

V. fluvialis باکتری بیماری‌زایی است که علائم روده ای مشابه با *V. cholera* ایجاد می‌کند، درگیری انسان با این باکتری منجر به اسهال آبکی به همراه استفراغ، دل‌درد، دهیدراته شدن متوسط تا شدید و اغلب تب است (۱۹).

طبق نتایج به‌دست آمده از این مطالعه، واکسن تهیه شده از سلول لیز شده باکتری *V. fluvialis* به همراه اجوانت فروند تأثیر معنی‌داری در افزایش وزن مرغ تخم‌گذار از بلوغ جنسی تا رسیدن به بلوغ جسمی، تعداد تولید تخم‌مرغ و وزن تخم‌مرغ‌ها نداشت. لذا به نظر می‌رسد استفاده از این روش برای ایمن‌سازی مرغ تخم‌گذار به منظور تولید و تخلیص آنتی‌بادی IgY از زرده تخم‌مرغ روش مفید و

مناسبی باشد.

مطالعه‌ای که توسط Zhu و همکاران انجام شد، نشان داد که *ویبریو انگیلاروم* به‌طور مؤثری سیستم ایمنی مرغ‌های تخم‌گذار را بر انگیخته کرده و آنتی‌بادی IgY اختصاصی ضد *ویبریو انگیلاروم* توسط الایزا شناسایی شد (۲۰). در مطالعه حاضر نتایج آزمایش الایزا طراحی شده نشان داد که تیتر سرمی مرغ‌ها علیه باکتری *V. fluvialis* که به عنوان آنتی‌ژن مورد استفاده قرار گرفته بود از تزریق سومین بوستر به بعد به بالاترین سطح خود رسید و با ادامه واکسیناسیون به فاصله ۲ هفته تیتر همچنان بالا بود که نشان دهنده‌ی هایپر ایمونیزاسیون موفق می‌باشد و تأیید کننده نتایج تحقیق Zhu و همکاران می‌باشد.

طبق تحقیقات Hirai و همکاران استفاده از ایمونوگلوبولین اختصاصی زرده تخم‌مرغ(IgY) علیه *ویبریو کلرا* به‌صورت مؤثری منجر به جلوگیری از بروز وبا در موش‌ها شد (۲۱). تحقیقات Chang-Hong Li و همکاران نشان داد تولید آنتی‌بادی اختصاصی IgY علیه *ویبریو* انگیلاروم (*V.anguillarum*) با موفقیت صورت گرفت و به‌طور مؤثر از عفونت‌های *ویبریو* انگیلاروم پیشگیری کرد (۲۲). در مطالعات Punyokun و همکاران آنتی‌بادیIgY اختصاصی علیه *ویبریو هاروی* به‌طور موفقیت‌آمیزی تولید و تخلیص شد (۲۳).

با توجه به نتایج بدست آمده از این تحقیق تیتر آنتی‌بادی اختصاصی ضد باکتری *V. fluvialis* در سرم مرغ‌های هایپرایمن شده به شدت افزایش پیدا کرد، لذا به نظر می‌رسد این آنتی‌بادی اختصاصی به زرده تخم‌مرغ هم منتقل خواهد شد و با توجه به تحقیقات سایر محققین در ارتباط با ممانعت از بیماری‌زایی باکتری‌های جنس *ویبریو* به نظر می‌رسد، تولید و تخلیص آنتی‌بادی IgY از زرده تخم‌مرغ‌های هایپر ایمن شده و استفاده از آن در چالش میکروبی حیوان آزمایشگاهی، می‌تواند منجر به کاهش بیماری‌زایی *V. fluvialis* شود، بنابراین نیاز به تحقیق بیشتر در این زمینه می‌باشد و ادامه انجام مراحل این تحقیق در برنامه کاری محققین است.

