



کاهش عوارض آفاتوکسیکوزیس تجربی در بلدرچین ژاپنی با استفاده از پادتن اختصاصی زرده تخم

مرضیه باقری^۱، محمد امیر کریمی ترشیزی^۲ و محمدجواد رسایی^۳

^۱ و ^۳ - دانشجوی کارشناسی ارشد و استاد، دانشگاه تربیت مدرس

^۲ - دانشیار، دانشگاه تربیت مدرس، (نویسنده مسؤول: karimtm@modares.ac.ir)

تاریخ دریافت: ۹۳/۳/۱۸ تاریخ پذیرش: ۹۴/۸/۴

چکیده

این تحقیق در دو مرحله با اهداف تولید و استخراج پادتن علیه سم آفاتوکسین B₁ در زرده تخم بلدرچین تخم‌گذار و هم‌چنین ارزیابی کارایی مصرف خوراکی پادتن زرده تولید شده در کاهش عوارض آفاتوکسیکوز تجربی در بلدرچین در حال رشد انجام شد. در آزمایش اول IgY ضد آفاتوکسین B₁ تولید و میزان کاهندگی سم توسط پادتن استخراج شده از زرده ایمن و غیرایمن بررسی شد. در تمامی غلظت‌ها میزان کاهش در زرده ایمن شده علیه آفاتوکسین B₁ بیشتر از زرده غیرایمن بود (P < ۰/۰۵). در مرحله دوم تعداد ۱۲۰ قطعه جوجه یک‌روزه بلدرچین ژاپنی در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۴ تیمار، ۵ تکرار و ۶ جوجه در هر قفس مورد استفاده قرار گرفت. گروه‌های آزمایشی شامل ۱- شاهد منفی، تغذیه با دان غیرآلوده، ۲- شاهد مثبت - تغذیه با دان آلوده به دو پی‌پی‌ام آفاتوکسین B₁، ۳- دان آلوده + آب آشامیدنی حاوی ۰/۴ درصد زرده دارای IgY ضد آفاتوکسین B₁، ۴- دان آلوده + آب آشامیدنی حاوی ۰/۴ درصد زرده ایمن نشده علیه AFB₁ بودند. مصرف جیره آلوده موجب کاهش معنی‌دار پروتئین تام، آلبومین، HDL، تری‌گلیسرید، کلسترول و گلوکز سرم شد. تنها میزان کراتینین سرم در پرندگان گروه شاهد مثبت افزایش نشان داد (P < ۰/۰۵). مصرف زرده ایمن از ایجاد این تغییرات جلوگیری نمود. پاسخ‌های ایمنی سلولی و همورال پرندگان تحت تأثیر مصرف جیره آلوده کاهش یافت و مصرف زرده ایمن و غیرایمن این تأثیر منفی را تا حد مشابه با گروه شاهد منفی بهبود داد (P < ۰/۰۵).

واژه‌های کلیدی: آفاتوکسین B₁، پادتن، بلدرچین ژاپنی، زرده تخم

مقدمه

گزارش منتشره در سال ۲۰۱۱ مایکوتوکسین‌ها را به عنوان یک مشکل فراگیر در جهان معرفی نمود (۳). خوردن مایکوتوکسین‌ها توسط حیوانات به عوارض پاتولوژیکی از جمله سرکوب سیستم ایمنی منجر می‌شود. آفاتوکسین B₁ از طریق آسیب به کبد، تحلیل اندام‌های مرتبط با ایمنی و سرکوب ایمنی- سلولی پاسخ ایمنی را تضعیف می‌نماید و به بالا رفتن حساسیت حیوان به عفونت‌ها منجر می‌شود (۹). برای کاستن از آفاتوکسین‌ها تیمارهای فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیکی به کار گرفته می‌شوند، البته هیچ‌کدام از این روش‌ها به‌طور صددرصد مؤثر و کاربردی نبوده‌اند (۲۰). استفاده از افزودنی‌های جاذب سموم قارچی رایج‌ترین راهبرد عملی در مواجهه با این سموم در مزارع است. جاذب‌ها می‌توانند ماهیت معدنی (۲۴)، آلی (۱) یا ترکیبی از این دو داشته باشند. اخیراً روش‌های زیستی به خاطر قابلیت استفاده آسان و کم‌هزینه، توجه محققین را جلب کرده است برای مثال برخی از پروبیوتیک‌ها، به درجات متفاوتی اثر کاهندگی سم را نشان داده‌اند (۲). در بسیاری از کشورهای در حال توسعه از جمله ایران، منابع خوراکی مختلف درجاتی از آلودگی به آفاتوکسین‌ها را دارند و نبودن سیستم کنترلی دقیق به‌همراه محدودیت منابع موجب ورود این سم به چرخه غذایی انسان می‌شود (۱۵).

زرده تخم‌مرغ سرشار از پادتن‌های پلی‌کلونال است که این پادتن‌ها ایمونوگلوبولین Y (ایمونوگلوبولین زرده^۱ یا IgY) نامیده می‌شوند. استفاده از IgY جهت مقابله با پیش‌گیری از عوامل بیماری‌زا نظیر سالمونلا (۴) و آنفلوآنزای پرندگان (۲۲)،

توسط محققان بررسی شده است. هم‌چنین جهت تشخیص سموم قارچی مختلف با استفاده از تکنیک الایزا از IgY استفاده شده است (۱۸). با توجه به عدم وجود گزارشی مبنی بر استفاده درمانی یا پیش‌گیرانه از پادتن خوراکی به‌دست آمده از تخم، در صورتی که مصرف خوراکی IgY ضد AFB₁ در کاستن از جذب یا بروز عوارض سم کارایی داشته باشد استفاده از آن به منظور پیش‌گیری و مقابله با عوارض آفاتوکسیکوز را می‌توان به فهرست روش‌های زیستی مقابله با مایکوتوکسین‌ها افزود.

