

Staphylococcus aureus, *Klebsiella pneumoniae* ve *Pseudomonas aeruginosa* ile immunize edilen tavuklardan elde edilen IgY antikorlarının etkinliğinin ELISA yöntemiyle araştırılması

Investigation of the effectiveness of IgY antibodies obtained from chickens where immunized with *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa* by ELISA

Ali AFANDI¹, Funda DOĞRUMAN-ALA²

ÖZET

Amaç: IgY antikorları; tavukların serum ve yumurta sarısında bulunan enfeksiyon sırasında çoğalarak mikroorganizmalara karşı yüksek miktar spesifik antikorlardır. Bu antikorların yumurta sarısına transfer olduğu da bilinmektedir. IgY teknolojisi, tavuk yumurtasında antikor üretilmeye ve izole etmeye dayanan bir yöntemdir. IgY antikorunun yumurta sarısından izolasyonu koyun, keçi ve tavşan gibi hayvanların kanından izole edilmesine göre daha kolay, non-invaziv, uzun ömürlü ve yüksek miktarda sentezlenmesi gibi avantajlara sahiptir. Tavuk antikorlarının, tanı yöntemlerinde kullanılması, memeli antikorlarına göre daha düşük maliyete neden olabilecektir. Çalışmamızda, nozokomiyal pnömoni etkeni olarak sık tanımlanan *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) ve *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) bakterilerine karşı IgY eldesi ve antikorların etkinliğinin ELISA yöntemiyle araştırılması amaçlanmıştır.

Yöntem: Tavukların immunizasyonu, *S. aureus* ATCC 6538, *P. aeruginosa* ATCC 27853 ve *K. pneumoniae* ATCC13883 bakterileri kullanılarak hazırlanan antijen

ABSTRACT

Objective: IgY antibody is found in chickens' serum and egg yolk. IgY antibody in chickens is specific antibodies that develop highly against microorganisms during infection and is known to be transferred to egg yolk. IgY technology is a method based on producing and isolating antibodies in chicken eggs. The isolation of the IgY antibody from egg yolk is more easier to isolate, non-invasive, long life and higher in amount than it's isolation from sheep, goat and rabbit. Chicken antibodies used in diagnostic methods, will be lower cost than the mammalian antibody. In this study, the aim was to produce IgY antibodies against bacteria of *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) and *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) which are commonly identified as the cause of nosocomial pneumonia and to investigate the efficiency of these antibodies by of ELISA method.

Methods: Immunization of chicken was performed using *S. aureus* ATCC 6538, *P. aeruginosa* ATCC 27853 and *K. pneumoniae* ATCC13883 bacteria grown in blood agar and inactivated subsequently. Twenty-two-week-old Lohmann Brown laying hens were immunized

¹Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimler Enstitüsü, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
²Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı



İletişim / Corresponding Author : Ali AFANDI

Gazi Üni. Sağlık Bilimler Enstitüsü, Tıbbi Mikrobiyoloji A.D. Ankara-Türkiye
Tel : +90 535 922 98 16 E-posta / E-mail : aliafandy202@gmail.com

Geliş Tarihi / Received : 26.02.2019
Kabul Tarihi / Accepted : 31.03.2019

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2019.67366

Afandi A, Doğruman-Ala F. *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* ve *Pseudomonas aeruginosa* ile immunize edilen tavuklardan elde edilen IgY antikorlarının etkinliğinin ELISA yöntemiyle araştırılması. Turk Hij Den Biyol Derg, 2019; 76(4): 379-390

süspansiyonu 22 haftalık Lohmann Brown cinsi yumurta tavuklarına Freund's tamamlanmış adjuvanı ile kas içine enjekte edilerek gerçekleştirildi. Hatırlatma immunizasyonları iki hafta aralıklarla dört kere Freund's tamamlanmamış adjuvant kullanarak yapıldı. Bakterilere karşı oluşan IgY antikorlarının saflaştırılması ve elde edilmesi için PEG 6000 kullanıldı. Antikorların etkinliği ELISA yöntemi ile değerlendirildi. İmmunize edilen ve edilmeyen tavukların yumurtalarından izole edilen IgY antikorlarının OD değeri karşılaştırıldı.

Bulgular: *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* ile immunize edilmiş ve edilmemiş tavukların IgY antikorları arasındaki OD değerleri farklı dilüsyonlarda (1/100 ve 1/1000) karşılaştırıldığında; immunize olan tavukların yumurtalarından izole edilen IgY antikorlarının OD değerlerinin ODC değerinden daha yüksek olduğu saptanmıştır ($p<0.05$).

Sonuç: Çalışmamızda elde edilen veriler nozokomiyal pnömoni etkeni olarak sık izole edilen bakterilere karşı tavuklardan elde edilen IgY antikorlarının etkinliğinin yüksek olduğunu göstermiştir. IgY antikorlarının non invaziv, hızlı ve düşük maliyetli elde edilebilmesi bu antikorların son 10 yılda tanıda kullanılmasının yanı sıra bazı hastalıklara karşı korunmada ve tedavi seçenekleri arasında yer almasını sağlamıştır. IgY antikorlarının gelecekte tanı ve tedavi amacıyla etkin olarak kullanılabilmesi düşüncesine varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: IgY antikor, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, tanı, tedavi, ELISA

through intramuscular injection with Freund's complete adjuvant and re-stimulate immunizations with Freund's incomplete adjuvant were performed four times at an interval of two weeks. PEG 6000 procedure was used for the isolation and purification of IgY antibodies synthesized by immunized hens against bacteria. Efficacy of antibodies was evaluated with ELISA method and OD values of IgY the antibodies isolated from the eggs of immunized and non-immunized hens were subjected to comparison.

Results: IgY antibodies isolated from hens immunized with *S. aureus*, *K. pneumoniae* and *P. aeruginosa* bacterial antigens and from non-immunized hens were compared in order to determine OD values with ELISA method. In both dilutions (1/100 and 1/1000) IgY OD values of immunized hens were observed to be higher than the calculated cut off value (ODC) ($p<0.05$).

Conclusion: The data obtained from a study shows high efficacy of IgY antibodies isolated from chickens against bacteria which are commonly identified as the cause of nosocomial pneumonia. The fact that IgY antibodies can be obtained quickly through non-invasive cost-effective methods allowed these antibodies to be used in diagnostic procedures over the past decade as well as making them a viable choice among prevention and treatment options against certain diseases. Therefore, based on the results of this study, it was concluded that IgY antibodies might be largely and actively used for the purposes of diagnosis and treatments in the future.