سپاسگزاری

این مقاله حاصل بخشی از پایان‌نامه دوره دکتری حرفه ای دامپزشکی می‌باشد که شماره پیگیری پروپوزال پایان نامه در ایرانداک ۱۳۶۰۵۳۵ می‌باشد. نویسندگان برخود لازم می‌دانند که از همکاری کارشناسان دانشکده دامپزشکی دانشگاه زابل از جمله آقای سعید شهریاری و خانم سرگلزایی تشکر نمایند.

References

1- Basti AA, Misaghi A, Salehi TZ, Kamkar A. Bacterial pathogens in fresh, smoked and salted Iranian fish. Food Control. 2006;17(3):183–8.

2- Igbinosa EO, Okoh AI. Vibrio fluvialis: an unusual enteric pathogen of increasing public health concern. Int J Environ Res Public Health. 2010;7(10):3628–43.

3- Tizard IR. An introduction to veterinary immunology. WB Saunders.; 1977.

4- Shin JH, Nam SW, Kim JT, Yoon JB, Bang WG, Roe IH. Identification of immunodominant Helicobacter pylori proteins with reactivity to H. pylori-specific egg-yolk immunoglobulin. J Med Microbiol. 2003;52(3):217–22.

5- Bartz CR, Conklin RH, Tunstall CB, Steele JH. Prevention of murine rotavirus infection with chicken egg yolk immunoglobulins. J Infect Dis. 1980;142(3):439–41.

6- Tini M, Jewell UR, Camenisch G, Chilov D, Gassmann M. Generation and application of chicken egg-yolk antibodies. Comp Biochem Physiol part A Mol Integr Physiol. 2002;131(3):569–74.

7- Schade R, Staak C, Hendriksen C, Erhard M, Hugl H, Koch G, *et al.* The production of avian (egg yolk) antibodies: IgY. Altern Lab Anim. 1996;24:925–34.

8- Bizhanov G, Vyshniauskis GA. comparison of three methods for extracting IgY from the egg

yolk of hens immunized with Sendai virus. Vet Res Commun. 2000;24(2):103–13.

9- Jensenius JC, Andersen I, Hau J, Crone M, Koch C. Eggs: conveniently packaged antibodies. Methods for purification of yolk IgG. J Immunol Methods. Elsevier; 1981;46(1):63–8.

10- Polson A, Von Wechmar MB, Van Regenmortel MHV. Isolation of viral IgY antibodies from yolks of immunized hens. Immunol Commun. 1980;9(5):475–93.

11- Larsson A, Balöw RM, Lindahl TL, Forsberg PO. Chicken antibodies: taking advantage of evolution—a review. Poult Sci. 1993;72(10):1807–12.

12- Gassmann M, Thömmes P, Weiser T, Hübscher U. Efficient production of chicken egg yolk antibodies against a conserved mammalian protein. FASEB J. 1990;4(8):2528–32.

13- Schade R, Hlinak A, Marburger A, Henklein P, Morgenstern R, Blankenstein P, *et al.* Advantages of using egg yolk antibodies in the life sciences: the results of five studies. Altern Lab Anim. 1997;25(5):555–86.

14- Sunwoo HH, Lee EN, Menninen K, Suresh MR, Sim JS. Growth inhibitory effect of chicken egg yolk antibody (IgY) on Escherichia coli O157: H7. J FOOD Sci. 2002;67(4):1486–94.

15- Di Lonardo A, Marcante ML, Poggiali F, Hamsøikova E, Venuti A. Egg yolk antibodies against the E7 oncogenic protein of human papillomavirus type 16. Arch Virol. 2001;146(1):117–25.

16- Sarker SA, Casswall TH, Juneja LR, Hoq E, Hossain I, Fuchs GJ, *et al.* Randomized, placebo-controlled, clinical trial of hyperimmunized chicken egg yolk immunoglobulin in children with rotavirus diarrhea. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2001;32(1):19–25.