مواد و روش‌ها

در بخش اول آزمایش ایمن‌سازی پرندگان تخم‌گذار با استفاده از کونژوگ آفاتوکسین B₁-آلبومین سرم گاوی (AFB₁-BSA conjugate) انجام شد. تعداد ده قطعه بلدرچین تخم‌گذار در سن چهار هفتگی با کونژوگ AFB₁-BSA (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) ایمن شدند. این تیمار به پنج قطعه بلدرچین مشابه دیگر نیز اعمال شد، با این تفاوت که ماده تزریقی فاقد کونژوگ بود (گروه شاهد). تزریق طی چهار مرحله و به فواصل ده روز و به روش عضلانی در دو نقطه از سینه انجام شد. کنژوگ به ترتیب با ۰/۲ میلی‌لیتر یاور کامل فروند در تزریق اول و یاور ناقص فروند در تزریقات بعدی همراه بود، تا پاسخ ایمنی مناسب‌تری به‌دست آید. مقدار تزریق کونژوگ در مراحل اول و دوم ۲۰۰ µg و در مراحل سوم و چهارم ۱۰۰ µg به‌ازای هر پرنده بود. پس از آخرین ایمن‌سازی، تخم‌های تولیدی هر تیمار طی یک ماه به‌طور جداگانه جمع‌آوری و در یخچال

1- Yolk immunoglobulin

نگهداری شدند. در پایان دوره گردآوری، استخراج IgY روش فولتن و همکاران انجام گرفت (۱۳). به اختصار ابتدا زرده تخم مرغ به طور کامل از سفیده جدا شد و غشای محافظ زرده نیز جدا شد. هم حجم زرده به دست آمده محلول بافر فسفات نمکی افزوده و مخلوط حاصل به مدت سه دقیقه با سرعت بالا در دستگاه مخلوط کن همگن شد و سپس در دمای ۴ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه و با نیروی در ۱۸۰۰× سانتریفوژ شد. پس از سانتریفوژ لایه میانی حاوی IgY جمع آوری شد.

جهت تولید آفلاتوکسین B₁ از یک ویال استاندارد Aspergillus parasiticus PTCC-5286 سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران استفاده شد. برای تعیین قابلیت زرده ایمن شده در کاهش سم آفلاتوکسین B₁ از محلول سم آفلاتوکسین تولیدی که به روش BF استخراج و تعیین غلظت شده بود، استفاده شد (۲). روش استخراج به اختصار عبارت بود از: ۱۰ گرم برنج با ۲۰۰ میلی لیتر متانول ۵۵٪ به طور کامل در داخل یک ارلن مخلوط شد. سپس ۱۰۰ میلی لیتر هگزان نرمال به مخلوط فوق (برنج و متانول) اضافه شد و ارلن به مدت ۱۵ دقیقه تکان داده شد. مخلوط در ۲۰۰۰ دور در دقیقه برای مدت پنج دقیقه سانتریفوژ شد. در این مرحله فاز متانولی-آبی به آرامی از سایر فازها جدا شد. حجم مساوی کلروفرم افزوده شد و به مدت ۱۵ دقیقه مخلوط شد. فاز کلروفرم جداسازی و پس از تغلیظ در یخچال نگهداری شد (۲۷).

مقدار ۵۰ میکرولیتر از زرده استخراج شده از تخم پرندگان ایمن و غیرایمن پس از رقیق سازی در غلظت‌های ۴، ۱۲، ۲۴، ۴۸، ۹۶ و ۳۸۴ گرم در لیتر به یک میلی لیتر بافر فسفات حاوی پنج میکروگرم در میلی لیتر آفلاتوکسین B₁ افزوده شد. از آب مقطر به عنوان شاهد استفاده شد. پس از یک ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سلسیوس، با استفاده از ۱۰۰ میکرولیتر محلول اسید تری کلرواستیک ده درصد، مجموعه

IgY و آفلاتوکسین B₁ متصل به آن با استفاده از سانتریفوژ در ۱۰۰۰۰×g رسوب داده شد. میزان سم غیرمتصل باقی مانده در مایع رویی پس از استخراج با ۵۰ میکرولیتر کلروفرم به روش کروماتوگرافی نازک لایه و روی صفحات سلیکاژل (TLC Silica gel 60 F254, Merck, Germany) اندازه گیری شد (۲). از متانول ۵۵ درصد از فاز متحرک استفاده شد (۱۰، ۱۱). با استفاده از نمودار چگالی^۱ مربوط به لکه های سم در قبل و بعد از انکوباسیون میزان کاهش سم آزاد محاسبه شد. از نرم افزار Photocapt برای کمی کردن لکه ها استفاده شد.