Key Words: IgY antibody, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, diagnosis, treatment, ELISA

GİRİŞ

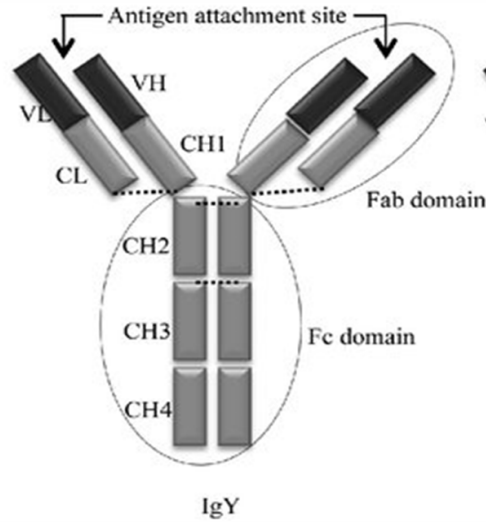
IgY antikorları, ilk defa Klemperer tarafından 1893 yılında mikroorganizmalarla immunize edilen tavukların yumurtalarının sarısından elde edilmiş ve oluşan bu antikorların mikroorganizmalara spesifik olduğu bildirilmiştir (1). IgY antikorları 1980'lerden

bu yana daha geniş uygulama alanlarında yer almıştır. Antikorların elde edilmesinin non-invazif olması nedeniyle 1996 yılında IgY teknolojisi European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM) araştırma ekibi tarafında alternatif bir antikor elde

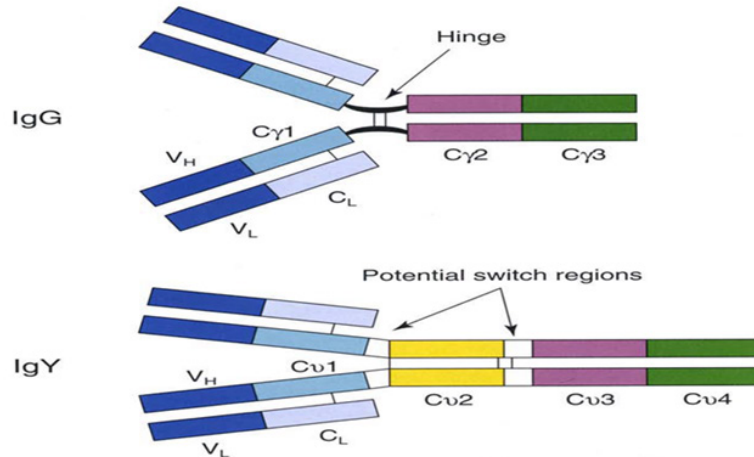
etme yöntemi olarak tavsiye edilmiştir (1). IgY teknolojisi 1999 yılında, İsviçre Hükümeti Veteriner Dairesi tarafından hayvan sağlığını desteklemek amacıyla kullanılabilecek alternatif bir yöntem olarak kabul görmüştür (1).

IgY molekülünün genel yapısı memelilerde bulunan IgG'ye benzer olup, iki ağır (H) ve iki hafif (L) zincirden oluşmaktadır. IgY (H) veya upsilon (U) zincirleri, tipik olarak bir değişken (V) ve dört sabit (C) bölgeye sahiptir (Şekil 1) (2, 3). IgY ağır zinciri 67-70 kDa tek tip olarak bilinmektedir. IgY'nin C1-C2 ve C2-C3 bağlantılarının yan kısmında prolin, glisin

rezidüleri içeren ve kısıtlı esneklik sağlayan bölgeleri bulunmaktadır. Sadece memeli IgG antikoruna özgü olan ve esneklik sağlayan menteşe bölgesine IgY antikor yapısındaki C1 ve C2 arasındaki bölge işlevsel olarak benzer özellik göstermektedir. IgY antikorunun bu yapısal özelliğinden dolayı IgG'ye göre esnekliği daha azdır ve bu nedenle antijenle bağlanma yeteneği daha spesifiktir. Ayrıca IgY 5.7-7.6 izoelektrik noktasına sahiptir ve bu sebeple IgG'den daha hidrofobiktir. Bu özelliği zengin yağ içeriğine sahip olan yumurta sarısına uyum sağlamasına neden olmaktadır (Şekil 2) (2, 4).



Şekil 1. IgY molekülünün genel yapısı (3)



Şekil 2. IgY ve IgG antikorlarının molekül karşılaştırılması (2, 4)

IgY antikorlarının IgG antikorlarına göre antijenlere afinitesinin 3-5 kat daha fazla olduğu bildirilmektedir. IgY antikorlarının güvenli ve dayanıklı yapıya sahip olması, tedavi ve koruma amacıyla kullanılmasını sağlamaktadır. IgY antikorlarının başlıca etki mekanizmaları ise; mikrobiyal ajanların hücre yüzeyine adezyonunu ve kolonizasyonunu etkilemesi, virüslerin hücreden hücreye geçişi sırasında spesifik bağlanmalar ile kolonizasyonun engellenmesi, sindirim sistemindeki patojenlerin aglütinasyonu ile toplu bir şekilde sindirim sisteminden atılmalarının sağlanması, patojenlerin enzim aktivitelerinin düşürülmesi ve toksinlerin nötralizasyonu şeklinde olmaktadır. Literatürde bu etkilerin havyan modellerinde ve aynı zamanda klinik çalışmalarda da kullanıma uygun olduğu bildirilmektedir (3). IgY antikorlarının fiziksel ortamlardaki dayanıklılığını göstermek için yapılan çalışmalarda, ısıya karşı geniş bir aralıkta (0-70 °C) aktivitesini kaybetmediği, pH 3,5-11 değerlerinde aktivitesini koruduğu, 4000 kg/cm²'lik basınca dayandığı gösterilmiştir. IgY'nin insanlar için kullanılmasına FDA (Food and Drug Administration), GRAS (Generally Recognized As Safe) ve USDA (US. Department of Agriculture) gibi otoriteler de onay vermişlerdir (3). Çeşitli avantajları doğrultusunda IgY 'nin tıp ve veterinerlikte tedavi ve koruma amacıyla kullanılmıştır. Çocuk bağırsak enfeksiyonlarının önlenmesinde ve *Helicobacter pylori* enfeksiyonlarının tedavisinde başarılı sonuçlar elde edilmiştir (5). Diş çürüklerinin önlenmesinde anti-*Streptococcus mutans* IgY içeren ağız çalkantı sularının kullanılması etkili bulunmuştur (6). Kistik fibrozis hastalarında anti-*P. aeruginosa* IgY içeren ağız çalkantı suyu ile ağız çalkaması uygulandığında, hastalarda kronik *P. aeruginosa* enfeksiyonlarının sıklığında azalma olduğu tespit edilmiş ve antibiyotik kullanımının sınırlandırılmasında yararlı olduğu belirtilmiştir (5, 7). Deneysel çalışmalarda da *S. aureus* ve *Escherichia coli*'ye karşı IgY 'nin bakteri üremesini inhibe ettiği gösterilmiştir (8). Ayrıca veterinerlik alanında köpeklerde parvovirüs, rotavirüsler ve coronavirus enfeksiyonlarının