17- Lemamy G, Roger P, Mani J, Robert M, Rochefort H, Brouillet J. High-affinity antibodies from hen's-egg yolks against human mannose-6-phosphate/insulin-like growth-factor-II receptor (M6P/IGFII-R): Characterization and potential use in clinical cancer studies. Int J cancer. 1999;80(6):896–902.

18- Li X, Jing K, Wang X, Li Y, Zhang M, Li Z, *et al.* Protective effects of chicken egg yolk antibody (IgY) against experimental Vibrio splendidus infection in the sea cucumber (Apostichopus japonicus). Fish Shellfish Immunol. 2016;48:105–11.

19- Huq MI, Alam AK, Brenner DJ, Morris GK. Isolation of Vibrio-like group, EF-6, from patients with diarrhea. J Clin Microbiol. 1980;11(6):621–4.

20- Zhu X, Zhang Z, Liu Z. Preparation of shrimp Vibrio anguillarum IgY and its effect on protecting from artificial infection. Mar Sci. 2008;2:6.

21- Hirai K, Arimitsu H, Umeda K, Yokota K, Shen L, Ayada K, *et al.* Passive oral immunization by egg yolk immunoglobulin (IgY) to Vibrio cholerae effectively prevents cholera. Acta Med Okayama. 2010;64(3):163–70.

22- Li CH, Lu XJ, Li DF, Chen J. Passive protective effect of chicken egg yolk immunoglobulins against experimental Vibrio anguillarum infection in ayu (Plecoglossus altivelis). Fish Shellfish Immunol. 2014;37(1):108–14.

23- Punyokun K, Hongprayoon R, Srisapoome P, Sirinarumitr T. The production of anti-Vibrio harveyi egg yolk immunoglobulin and evaluation of its stability and neutralisation efficacy. Food Agric Immunol. 2013;24(3):279–94.

Evaluation of inactivated Vibrio fluvialis vaccine in Hyline W36 breeding hens

Mojtaba Mirzaei*[1], Mohsen Najimi[2], Mohammad Jahantigh[3], Firouz Ebrahimi[4], Abbas Jamshidian[5], Narjes Hasan Fakhrabadi[6]

1- Graduated doctor of veterinary medicine, Faculty of Veterinary medicine, University of Zabol, Zabol, Iran.
2- Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Zabol, Zabol, Iran.
3- Department of Clinical Science Faculty of Veterinary Medicine, University of Zabol, Zabol, Iran.
4- Biology research center, Faculty of Basic Sciences, Imam Hossein University, Tehran, Iran.
5- Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Zabol, Zabol, Iran.
6- DVM student, Faculty of Veterinary Medicine, University of Zabol, Zabol, Iran.

Receive: January 8, 2018; Revise: January 30, 2018; Accept: March 11, 2018

Summary

Vibrio fluvialis causes disease and significant economic losses in breeding fish. This bacterium is considered as a human pathogen and several species of marine spawning fish. The egg yolk immunoglobulin technology (IgY) has been used to control many microbial infections. The purpose of the present study was to evaluate the vaccine prepared from V. fluivialis bacteria after injection into laying hens. V. fluvialis was admixed by 0.05% formaldehyde after culture in a liquid medium. Then, the pathogen along with Freund's adjuvant was injected to the Hyline W36 hens as a vaccine for 7 days. Increase of the weight of the hens was measured until Physical maturity and egg production. Then, an Indirect ELISA was designed to detect IgG Anti V. fluivialis. Injection of the vaccine had no significant effect on weight gain of hens and the number and weight of eggs during the experiment. ELISA test showed that antibody titers in the serum of hyper-immunized hens after injection of the fourth booster reached 1: 12800. According to the results obtained and the results of studies by other researchers, egg yolk antibody (IgY), which is the same as IgG, has been shown to inhibit the pathogenicity in lab and farm animals.

Keywords: *Freund's adjuvant, laying hens, Vibrio fluviali*