در بخش دوم آزمایش تعداد ۱۲۰ قطعه بلدرچین ژاپنی یک روزه تهیه شد. جوجه ها در قالب طرح کاملاً تصادفی، با چهار گروه آزمایشی و هر گروه با پنج تکرار و در هر واحد آزمایشی شش قطعه جوجه مورد بررسی قرار گرفتند. میزان استفاده از زرده تخم مرغ بر اساس تحقیق فولتن چهار گرم در لیتر تعیین شد (۱۳). گروه های آزمایشی شامل: ۱- شاهد منفی: دان غیرآلوده، ۲- شاهد مثبت: دان آلوده به دو پی پی ام آفلاتوکسین B₁، ۳- دان آلوده + آب آشامیدنی حاوی ۰/۴ درصد (V/V) زرده دارای IgY ضد آفلاتوکسین B₁، ۴- دان آلوده + آب آشامیدنی حاوی ۰/۴ درصد (V/V) زرده ایمن نشده علیه آفلاتوکسین B₁ بودند. به جیره تیمارهایی که از دان آلوده استفاده می کردند ۲۲/۷۳ گرم در کیلوگرم از برنج آلوده به آفلاتوکسین B₁ اضافه شد تا مقدار دو پی پی ام سم آفلاتوکسین B₁ تأمین شود و به جیره گروه شاهد منفی به همان میزان برنج غیرآلوده اضافه شد. جیره مصرفی نیز به صورت کرامبل پیش‌آغازین ویژه از شرکت چینه تهیه شد. تجزیه شیمیایی جیره در جدول ۱ آورده شده است. با استفاده از کیت الایزا عاری بودن دان تهیه شده از آفلاتوکسین B₁ تأیید شد (Ridascreen Aflatoxin B₁, R-Biopharm, Germany).

جدول ۱- تجزیه شیمیایی جیره

انرژی متابولیسمی (kcal/kg)	۳۱۰۰
پروتئین خام (%)	۲۲
چربی خام (%)	۶
حداقل متیونین (%)	۰/۶۴
لیزین (%)	۱/۴
متیونین + سیستین (%)	۱
کلسیم (%)	۱
فسفر قابل دسترس (%)	۰/۴۵
سدیم (%)	۰/۲

سیستم ایمنی جوجه ها استفاده شد. در روز ۲۸ پرورش به تعداد دو قطعه بلدرچین نر موجود در هر واحد آزمایشی مقدار ۰/۱ میلی لیتر از سوسپانسیون گلبول قرمز گوسفند پنج درصد در بافر فسفات استریل از طریق عضله سینه تزریق شد. هفت روز بعد از تزریق از همان پرندها از طریق ورید بال خونگیری شد (۳۳، ۳۱). جهت ایمن سازی علیه ویروس نیوکاسل در روز ۲۱ به تمام بلدرچین های هر واحد آزمایشی مقدار یک دز واکسن نیوکاسل (B₁) به صورت قطره چشمی داده شد. سپس ۱۴ روز بعد از ایمن سازی از همان پرندها از طریق ورید بال

برای اندازه گیری شاخص های بیوشیمیایی سرم در سن ۳۵ روزگی از هر گروه آزمایشی چهار پرنده به صورت تصادفی انتخاب و از ورید بال در حدود دو میلی لیتر خون گرفته شد. غلظت پروتئین تام، آلبومین، اسید اوریک، کراتینین، گلوکز، کلسترول و تری گلیسرید موجود در نمونه های سرم خون با کیت آزمایشگاهی شرکت پارس آزمون و دستگاه اسپکتروفتومتر (Jenway Genova MK3, UK) تعیین شد. برای بررسی عملکرد ایمنی همورال از تزریق گلبول قرمز گوسفند و واکسن نیوکاسل به عنوان پادگن جهت تحریک

1- Densitograph

مختلف بود. هم‌چنین در غلظت‌های ۲۴ گرم در لیتر و بیشتر این تفاوت به‌صورت معنی‌داری مشاهده شد ($p < 0.01$). زرده ایمن و غیرایمن در غلظت‌های ۷۶۸ و ۱۰۰۰ گرم در لیتر هیچ لکه‌ای روی TLC نشان ندادند که گواه بر حذف کامل آفاتوکسین در این غلظت‌ها می‌باشد. با توجه به این که غلظت زرده استفاده شده در مزرعه (چهار گرم در لیتر) تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های دریافت‌کننده زرده ایمن و غیرایمن را نشان نمی‌دهد ولی اعداد به‌دست آمده نشان‌دهنده کاهش ۱۰/۹ درصد آفاتوکسین توسط زرده ایمن نشده و ۱۹/۵ درصد کاهش سم در زرده ایمن شده می‌باشد.

اثر آفاتوکسین B_1 ، زرده ایمن و غیرایمن علیه AFB_1 بر شاخص‌های بیوشیمیایی سرم خون بلدرچین ژاپنی تفاوت معنی‌داری در غلظت پروتئین کل و آلبومین گروه‌های مختلف نشان داد ($p < 0.01$). بالاترین غلظت این دو فراسنجه در گروه دریافت‌کننده آفاتوکسین به‌همراه زرده ایمن شده علیه آفاتوکسین مشاهده شد و پائین‌ترین مقدار آن نیز مربوط به گروه شاهد مثبت بود. سطح کراتینین در سرم نیز تفاوت معنی‌داری نشان می‌دهد ($p < 0.05$). دریافت سم در گروه های شاهد مثبت و زرده غیرایمن موجب افزایش غلظت کراتینین شد.

اثر آفاتوکسین B_1 ، زرده ایمن و غیرایمن علیه آفاتوکسین B_1 بر شاخص‌های بیوشیمیایی سرم خون بلدرچین ژاپنی تفاوت معنی‌داری در غلظت پروتئین کل و آلبومین گروه‌های مختلف نشان داد ($p < 0.01$).