tedavisinde IgY antikorunun kullanımında olumlu sonuçlar elde edilmiştir (1).

IgY uygulamaları biyomedikal araştırmalarda da kullanılmaktadır. IgY-bazlı immünoanalizler, proteinlerin veya peptidlerin konsantrasyonlarının ELISA ile ölçülmesi ve klinik kimya çalışmalarında da kullanılmıştır (1, 2). IgY antikorları, viral, bakteriyel, evcil hayvanlarda bağırsak parazitleri ve bitki antijenlerinin tespiti için ve gıdalarda toksinleri saptamak amacıyla yapılan araştırmalarda da kullanılmıştır (2).

Çalışmamızda, nozokomiyal pnömoni etkeni olarak sık tanımlanan *S. aureus*, *K. pneumoniae* ve *P. aeruginosa* bakterilerine karşı oluşan IgY antikorlarının eldesi ve bu antikorların etkinliğinin ELISA yöntemiyle araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bakterilerin kültürlerinin yapılması ve antijen elde edilmesi

Bu çalışma 01.07.2018-30.01.2019 tarihlerinde gerçekleştirildi. Çalışmamızda *S. aureus* ATCC 6538, *P. aeruginosa* ATCC 27853 ve *K. pneumoniae* ATCC 13883 bakterileri kullanıldı. Boncuklu saklama tüplerinde (Mikrobank, ABD) -20 °C'de saklanan bakteriler oda sıcaklığında çözüldü ve biyogüvenlik kabininin içinde steril ortamda kanlı besiyerine (%5 koyun kanlı agar) ekim yapıldı. Ekim yapılan plaklar 37 °C'de gece boyunca etüvde inkübe edildi. Üreyen koloniler 1 ml PBS (Phosphate Buffer Solüsyonu) içeren tüplere aktarıldı. Bakteri süspansiyonu içeren tüpler 3000 rpm 'de 20 dakika santrifüj edilerek süpernatant kısmı atıldı ve yıkama işlemi PBS ile üç defa tekrarlandı. Bakteri inaktivasyonu kuru ısıtıcıda 650 °C'de 35 dakika bekletilerek gerçekleştirildi. İşlem sonrası oluşan artıkları uzaklaştırmak amacıyla 9000 rpm 'de 20 dakika santrifüj yapıldı ve süpernatant kısmı atıldı. Tüplerin dibinde kalan pelletin üzerine 500 µl PBS eklenerek protein miktarı 0,5 mg/ml olacak şekilde nanodrop spektrofotometrede (Thermo, ABD) ayarlandı ve immunizasyon için kullanıldı (9).

Tavuklar ve İmmünizasyon

Çalışmamızda, 22 haftalık Lohmann Brown cinsinden 11 adet tavuk kullanıldı. Bu çalışma için gerekli hayvan etik kurulu izni alındı (tarihi 27/06/2018 ve karar no:2018/23). Her bakteri için üçer ve iki adette negatif kontrol olacak şekilde toplam 11 adet tavuk kullanıldı. *S. aureus*, *P. aeruginosa* ve *K. pneumoniae*'den hazırlanan 0,5 mg/ml antijen ve aynı hacimde Freund's tamamlanmış (complete) adjuvanı ile toplam 500 µl olacak şekilde insülin enjektörü kullanılarak tavukların sağ ve sol göğüs kaslarına iki farklı yere immünizasyon yapıldı (Şekil 3). Hatırlatma immünizasyonları iki hafta aralıkla dört kere 0,5 mg/ml antijen ile Freund's tamamlanmamış (incomplete) adjuvanı kullanarak yapıldı. İmmünize edilen ve edilmeyen tavuklardan 35. günden itibaren yumurtalar iki ay boyunca toplandı (1yumurta/gün). Yumurtalar günlük olarak etiketlenip +40 °C'de saflaştırma işlemine kadar muhafaza edildi (10).

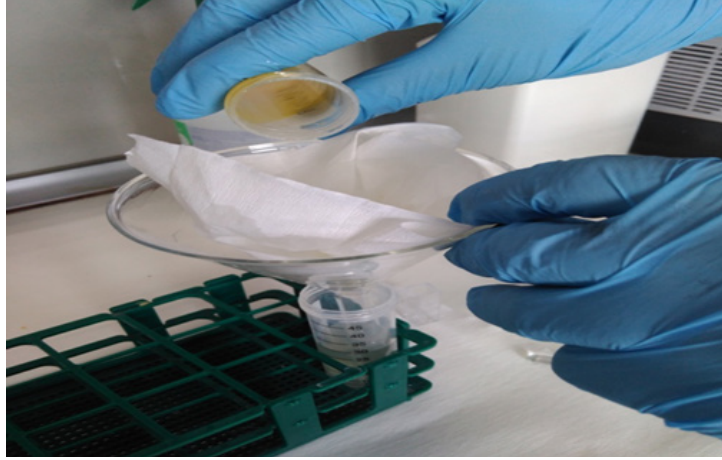
IgY antikorlarının elde edilmesi ve saflaştırılması

İmmünize edilen ve edilmeyen tavuklardan toplanan yumurtalar %70' lik alkol ile dezenfekte edildikten sonra kırılarak sarısı ile beyaz kısmı ayrıldı. Yumurtanın sarı kısmı 50 ml'lik tüplere aktarıldı ve tüpteki son hacmin üzerine iki kat PBS eklendi. Bu