خون‌گیری شد. هم‌چنین برای سنجش ایمنی سلولی از ماده دی نیتروکلروبنزن (DNCB- Merck; Darmstadt, Germany) به صورت تماسی و تزریق فیتوهما گلویتینین-P (PHA-Gibco, USA) در سن ۴۲ روزگی استفاده شد. به این ترتیب که دو پرنده از هر قفس پس از علامت‌گذاری با رنگ‌های مختلف، به‌وسیله چالش پوست با ۰/۲۵ میلی‌لیتر دی نیتروکلروبنزن، (حاوی ۰/۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر DNCB) چالش داده شد. دی‌نیتروکلروبنزن در مخلوط استون و روغن زیتون به نسبت چهار به یک حل شد (۳۲). برای سنجش تأثیر PHA بر التهاب ناشی از بازوفیل‌های پویتی ۵۰ میکرولیتر از محلول PHA با استفاده از سرنگ هیپودرمی به پرده بال دو پرنده از هر قفس تزریق شد. ضخامت پوست قبل و ۲۴ ساعت پس از تجویز DNCB و PHA تعیین شد. کلیه محاسبات آماری با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS (۱۹۹۰) انجام شد و برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون LSD در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ و ۰/۰۱ استفاده شد.

نتایج و بحث

در بخش اول پس از استخراج پادتن، غلظت‌های مختلف زرده ایمن شده و غیرایمن که در برگیرنده غلظت استفاده شده در آزمایش دوم (و غلظت‌های بالاتر از آن بود) برای ارزیابی قابلیت آفاتوکسین‌زدایی مورد مطالعه قرار گرفت (جدول ۲). با توجه به نتایج، میزان کاهش سم در زرده ایمن شده علیه آفاتوکسین B_1 بیشتر از زرده ایمن نشده در غلظت‌های

جدول ۲- مقایسه میزان درصد کاهندگی سم آفاتوکسین B_1 توسط زرده ایمن و غیرایمن علیه آفاتوکسین B_1 در غلظت‌های مختلف
Table 2. Comparison of toxin reduction rate by anti-aflatoxin B_1 immune and un-immune yolk at various concentrations

غلظت زرده (g/l)	۴*	۱۲	۲۴	۴۸	۹۶	۱۹۲	۳۸۴
زرده ایمن نشده	۱۰/۹	۱۲/۶	۱۳/۷ ^b	۲۹/۷ ^b	۴۲/۱ ^b	۴۴/۷ ^b	۵۵/۹ ^b
زرده ایمن شده علیه آفاتوکسین B_1	۱۹/۵	۲۲/۲	۲۸/۳ ^a	۴۹/۷ ^a	۶۶/۴ ^a	۷۲/۵ ^a	۷۳/۳ ^a
P-value	۰/۱۲	۰/۱۰	<۰/۰۰۰۱	۰/۰۱	۰/۰۰۰۸	<۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۰۱
خطای معیار میانگین	۰/۰۳	۰/۰۳	۰/۰۳۳	۰/۰۵	۰/۰۵	۰/۰۶	۰/۰۴

* ۴ گرم در لیتر آب آشامیدنی در واقع غلظت زرده استفاده شده در مزرعه می‌باشد.
میانگین‌های دارای حروف متفاوت در هر ستون با یکدیگر اختلاف معنی‌دار دارند.

بین تیمارها در گروه شاهد مثبت از کمترین غلظت برخوردار بود و استفاده از زرده‌های ایمن و غیرایمن موجب افزایش غلظت این متابولیت‌ها در سرم در مقایسه با گروه شاهد مثبت شد. در بین تیمارها غلظت hdl تفاوت معنی‌داری نشان داد ($p < 0.05$). کمترین مقدار مربوط به گروه دریافت‌کننده زرده ایمن بود (جدول ۳).

با توجه به نتایج موجود در این بررسی زرده ایمن شده باعث افزایش برخی شاخص‌های بیوشیمیایی سرم مانند پروتئین تام، آلبومین و تری‌گلیسرید و بهبود عملکرد سیستم ایمنی شد. آفاتوکسین باعث جلوگیری از سنتز پروتئین‌ها می‌شود (۱۱)، در نتیجه، کاهش پروتئین سرم یکی از پیامدهای معمول آفاتوکسیکوز می‌باشد، به‌طوری‌که کاهش در سطوح پروتئین تام و آلبومین سرم شاخص آفاتوکسیکوز مطرح محسوب می‌شود (۲۵). پروتئین تام و آلبومین سرم در جوجه‌هایی که جیره آفاتوکسین‌دار به‌همراه مواد جاذب مصرف کردند بهبود یافت که این بهبود، حاصل کاهش

بالاترین غلظت این دو فراسنجه در گروه دریافت‌کننده آفاتوکسین به‌همراه زرده ایمن شده علیه آفاتوکسین مشاهده شد و پائین‌ترین مقدار آن نیز مربوط به گروه شاهد مثبت بود. سطح کراتینین در سرم نیز تفاوت معنی‌داری نشان می‌دهد ($p < 0.05$). دریافت سم در گروه‌های شاهد مثبت و زرده غیرایمن موجب افزایش غلظت کراتینین شد. در گروه زرده ایمن میزان کراتینین در حد گروه شاهد بدون سم کاهش نشان داد. تفاوت غلظت اسید اوریک سرم در بین تیمارهای مختلف معنی‌دار نبود. تفاوت معنی‌داری در غلظت گلوکز گروه‌های مختلف مشاهده شد ($p < 0.01$). بالاترین غلظت گلوکز مربوط به گروه زرده غیرایمن بود که با گروه‌های شاهد منفی و زرده ایمن تفاوتی را نشان نمی‌دهد. کمترین غلظت گلوکز مربوط به پرندگان گروه شاهد مثبت می‌باشد ($p < 0.01$). گروه دریافت‌کننده آفاتوکسین به همراه زرده‌های ایمن و غیرایمن باعث افزایش غلظت گلوکز در مقایسه با شاهد مثبت شد. میزان تری‌گلیسرید و کلسترول در

افزایش و کلسترول کاهش یافت. دلی و همکاران (۷) گزارش کردند جیره حاوی آفلاتوکسین باعث کاهش معنی‌دار تری‌گلیسرید و کلسترول سرم نسبت به گروه کنترل می‌شود. گزارش شده که آفلاتوکسین‌ها باعث کاهش میزان گلوکز سرم می‌شوند (۲۳). مشابه این نتیجه در آزمایش حاضر نیز مشاهده شد.

اثرات سمی آفلاتوکسین B₁ از مواد جاذب بود (۲۵). لیپیدهای گردش خون، از جذب روده‌ای لیپیدهای جیره غذایی و سنتز کبدی، یا بسیج آنها از اندوخته‌های چربی بدن منشاء می‌گیرند. تغییر در میزان کلسترول سرم در بیماری‌های کبدی گزارش شده است (۱۲). سانتوریو (۲۳) گزارش کرد با مصرف آفلاتوکسین‌ها، تری‌گلیسرید سرم

جدول ۳- اثر سم آفلاتوکسین B₁ و زرده های ایمن و غیرایمن بر شاخص‌های بیوشیمیایی سرم
Table 3. Effect of aflatoxin B₁, anti-aflatoxin B₁ immune and un-immune yolks on serum biochemistry

گروه ها	آفلاتوکسین B ₁ (mg/kg)	زرده مصرفی در آب (g/l)	پروتئین تام (g/dl)	آلبومین (g/dl)	کراتینین اوریک اسید (mg/dl)	گلوکز (mg/dl)	HDL تری‌گلیسرید (mg/dl)	کلسترول
شاهد مثبت	۲	۰	۳/۰۸ ^c	۱/۹۵ ^d	۰/۶۳ ^a	۱۷۳/۴۴ ^d	۶۶/۵ ^{bc}	۱۱۵/۳۰ ^c
شاهد منفی	۰	۰	۳/۵۲ ^{ab}	۲/۱۷ ^a	۰/۵۱ ^d	۱۸۸/۹۶ ^{ab}	۶۷/۶۸ ^d	۱۲۶/۱۵ ^{ab}
زرده ایمن	۲	۴	۳/۷۱ ^a	۲/۲۱ ^a	۰/۵۳ ^d	۱۸۳/۹۴ ^{bc}	۶۰/۱۱ ^c	۱۲۵/۹۵ ^{ab}
زرده غیرایمن	۲	۴	۳/۳۴ ^d	۲/۰۹ ^a	۰/۶۳ ^a	۱۹۵/۹۴ ^a	۷۷/۴۶ ^a	۱۲۸/۸۴ ^a
P-value			۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۰۵	۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۰۵
خطای معیار میانیگین			۰/۰۵۳	۰/۰۲۴	۰/۰۱۶۳	۰/۰۸۳	۱/۴۶	۱/۹۹

میانیگین‌های دارای حروف متفاوت در هر ستون با یکدیگر اختلاف معنی‌دار دارند.

آفلاتوکسین به تنهایی بود. عوامل مختلفی ممکن است به سرکوب سامانه ایمنی منجر شوند که در پی آن پرنده پاسخ مناسبی نسبت به عامل آسیب‌رسان نشان نخواهد داد که از جمله این عوامل می‌توان به عوامل عفونی (ویروس‌های گامپورو، کم‌خونی عفونی، مارک، نفریت پرندگان، لکوز پرندگان، آدنوویروس‌ها و رتوویروس‌ها)، عوامل غیرعفونی (آفلاتوکسین، اکراتوکسین، سیتروتوکسین و سایر سموم قارچی) و اختلالات گوارشی و تغذیه‌ای اشاره کرد (۶). آفلاتوکسین‌ها تأثیر معنی‌داری بر ایمنی هومورال می‌گذارند که این می‌تواند در اثر آسیب‌های شدید کبدی و کاهش تولید ایمونوگلوبولین‌ها باشد (۱۴). بورس فابریسیوس یکی از اندام‌های لنفوئیدی است که لنفوسیت‌های B را تولید می‌کند. عدم توسعه این اندام باعث کاهش تولید لنفوسیت‌های B و در نتیجه تضعیف ایمنی هومورال می‌شود (۲۸). گزارش‌های مختلف نشان می‌دهند که آفلاتوکسین‌ها باعث تحلیل بورس فابریسیوس می‌شوند و در نتیجه ایمنی هومورال تضعیف می‌شود (۱۷). آفلاتوکسین‌ها با جلوگیری از سنتز پروتئین‌ها موجب کاهش تولید پادتن در بدن پرنده می‌شوند (۳۰). آفلاتوکسین‌ها پاسخ به واکسن را کاهش داده و باعث وقوع بیماری‌های عفونی می‌شوند (۵). از لحاظ افزایش ضخامت پوست در چالش با DNCB و فیتوهمگلوتنین گروه دریافت‌کننده آفلاتوکسین به طور معنی‌داری کمتر از سایر گروه‌ها بود. بیش‌ترین مقدار افزایش ضخامت پوست به‌ترتیب در گروه شاهد منفی، دریافت‌کننده آفلاتوکسین به همراه زرده ایمن شده علیه آفلاتوکسین B₁ و دریافت‌کننده آفلاتوکسین به همراه زرده ایمن نشده علیه آفلاتوکسین B₁ را نشان دادند. هم‌چنین در چالش با فیتوهمگلوتنین-P ضخامت پوست در گروه شاهد منفی به طور معنی‌داری بیشتر از سایر گروه‌ها بود (جدول ۴). افزودن ۵۰ و ۲۰۰ میکروگرم در کیلوگرم آفلاتوکسین B₁ به جیره جوجه‌های گوشتی باعث کاهش معنی‌دار عیار پادتن تولیدی علیه واکسن نیوکاسل در مقایسه با گروه کنترل شد (۲۹). هاشمی و همکاران (۱۶) نشان دادند که افزودن ۱۰۰ الی ۳۰۰ ppb آفلاتوکسین با و بدون دیواره