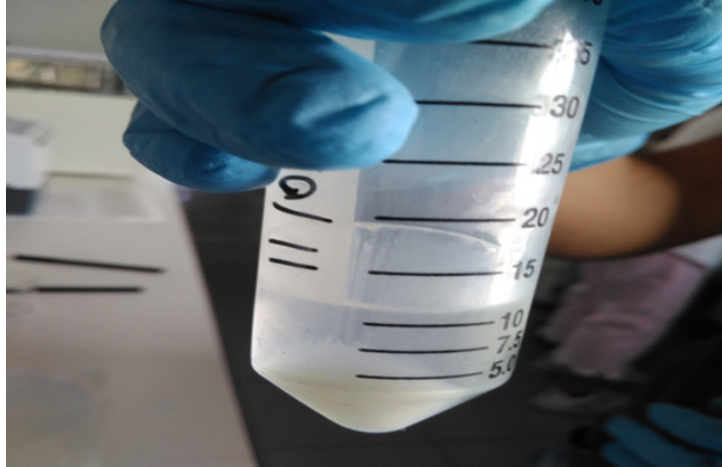
işlem her yumurta için ayrı ayrı yapıldı. Tüplerdeki son hacmin üzerine toz halinde Polyethylene glycol (PEG) (Merck, Almanya) 6000'den gram olacak şekilde %3,5 oranında eklenerek dönen silindir mikserde (roller mixer) (Stuart, İngiltere) karıştırıldı. Son karıştırma işleminden sonra tüpler ultrasantrifüj (Thermo, ABD) ile 13000g, +40 °C'de 20 dakika boyunca santrifüj edildi ve işlem sonrası üst kısımda oluşan süpernatant kağıt filtreye filtrasyon yapılarak başka bir tüpe aktarıldı (Şekil 4). Son hacmin üzerine %8,5 ağırlığında PEG 6000 ilave edildi ve tekrar 13000g, +40 °C'de 20 dakika santrifüj işlemi uygulandı (Şekil 5). Bu işlem sonrası tüplerdeki süpernatant atıldı, dipte kalan pellet 1 ml PBS içerisinde çözündürüldü. Pelletin üzerine PBS ilave edilerek son hacim 10 ml olacak şekilde tamamlandı ve üzerine %12 ağırlığında PEG 6000 eklenip yukarıda belirtilen aynı hız ve koşullarda santrifüj edildi. Tekrar süpernatant atıldı, son pellet 800 µl PBS içerisinde çözündürüldü, mikrodializ kapsülüne (QuixSep, ABD) eklendi ve kapsül distile su içinde hazırlanan %0,1 NaCl çözeltisinde manyetik karıştırıcıda (Heidolph MR 3000, Almanya) gece boyu diyalize tabi tutuldu. İzole edilen IgY antikorlarının protein konsantrasyonu nanodrop spektrofotometre ile (Thermo, ABD) 280 nm'de ölçüldü (Şekil 6) (11, 12).



Şekil 3. Hazırlanan bakteri antijenleri ile tavukların immünizasyonu



Şekil 4. Kağıt filtreyle filtrasyon



Şekil 5. Filtrasyon sonrası süpernatant ve PEG 6000 karışımı



Şekil 6. Mikrodiyaliz kapsülüne antikor süspansiyonunun eklenmesi

ELISA yöntemi ile IgY antikorlarının etkinliğinin belirlenmesi

ELISA çalışmasında kullanılan solüsyonlar:

Kaplama solüsyonu; 200 ml distile suya 0,318 g sodyum karbonat (Na₂CO₃), 0,586 g sodyum bikarbonat (NaHCO₃) ve 0,04 g sodyum azide (Na₂N₃) eklenerek pH: 9,6 olacak şekilde hazırlandı.

Phosphate Buffer Solüsyonu (PBS): piyasada ticari olarak bulunan PBS tabletlerinden (Sigma Aldrich, ABD) (1 tablet/100 ml distile su) pH:7,4 olacak şekilde hazırlandı.

PBS/Tween20; hazır PBS çözeltisine %0,05 (v/v) olacak şekilde Tween20 ilave edilerek hazırlandı.

Bovine Serum Albumin (Sigma Aldrich, ABD) (BSA) çözeltisi; toz şeklinde bulunan BSA 'den 4,83 mg tartılarak 1 ml PBS solüsyonu içerisinde hazırlandı.

Bloklama Tamponu; 12 ml PBS/Tween20 solüsyonuna BSA çözeltisinden 12 µl eklenerek hazırlandı.

Substrat Çözeltisi; paranitrofenil fosfat (Sigma Aldrich, ABD) (pNPP) içeren tabletlerden 10 ml distile su içine bir tane tablet konularak 10 dakika mikserde karıştırılarak hazırlandı.

Antijen Hazırlaması: Kanlı agarda üreyen bakteri kültürlerinden steril eküvyonla 3-5 koloni alınarak 1 ml PBS içeren tüplere aktarıldı ve 3000 rpm 'de 20 dakika santrifüj edilerek yıkama işlemi yapıldı. Süpernatant atılıp yıkama işlemi tekrarlandı. Pelletin üzerine 1 ml PBS eklendi ve bakterileri parçalamak için beş kez sıvı nitrojende dondurulup 37°C'lik su banyosunda çözüldü. Hücre artıklarını uzaklaştırmak amacıyla antijen içeren tüpler 9000 rpm'de 20 dakika santrifüj edildi ve üstteki berrak kısım (antijen) toplandı. Toplanan antijenin, kaplama solüsyonu içindeki son konsantrasyon 1-2 µg/100 µl protein (antijen) olacak şekilde hazırlandı ve ELISA plağının her kuyusuna kuyu başına 100µl eklenip +4°C'de gece boyu inkübe edildi. Plaklar PBS /Tween20 ile üç defa yıkandı, her kuyuya 100µl bloklama solüsyonu eklenerek 37°C'de

1 saat inkübe edildi. Tekrar üç defa PBS/Tween 20 ile yıkanan plaklar oda ısısında kuruduktan sonra tekrar kullanılabildiği kadar -20°C'de saklandı.

Testin Çalışılması: Tüm yumurtalardan izole edilen IgY antikorlarının PBS/Tween20 içinde 1/100, 1/1000 ve 1/10000 seri dilüsyonları hazırlandı. Her dilüsyon için dört kuyucuk kullanıldı. Bakteri antijenleri ile kaplı ELISA plaklarındaki kuyulara antikor dilüsyonlarından 100µl ilave edildi. Plaklar etüvde 1 saat inkübe edildikten sonra PBS/Tween20 ile üç defa yıkandı. Yıkama ardından 1:1000 olarak sulandırılan HRP (horseradishperoxidase) ile konjuge edilmiş keçi anti-tavuk IgY (Sigma Aldrich, ABD) sekonder antikorlarından her kuyuya 100µl eklendi. Plaklar etüvde 1 saat inkübe edildikten sonrası PBS/Tween20 ile beş kez yıkama yapıldı. Yıkama işleminden sonra her kuyuya substrat tamponundan 100 µl eklendi ve 30-45 dakika oda ısısında karanlık ortamda inkübe edildi. ELISA plaklarında oluşan renk değişimi 405 nm dalga boyunda spektrofotometrede (Thermo, ABD) ölçüldü (10, 13, 14).

Cutoff Değerinin Hesaplanması: İmmunize edilmeyen tavuk yumurtalarından izole edilen IgY antikorlar ile elde edilen OD'nin ortalaması +2X SD (ODC) şeklinde hesaplandı.

İstatistiksel Analiz: İmmunize edilen ve edilmeyen tavuklardan elde edilen IgY antikorlarının OD değerlerinin karşılaştırılması için gerekli istatistiksel analizler Statistical Packages of Social Sciences (SPSS, version 20.0 for Windows) bilgisayar programında Mann-Whitney U testi kullanarak yapıldı ve p<0,05 değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

S. aureus, *K. pneumoniae* ve *P. aeruginosa* bakteri antijenleri ile immunize edilen ve edilmeyen tavuk yumurtalarından izole edilen IgY antikorlarının miktarı nanodrop spektrofotometre 280 nm'de ölçüldü (Tablo 1).

IgY antikorlarının her iki dilüsyonunda da (1/100 ve 1/1000) ELISA metodu ile saptanan OD değerleri karşılaştırıldığında; immunize edilen tavukların IgY OD değerlerinin hesaplanan cutoff değerinin üzerinde olduğu saptandı (Tablo 2 ve Şekil 7-9).

Çalışmamızda immunize edilen tavuklardan izole

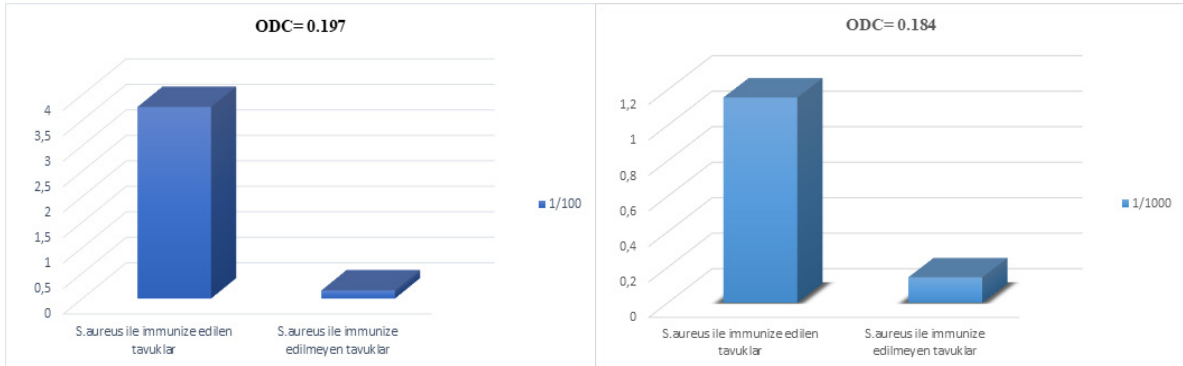
edilen IgY antikorlarının hem 1/100 dilüsyonda hem de 1/1000 dilüsyondaki OD değerlerinin immunize edilmeyen tavuk yumurtalarından izole edilen OD 'lerle karşılaştırılması sonucunda her iki dilüsyonda da OD değerlerinin istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösterdiği saptanmıştır.

Tablo 1. Çalışmamızda kullanılan bakterilere karşı elde edilen IgY antikor düzeyleri

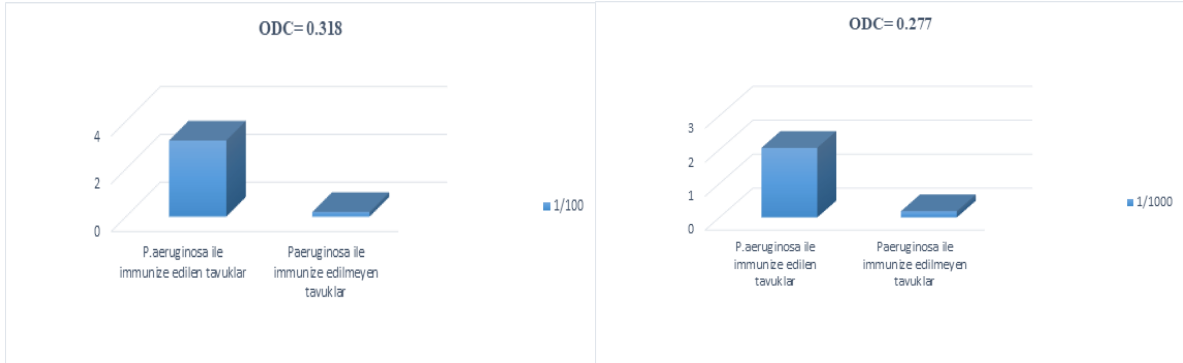
Bakteriler	mg/ml
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	14.63
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	3.70
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 13883	1.33
Negatif kontrol (immunize edilmeyen)	0.93

Tablo 2. Çalışmamızda kullanılan bakterilere karşı elde edilen IgY antikorunun farklı dilüsyolardaki OD, ODC ve P değerleri