استفاده از زرده ایمن تأثیر سم بر تغییر متابولیت‌های سرم را مهار نمود که می‌تواند به علت جذب سم توسط پادتن موجود در زرده ایمن باشد. کاهش سم توسط زرده غیرایمن را با توجه به اجزاء سازنده آن می‌توان به واکنش اجزاء پروتئینی و تاحدی کربوهیدرات موجود در زرده نسبت داد، زیرا ترکیب زرده عبارتست از: چربی ۳۵/۵-۳۱/۸ درصد، آب ۴۸/۷ درصد و پروتئین ۱۶/۶-۱۵/۷ درصد، مواد معدنی ۱/۱ درصد و کربوهیدرات ۱/۰-۰/۲ درصد می‌باشد (۱۹). با در نظر گرفتن شیوه استخراج (۱۳) جزء عمده چربی و مواد جامد در قسمت استخراج شده حذف شده است و تنها پروتئین، مواد معدنی و کربوهیدرات‌ها بر جای می‌مانند. در پرندگان مبتلا به نارسایی کلیه به علت کاهش دفع اسید اوریک توسط کلیه‌ها انتظار می‌رود که میزان اسید اوریک سرم افزایش یابد (۳۱). سانتوریو (۲۳) گزارش کرد مصرف جیره‌های آلوده به آفلاتوکسین موجب افزایش معنی‌داری در میزان اسید اوریک و کراتینین سرم جوجه‌های گوشتی در سن ۴۲ روزگی شد که دلیل این افزایش می‌تواند آسیب کلیه‌ها در اثر مصرف آفلاتوکسین باشد. در آزمایش حاضر استفاده از زرده ایمن شده توانست جلوی افزایش سطح کراتینین سرم را بگیرد، در حالی که در مورد زرده غیرایمن میزان افزایش کراتینین مهار نشد.

تأثیر تیمارهای مختلف بر عیار پادتن علیه واکسن نیوکاسل در ۳۵ روزگی در جدول ۴ نشان داده شد. عیار پادتن علیه واکسن نیوکاسل در ۳۵ روزگی در گروه دریافت‌کننده آفلاتوکسین به‌طور معنی‌داری کمتر از گروه دریافت‌کننده آفلاتوکسین همراه افزودنی‌ها بود ($p < 0.05$). تأثیر تیمارهای مختلف بر عیار پادتن علیه گلبول قرمز گوسفند در ۳۵ روزگی در جدول ۴ نشان داده شده است. میزان پادتن تولید شده بر علیه گلبول قرمز گوسفند تفاوت معنی‌داری در بین تیمارهای مختلف داشت ($p < 0.01$) و بالاترین عیار پادتن به ترتیب مربوط به گروه دریافت‌کننده آفلاتوکسین به‌همراه زرده ایمن علیه آفلاتوکسین B₁ و زرده غیرایمن بود و کمترین مقدار مربوط به گروه دریافت‌کننده

سلولی مخمر تأثیر معنی‌داری روی عیار پادتن تولیدی علیه واکسن نیوکاسل نداشت. وجود یک پی‌پی‌ام آفاتوکسین در جیره جوجه‌های گوشتی باعث کاهش معنی‌دار عیار پادتن بر

علیه واکسن نیوکاسل در یک و سه هفته بعد از واکسیناسیون شد (۲۶).

جدول ۴- اثر سم آفاتوکسین B₁ و زرده های ایمن و غیرایمن بر پاسخ‌های ایمنی سلولی و همورال
Table 4. Effect of aflatoxin B₁, anti-aflatoxin B₁ immune and un-immune yolks on humoral and cell mediated immune responses

عیار پادتن / (log2)		افزایش ضخامت پوست (mm)		زرده مصرفی در آب	آفاتوکسین B ₁	گروه‌ها
نیوکاسل	SRBC	فیتوهماکلویتین	دی‌نیتروکلروبنزن	(g/l)	(mg/kg)	
۲/۰۰ ^b	۲/۲۵ ^c	۲/۰۴ ^b	۱/۸۶ ^b	۰	۲	شاهد مثبت
۲/۷۵ ^{ab}	۴/۵۰ ^a	۲/۵۳ ^a	۲/۲۲ ^a	۰	۰	شاهد منفی
۳/۲۵ ^a	۳/۲۵ ^{abc}	۲/۳۹ ^{ab}	۲/۱۶ ^a	۴	۲	زرده ایمن
۳/۲۰ ^a	۲/۷۵ ^{bc}	۲/۱۲ ^b	۲/۱۰ ^a	۴	۲	زرده غیرایمن
۰/۰۰۳	۰/۰۱۵	۰/۰۰۹	۰/۰۰۰۱			P-value
۰/۱۵	۰/۲۵	۰/۰۵۶	۰/۴۴			خطای معیار میانگین

میانگین‌های دارای حروف متفاوت در هر ستون با یکدیگر اختلاف معنی‌دار دارند.

جیره مسموم را مهار نمود و تأثیر زرده ایمن در مقایسه با زرده غیرایمن بیشتر بود. افزودن ۰/۵، یک و دو میلی گرم در کیلوگرم آفاتوکسین به جیره جوجه‌های گوشتی باعث کاهش معنی‌دار ضخامت پوست در ناحیه چالش با DNCB شد و غلظت سم تأثیری در کاهش ضخامت پوست نداشت (۳۳). در این آزمایش نشان داده شد که استفاده خوراکی از زرده تخم می‌تواند میزان عوارض ناشی از آفاتوکسیکوز B₁ بر اساس شاخص‌های مرتبط با بیوشیمی خون و سیستم ایمنی را در بلدرچین کاهش دهد و احتمالاً تأثیرگذاری زرده در تخم‌های ایمن شده نسبت به تخم غیرایمن بیشتر می‌باشد.