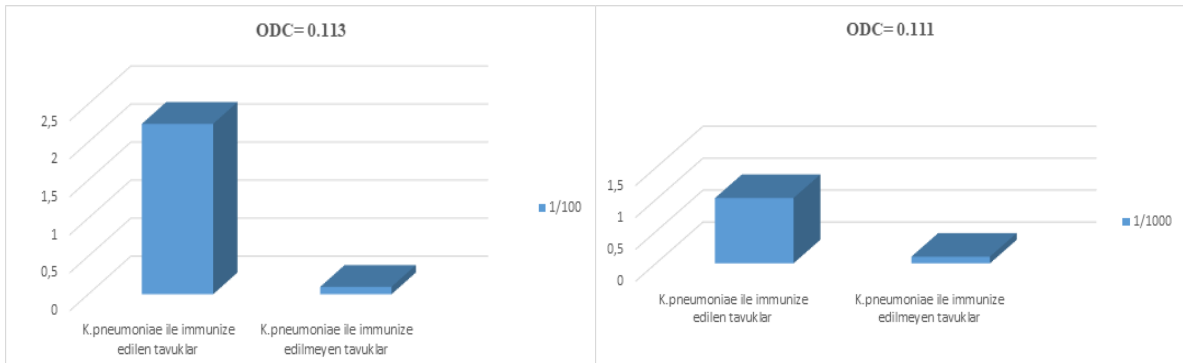
Antikorlar		OD	Cutoff (ODC)	P değeri
Anti- <i>S. aureus</i> IgY	1/100 dilüsyon	3.76	0.197	p<0,001
	1/1000 dilüsyon	1.156	0.184	p<0,001
Anti- <i>P. aeruginosa</i> IgY	1/100 dilüsyon	3.19	0.318	p<0,001
	1/1000 dilüsyon	2.05	0.277	p<0,001
Anti- <i>K. pneumoniae</i> IgY	1/100 dilüsyon	2.24	0.113	p<0,001
	1/1000 dilüsyon	1.022	0.111	p<0,001



Şekil 7. *S. aureus* ile immunize edilen ve edilmeyen tavuklardan elde edilen IgY antikor (1/100 ve 1/1000 dilüsyonlardaki) OD değeri



Şekil 8. *P. aeruginosa* ile immunize edilen ve edilmeyen tavuklardan elde edilen IgY antikor (1/100 ve 1/1000 dilüsyonlardaki) OD değeri



Şekil 9. *K. pneumoniae* ile immunize edilen ve edilmeyen tavuklardan elde edilen IgY antikor (1/100 ve 1/1000 dilüsyonlardaki) OD değeri

TARTIŞMA

Son yıllarda tavuklardan elde edilen IgY antikorlarının tanıda kullanımı, memelilerden elde edilen IgG antikorlarına göre sağladığı avantajlar sayesinde oldukça ilgi çekmektedir. IgY antikorunun ucuz, pratik ve yüksek miktarlarda elde edilebilmesi, antikora dayalı tanı kitlerinin üretiminin maliyetini düşürebilecektir (15, 16). IgY antikorlarının fiziksel ortamlardaki dayanıklılığını göstermek için yapılan çalışmalarda, ısıya karşı geniş bir aralıkta (0-70°C) aktivitesini kaybetmediği, 3,5-11 pH değerlerinde aktivitesini koruduğu, 4000 kg/cm²'lik basınca dayandığı gösterilmiştir (5). Yapısal farklılıkları değişik moleküler ve biyokimyasal etkileşimlere de neden olmaktadır. Birçok immunglobulinin biyolojik fonksiyonu Fc bölgesi ile aktive edilmektedir ve bu bölge IgG ve IgY'nin temel yapısal farkının olduğu kısımdır (2). Bu nedenle IgY'nin Fc-bağımlı fonksiyonları da memeli IgG'sinden farklıdır. IgY komplemanı aktive etmemekte, stafilokokal A ve G proteinlerine bağlanmamakta, romatoid faktör gibi memeli antikorlarını tanımamakta ve hücre yüzeyinde bulunan Fc reseptörlerine bağlanmamaktadır (2). Bunun yanında moleküler etkileşimdeki farklılıkları IgY'nin farklı biyoteknolojik ve tıbbi uygulamalarda kullanımını avantajlı hale de getirmiştir (2). Bu özellikleri ile IgY antikorun stabilitesi IgG'den çok daha yüksektir (2, 15). Tavuk IgY'sinin daha yüksek glikolizasyon indeksine sahip olması, horse radish peroxidase ve diğer antikor işaretleyiciler ile daha yüksek afinite ile konjugasyonuna izin vermektedir (15, 17).

Literatürde bu özelliklerin havyan modellerinde ve aynı zamanda klinik çalışmalarda da kullanıma uygun olduğu bildirilmektedir. Bu avantajları doğrultusunda IgY'nin tıp ve veterinerlikte tedavi ve korunma amacıyla çeşitli çalışmalarda kullanıldığı görülmektedir (2, 18).

Nozokomiyal enfeksiyonlar arasında, nozokomiyal hava yolu enfeksiyonları morbidite ve mortalite açısından önemli sorun oluşturmaktadır. Son yıllarda gram negatif bakteriler arasında *Pseudomonas*

türlerinin nozokomiyal hava yolu enfeksiyonlarına ve buna bağlı morbidite ve mortaliteye en çok neden olan bakteri olarak saptandığı görülmektedir (19). *Pseudomonas*'lar en sık mekanik ventilasyon desteğindeki hastalarda ve kistik fibrozisli hastaların akut alevlenmelerinde görülen pnömonilere neden olmaktadır (20). Nozokomiyal enfeksiyonların en sık etkenlerinden biri olan MRSA (Metisilin Dirençli *Staphylococcus aureus*) suşlarının esas kaynağı enfekte veya kolonize hastalar ile birlikte sağlık personelidir (21). *Staphylococcus aureus*, antifagositik kapsül kullanarak, hücre duvarında bulunan protein A ve G ile antikorları Fc bölgesinden bağlayarak ve antijen maskeleyerek gibi immün sisteminden kaçış mekanizmalarını kullanmaktadır (22). Hava yoluyla bulaş, yoğun bakım servislerinde pnömoni olgularında ve yanık ünitesi birimlerinde önem kazanmaktadır (21) *Klebsiella pneumoniae*, yoğun bakım servislerindeki olgularda pnömoniyeye neden olan diğer bir etkidir. *Klebsiella* pnömonisi genellikle üst solunum yollarında kolonize olmuş bakterilerin aspirasyonu sonucu oluşmaktadır. *Klebsiella* pnömonisi gram negatif bakteri pnömonileri arasında az görülmesine rağmen mortalitesi diğer gram negatif bakteri enfeksiyonlarına göre iki kat daha fazladır (23).

Çalışmamızda immunize edilen tavuklardan izole edilen IgY antikorlarının hem 1/100 dilüsyonda hem de 1/1000 dilüsyondaki OD değerlerinin, immunize edilmeyen tavuk yumurtalarından izole edilen OD'ler ile karşılaştırılması sonucunda her iki dilüsyonda da OD değerlerinin istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösterdiği saptanmıştır. Bu bulgu yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlarla uyumluluk göstermektedir. Tobias ve ark. (24) yaptıkları çalışmada, *S. aureus* ile immunize edilen ve edilmeyen deve kuşlarının yumurtalarından izole ettikleri spesifik anti-*S. aureus* IgY ve non spesifik IgY antikorlarını beyin-kalp infizyon buyyonda *S. aureus* ile 37°C'de dört saat inkübasyon sonrası katı besiyerine ekim yapmışlardır. Sonuç olarak immunize edilmiş deve kuşlarından izole edilen antikorların bakteri üremesini inhibe ettiği saptanmıştır ve yumurtadan izole edilen antikorların tedavi için kullanımının ümit verici olduğu

belirtmiştir. Thomsen ve ark. (5) yaptıkları çalışmada, kistik fibrozis hastalarında anti-*P. aeruginosa* IgY içeren ağız çalkantı suyu ile ağız çalkaması uygulandığında kistik fibrozis hastalarında kronik *P. aeruginosa* enfeksiyonlarının önlenmesinde etkili olduğu tespit edilmiş ve antibiyotik kullanımının sınırlandırılmasında yararlı olacağı belirtilmiştir. Bir diğer çalışmada ise IgY antikorlarının *Salmonella* türlerinin üremesi üzerine etkisi araştırılmıştır. *Salmonella* spp ile immunize edilen ve edilmeyen tavukların yumurtasından saflaştırılmış spesifik anti-*Salmonella* spp IgY ve non spesifik IgY antikorları *S. enteritidis* ve *S. typhimurium* ile triptik soya buyyon 37°C'de 4-6 saat inkübasyon sonrası katı besiyerine ekilmiştir. Sonuç olarak immunize edilmiş tavuklardan izole edilen antikorların bakteri üremesini anlamlı düzeyde inhibe ettiği saptanmıştır (25, 26). Uma ve ark. (27) çalışmalarında mastitli sığırlardan izole edilen *K. pneumoniae* ile hazırladıkları antijen süspansiyonuyla immunize ettikleri tavuklardan anti-IgY *K. pneumoniae* antikorlarını izole etmişlerdir. Tavukların düzenli aralıklarla immunize edilmesinin spesifik IgY antikor oluşumunu 1/10000 dilüsyona kadar artırdığı indirek ELISA yöntemi ile gözlemlenmiştir. Elde edilen antikorların *K. pneumoniae* üzerindeki üreme inhibisyon etkisi araştırılmıştır. Todd Hewitt buyyonunda özgül anti-*K. pneumoniae* IgY antikorlarının farklı konsantrasyonlarında (1-5µg/ml), *K. pneumoniae* ile birlikte 37°C'de bir gece inkübasyonu sonrası nutrient agar'a ekim yapılmış ve tekrar 37°C'de bir gece inkübasyona bırakılmıştır. Kullanılan anti-*K. pneumoniae* IgY konsantrasyonlarından 3µg/ml düzeyi bakteri üreme inhibisyonunun tamamen gerçekleştiği en etkili düzey olarak saptanmıştır. Araştırmacılar

IgY antikorlarının sığır mastitlerinin tedavisinde kullanılabileceği sonucuna varmışlardır. Kosugi ve ark. (28) ise devekuşundan izole edilen anti-influenza IgY antikorlarını kullanarak biyofiltre geliştirmişlerdir. Geliştirdikleri filtre üzerine influenza virüsü püskürtülmüş ve virüslerin % 99.99'nun 10 dakika içinde filtrede tutulduğu saptanmıştır. LeClaire ve ark. (29) stafilkokal entrotoksin B'ye karşı IgY elde etmişler ve yüksek toksisitesi olan toksin ile fare ve rheus maymunlarının temasından 20 dakika önce ve 4 saat sonra uyguladıkları antikorların tam koruma sağladığını tespit etmişlerdir. Bu çalışma pasif immunizasyonda da IgY'nin etkili olduğunu göstermiştir.

Sonuç olarak, araştırmamızda, üç bakteriyel etkenle (*S. aureus*, *P. aeruginosa* ve *K. pneumoniae*) immunize edilen tavuklardan elde edilen IgY antikorlarının, immunize edilmeyen tavuklardan izole edilen antikorlarına göre ELISA yönteminde saptanan OD değerlerinin daha yüksek olduğu istatistiksel olarak belirlenmiştir. Elde edilen bu bulgular; çalışmamızda kullandığımız bakterilerle gelişecek enfeksiyonların hızlı tanısı için ticari tanı testlerinin üretilmesi, yoğun bakım ünitelerinde gelişecek nozokomiyal enfeksiyonların önlenmesi amacıyla hava filtrelerinin üretilmesi, riskli hastalar için koruyucu amaçlı ürünlerin (ağız çalkantı suyu, topikal solüsyonlar) ve pasif immunizasyon uygulamalarının geliştirilmesi için ümit verici olmuştur.

IgY antikorların elde edilmesinin hızlı, düşük maliyetli ve pratik olması nedeniyle gelecekte bilimsel araştırma, tanı ve immun tedavi amacıyla IgY antikorlarının etkin olarak kullanılabileceği düşüncesine varılmıştır.

KAYNAKLAR

- Schade R, Terzolo H, editors. IgY-technology: application and trends. World's Poultry Science Association (WPSA) -12th European Poultry Conference, Verona, Italy, 10-14 September; 2006: 10080
- Narat M. Production of antibodies in chickens. Food Technol Biotechnol, 2003;41(3):259-67.
- Rahman S, Van Nguyen S, Icatlo Jr FC, Umeda K, Kodama Y. Oral passive IgY-based immunotherapeutics: a novel solution for prevention and treatment of alimentary tract diseases. Hum Vaccin Immunother, 2013; 9 (5): 1039-48.
- Xu Y, Li X, Jin L, Zhen Y, Lu Y, Li S, et al. Application of chicken egg yolk immunoglobulins in the control of terrestrial and aquatic animal diseases: a review. Biotechnol Adv, 2011; 29 (6): 860-8.