هم‌چنین آفاتوکسین‌ها تأثیر معنی‌داری روی ایمنی سلولی جوجه‌ها می‌گذارند. برای ارزیابی ایمنی با واسطه سلولی می‌توان از تست‌هایی چون افزایش حساسیت نوع تأخیری پوست به دی‌نیتروکلروبنزن (DNCB) و فیتوهماکلویتین-P (PHP) استفاده نمود. گزارش‌های پیشین نشان دادند که این واکنش ناشی از فعالیت لنفوسیت T بوده و از مشخصات فعالیت لنفوسیت B نمی‌باشد (۸). در آزمایش حاضر میزان افزایش ضخامت پوست در گروهی که آفاتوکسین B₁ را بدون افزودنی دریافت کرده بود به‌طور معنی‌داری کمتر از سایر گروه‌ها بود. افزودن زرده ایمن و غیرایمن جلوی کاهش در پاسخ‌های ایمنی ناشی از تغذیه

منابع

- Ahmadi, M. and M.A. Karimi Torshizi. 2016. Effects of dietary vermi-humus in comparison to virginiamycin on performance and small intestinal morphometric parameters in Japanese quail Research on Animal Production, 7: 77-86 (In Persian).
- Bagherzadeh Kasmani, F., M.A. Karimi Torshizi, A. Allameh and F. Shariatmadari. 2012. A novel aflatoxin-binding bacillus probiotic: performance, serum biochemistry and immunological parameters in Japanese quail. Poultry Science, 91: 1846-1853.
- Biomim. 2011. BIOMIN's Mycotoxin Survey. Annual Report 2010.
- Chalghoumi, R., Y. Beckers, D. Portetelle and Z. Théwis. 2009. Hen egg yolk antibodies (IGY), production and use for passive immunization against bacterial enteric infections in chicken. Biotechnology, agronomy, Society and Environment, 13: 295-308.
- Corrier, D.E. 1991. Mycotoxicosis: mechanism of immunosuppression. Veterinary immunology and immunopathology, 30: 71-87.
- Davison, F., B. Kaspers and K.A. Schat. 2009. Avian Immunology. Academic Press. London. Great Britain, 481pp.
- Denli, M., J.C. Blandon, M.E. Guynot, S. Salado and J.F. Perez. 2009. Effects of dietary aflatoxin on performance, serum biochemistry, histopathological changes, and aflatoxin residues in broilers exposed to aflatoxin B₁. Poultry Science, 88: 1444-1451.
- Diaz, D.E., W.M. Hagler, J.T. Blackwelder, J.A. Eve, B.A. Hopkins and K.L. Andersen. 2004. Aflatoxin binders II: reduction of aflatoxin M₁ in milk by sequestering agents of cows consuming aflatoxin in feed. Mycopathologia, 157: 233-241.
- Dietert, R.R., K.A. Golemboski and R.E. Austic. 1994. Environment-Immune interactions. Poultry Science, 73: 1062-1076.
- El-Nezami, H., P. Kankaanpää, S. Salminen and J. Ahokas. 1998. Ability of dairy strains of lactic acid bacteria to bind a common food carcinogen, aflatoxin B₁ Food and Chemical Toxicology, 36: 321-326.
- El-Nezami, H., H. Mykkänen, P. Kankaanpää, S. Salminen and J. Ahokas. 2000. Ability of lactobacillus and propionibacterium strains to remove aflatoxin B₁ from the chicken duodenum. Journal of Food Protection, 63: 549-552.
- Fernandez, A., T.V. Maria, M. Gascon, J. Ramos, J. Gomez, D.F. Luco and G. Chavez. 1994. Variations of clinical biochemical parameters of laying hens and broiler chickens fed aflatoxin containing feed. Avian Pathology, 23: 37-47.

13. Fulton, R.M., B.N. Nersessian and W.M. Reed. 2002. Prevention of *salmonella* enteritidis infection in commercial ducklings by oral chicken egg-derived antibody alone or in combination with probiotics. *Poultry Science*, 81: 34-40.
14. Giambrone, J.J., D.L. Ewert, R.D. Wyatt and C.S. Eidson. 1978. Effect of aflatoxin on the humoral and cell-mediated immune system of the chicken. *American Journal of Veterinary Research*, 39: 305-308.
15. Hadiani, M.R., H. Yazdanpanah, M. Amirahmadi, H. Soleimani, S. Shoeibi and R. Khosrokhavar. 2009. Evaluation of aflatoxin contamination in maize from mazandaran province in Iran. *Journal of Medicinal Plants*, 8:109-114.
16. Hashmi, I., T.N. Pasha, M.A. Jabbar, M. Akram and A.S. Hashmi. 2006. Study of adsorption potential of yeast sludge against aflatoxins in broiler chicken. *Journal of Animal and Plant Sciences*, 16: 12-14.
17. Kubena, L.F., R.B. Harvey, R.H. Bailey, S.A. Buckley and G.E. Roninghaus. 1998. Effect of hydrated sodium calcium aluminosilicate (t-bintm) on mycotoxicosis in young broiler chickens. *Poultry Science*, 77: 1502-1509.
18. Lee, E.N., H.H. Sunwoo, K. Menninen and J.S. Sim. 2002. *In Vitro* studies of chicken egg yolk antibody (IGY) against *salmonella* enteritidis and *salmonella* typhimurium. *Journal of Poultry Science*, 81: 632-641.
19. Mine, Y. 2008. *Egg Bioscience and Biotechnology*. 1st Edition. John Wiley and Sons, Inc; Hoboken, NJ, USA.
20. Park, D.C. 1993. Controlling Aflatoxin in Food and Feed. *Food Technology*, 47: 92-96.
21. Peterson, A.L., M.A. Qureshi, P.R. Ferket and J.C. Fuller. 1999. Enhancement of cellular and humoral immunity in young broilers by the dietary supplementation of β -Hydroxy- β -Methylbutyrate. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 21: 307-330.
22. Rahimi, Sh., Z. Moghadam Shiraz, T. Zahraei Salehi, M.A. Karimi Torshizi and J.L. Grimes. 2007. Prevention of salmonella infection in poultry by specific egg-derived antibody. *International Journal of Poultry Science*, 6: 230-235.
23. Santurio, J.M. 1999. Effect of sodium bentonite on the performance and blood variables of broiler chickens intoxicated with aflatoxins. *British Poultry Science*, 40: 115-119.
24. Shabani, A., B. Dastar, M. Khomeiri, B. Shabanpur and S. Hasani. 2010. Effect of nanozeolite on performance, some blood parameters and ileal bacteria population in broiler chicks fed aflatoxin contaminated diets. *Research on Animal Production*, 1: 58-68 (In Persian).
25. Shi, Y.H., Z.R. Xu, J.L. Feng and C.Z. Wang. 2006. Efficacy of modified montmorillonite nanocomposite to reduce the toxicity of aflatoxin in broiler chicks. *Animal Feed Science and Technology*, 129: 138-148.
26. Shivachandra, S.B., R.L. Sah, S.D. Singh, J.M. Kataria and K. Manimaran. 2003. Immunosuppression in broiler chicken fed aflatoxin and inoculated with fowl adenovirus serotype-4 (fav-4) associated with hydropericardium syndrome. *Veterinary Research Communication*, 27: 39-51.
27. Shotwell, O.L., C.V. Hesseltine, R.D. Stubblefield and W.G. Sorenson. 1966. Production of aflatoxin on rice. *Applied and Environmental Microbiology*, 14: 425-428.
28. Sur, E. and I. Celik. 2003. Effect of aflatoxin b_1 on the development of the bursa of fabricius and blood lymphocyte acid phosphatase of the chicken. *British Poultry Science*, 44: 558-566.
29. Tessari, E.N.C., C.A.F. Oliveira, A.L.S.P. Cardoso, D.R. Ledoux and G.R. Rottinghaus. 2006. Effect of aflatoxin b_1 and fumonisin b_1 on body weight, antibody titres and histology of broiler chicks. *British Poultry Science*, 47: 357-364.
30. Tung, H.T., F.W. Cook, R.D. Wyatt and P.B. Hamilton. 1975. The anemia caused by aflatoxin. *Poultry Science*, 54: 1962-1969.
31. Tung, H.T., R.D. Wyatt, P. Thaxton and P.B. Hamilton. 1973. Impairment of kidney function during aflatoxicosis. *Poultry Science*, 52: 873-878.
32. Verma, J., T.S. Johri, B.K. Swain and S. Ameena. 2004. Effect of graded levels of aflatoxin and their combination on the performance and immune response of broilers. *British Poultry Science*, 45: 512-518.
33. Wegmann, T. and O. Smithies. 1966. A simple hemagglutination system requiring small amounts of red cells and antibodies. *Transfusion*, 6: 67-75.

Amelioration of Experimental B₁ Aflatoxicosis in Japanese Quails by Yolk Derived Specific Antibody

Marzieh Bagheri¹, Mohammad Amir Karimi Torshizi² and Mohammad Javad Rasaei³

1 and 3- M.Sc. Student and Professor, Tarbiat Modares University

2- Associate Professor, Tarbiat Modares University, (Corresponding author: karimitm@modares.ac.ir)

Received: June 8, 2014

Accepted: October 26, 2015

Abstract

Two experiments were carried out to determine the potential of oral yolk derived specific antibody against aflatoxin B₁ in Japanese quails. In the first experiment egg yolk derived antibody against aflatoxin B₁ was produced in layer quails. The potential of aflatoxin absorbent of the eggs from immunized and non-immunized layers was assayed *in vitro*. Egg yolk extracts derived from aflatoxin-BSA conjugate immunized layers absorbed more aflatoxin B₁ compared to that of non-immunized birds in concentrations over 24 g/l (P < 0.05). In the second experiment 120, one-d-old quails were randomly attributed to four experimental groups with five replications of six chicks. The experimental groups consisting: 1- negative control- fed uncontaminated feed. 2- Positive control- fed aflatoxin B₁ (2 mg/kg) contaminated feed. 3- AFB₁+SY- fed contaminated feed and 4 g/l yolk extract from immunized layers in drinking water. 4- AFB₁+NY- fed contaminated feed and 4 g/l yolk extract from non-immunized layers in drinking water. Feeding aflatoxin without yolk extract lowered serum concentrations of total protein, albumin, HDL, triglyceride, cholesterol and glucose. Oral yolk extracts restored the aflatoxicosis-induced alteration of serum metabolites to the normal levels similar to negative control. The yolk extract derived from immunized layers was more efficient compared to that of non-immunized birds. Aflatoxicosis diminished the studied cellular and humoral immune responses (P < 0.05), while oral yolk extracts boosts the immune responses to a level comparable to negative control.

Keywords: Aflatoxin B₁, Antibody, Egg Yolk, Japanese quail