5. Thomsen K, Christophersen L, Bjarnsholt T, Jensen PØ, Moser C, Høiby N. Anti-Pseudomonas aeruginosa IgY antibodies augment bacterial clearance in a murine pneumonia model. *J Cyst Fibros*, 2016; 15 (2): 171-8.
6. Nguyen SV, Icatlo Jr FC, Nakano T, Isogai E, Hirose K, Mizugai H, et al. Anti-cell-associated glucosyltransferase immunoglobulin Y suppression of salivary mutans streptococci in healthy young adults. *J Am Dent Assoc*, 2011; 142 (8): 943-9.
7. Nilsson E, Larsson A, Olesen HV, Wejåker PE, Kollberg H. Good effect of IgY against Pseudomonas aeruginosa infections in cystic fibrosis patients. *Pediatr Pulmonol*, 2008; 43 (9): 892-9.
8. Kovacs-Nolan J, Mine Y. Passive immunization through avian egg antibodies. *Food Biotechnol*, 2004; 18 (1): 39-62.
9. Kollberg H, Carlander D, Olesen H, Wejåker PE, Johannesson M, Larsson A. Oral administration of specific yolk antibodies (IgY) may prevent Pseudomonas aeruginosa infections in patients with cystic fibrosis: a phase I feasibility study. *Pediatr Pulmonol*, 2003; 35 (6): 433-40.
10. Asadian F, Nikbakht, Gh.R, Nikbakht GR, Tajbakhsh H, Jahantigh M, Niazi Shahraki S, Madadgar O. Development and ELISA-based detection of anti-M2e IgY antibodies using an encoding plasmid for M2e-Hsp70 C-terminal gene. *I J V M*, 2012; 6 (2): 67-71.
11. 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; 8: 113-24.
12. Pauly D, Chacana PA, Calzado EG, Brembs B, Schade R. IgY technology: extraction of chicken antibodies from egg yolk by polyethylene glycol (PEG) precipitation. *J Vis Exp*, 2011; (51): e3084.
13. He J, Hu J, Thirumalai D, Schade R, Du E, Zhang X. Development of indirect competitive ELISA using egg yolk-derived immunoglobulin (IgY) for the detection of Gentamicin residues. *J Environ Sci Health B*, 2016; 51 (1): 8-13.
14. Yamada K, Wanchun J, Ohkura T, Murai A, Hayakawa R, Kinoshita K, et al. Detection of methicillin-resistant Staphylococcus aureus using a specific anti-PBP2a chicken IgY antibody. *Jpn J Infect Dis*, 2013; 66 (2): 103-8.
15. Hodek P, Stiborová M. Chicken antibodies-Superior alternative for conventional immunoglobulins. *Proc. Indian Natn Sci Acad*, 2003; 69 (4): 461-8.
16. Sim JS, Nakai S. Egg uses and processing technologies: new developments. England: Walingford Oxen Cab International; 1994.
17. Larsson A, Bålöv R-M, Lindahl TI, Forsberg P-O. Chicken antibodies: taking advantage of evolution—a review. *Poult Sci*, 1993; 72 (10): 1807-12.
18. Sun S, Mo W, Ji Y, Liu S. Preparation and mass spectrometric study of egg yolk antibody (IgY) against rabies virus. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2001; 15 (9): 708-12.
19. Klockgether J, Tümmler B. Recent advances in understanding Pseudomonas aeruginosa as a pathogen. *F1000Research*, 2017; 6.
20. Yaman G, Çıkman A, Parlak M, Güdücüoğlu H, Berktaş M, Van Dalı TMA, et al. Nozokomiyal Kökenli Pseudomonas aeruginosa İzolatlarında Metallo-Beta-Laktamaz Sıklığı. *Türk Mikrobiyol Cem Derg*, 2014; 44 (4): 139-143.
21. Biçer AT. Hastane İzolatı Staphylococcus aureus ve Koagülaz Negatif Staphylococcus Suşlarında Metisilin Direncinin Farklı Yöntemlerle Araştırılması. Uzmanlık Tezi, Tıp Fakültesi Çukurova Üniversitesi, 2009.
22. Rasigade J-P, Vandenesch F. Staphylococcus aureus: a pathogen with still unresolved issues. *Infect Genet Evol*, 2014; 21: 510-4.
23. Ödemiş İ, Köse Ş, Ersan G, Çelik D, Akbulut İ. Hastanede yatan hastaların klinik örneklerinden izole edilen enterokok suşlarının antibiyotik duyarlılıklarının değerlendirilmesi. *Türk Hij Den Biyol Derg*, 2018; 75 (4): 345-352.
24. Tobias FL, Garcia LNN, Kanashiro MM, Medina-Acosta E, Brom-de-Luna JG, Almeida CMcd, et al. Growth inhibition of Staphylococcus aureus and Escherichia coli strains by neutralizing IgY antibodies from ostrich egg yolk. *Braz J Microbiol*, 2012; 43 (2): 544-51.
25. Yegani M, Korver D. Are egg yolk antibodies an alternative to antibiotics. *Worlds Poult Sci J*, 2007; 23 (5): 22-5.
26. Lee E, Sunwoo H, Menninen K, Sim J. In vitro studies of chicken egg yolk antibody (IgY) against Salmonella enteritidis and Salmonella typhimurium. *Poult Sci*, 2002; 81 (5): 632-41.
27. Uma M, Dinesh M, Anjali V, Rechana R, Meenatchisundaram S, Shanmugam V. Purification and characterization of chicken egg yolk antibodies (IgY) against mastitis-causing Klebsiella pneumonia. *Eur J Biol Res*, 2012; 4 (2): 35-9.
28. Kosugi T, Kusano T, Takeno K, Iwanaga H, Kamiyama Y. Development of “Antibacterial Properties and an Antiviral Multifunctional Bio-filter” and the Air Purification System “Living Space Purifier KPD1000”. *FujiFilm Research and Development*, 2009; 57: 18-23
29. LeClaire RD, Hunt RE, Bavari S. Protection against bacterial superantigen staphylococcal enterotoxin B by passive vaccination. *Infect Immun*, 2002; 70 (5): 2278-81.