تولید آغوز (کلستروم) فوق ایمن در گاو برعلیه استرپتوکوک‌های دخیل در پوسیدگی دندان و سنجش تأثیر آن بر رشد و تشکیل بیوفیلم این باکتری‌ها

فاطمه رمضانعلی‌زاده[۱]- اعظم علی‌اصغری[۱]- محمد ربانی خوراسگانی[۲†]- دکتر مریم خروشی[۳]- دکتر آرزو طهمورث پور[۴]- احمدرضا جباری[۵]

۱- کارشناس ارشد میکروبیولوژی، گروه آموزشی زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

۲- دانشیار گروه آموزشی زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

۳- عضو مرکز تحقیقات مواد دندانی دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران؛ استاد گروه آموزشی دندانپزشکی ترمیمی و زیبایی، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۴- استادیار گروه آموزشی علوم پایه پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اصفهان (خوراسگان)، اصفهان، ایران

۵- عضو هیأت علمی موسسه تحقیقات و سرم سازی رازی، کرج، ایران

Evaluation of hyperimmune colostrum production in bovine against cariogenic streptococci and its impact on growth and bacterial biofilm formation

Fateme Ramezanalizadeh[1], Azam Aliasghari[1], Mohammad Rabbani Khorasgani[2†], Maryam Khoroushi[3], Arezoo Tahmourethpour[4], Ahmad Reza Jabbari[5]

1- MSc Student, Department of Biology, School of Biology, University of Isfahan, Isfahan, Iran

2†- Associate Professor, Department of Biology, School of Sciences, University of Isfahan, Isfahan, Iran (m.rabbani@biol.ui.ac.ir)

3- Professor, Dental Materials Research Center; Department of Operative Dentistry, School of Dentistry, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

4- Assistant Professor, School of Basic Medical Sciences, Islamic Azad University, Isfahan (Khorasgan) Branch, Isfahan, Iran

5- Department of Anaerobic Vaccine Production, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Karaj, Iran

Background and Aims: Dental caries is the most common infectious diseases. Among the oral bacteria, Streptococcus mutans and Streptococcus sobrinus are considered as the main causes of tooth decay. The aim of this study was to evaluate the production of hyperimmune bovine colostrum containing specific antibodies against cariogenic bacteria and its antimicrobial effects on the growth and adhesion of Streptococcus mutans and Streptococcus sobrinus in the laboratory.

Materials and Methods: In this experimental study, three pregnant bovine immunized with killed antigens of strains of Streptococcus mutans, Streptococcus mutans with Streptococcus Sobrinus and Streptococcus sobrinus through intramuscular injections. After delivery, The colostrum samples were collected, and the changes of anti-streptococci antibodies titers in colostrum and serum were determined by agglutination. Also,their antimicrobial effects against the growth and adhesion of oral streptococci were surveyed by the microtiter plate method. Data were analysed by One-Wey ANOVA in SPSS software.

Results: The results showed that in hyperimmunized bovine , the antibodies titers against injected bacteria were from 1.1000 to 1.3000 in sera samples and from 1.320 to 1.1280 in whey of colostrum samples. Colostrum of hyperimmune cows reduced the attachment of Streptococcus mutans and Streptococcus Sobrinus about 69 and 43 percents, respectively and also, the low dilutions of it reduced bacterial growth.

Conclusion: According to the antibacterial effect immune colostrum on two strains of cariogenic bacteria in vitro, It appears that this material could be useful in the prevention and control of dental caries.

Key Words: Dental caries, Streptococcus mutans, Streptococcus sobrinus, Colostrum

Journal of Dental Medicine-Tehran University of Medical Sciences 2017;29(4):237-246

† مؤلف مسؤول: نشانی: اصفهان- خیابان هزار جریب- دانشگاه اصفهان- دانشکده علوم- گروه آموزشی زیست شناسی

تلفن: ۳۷۹۳۲۴۶۹ نشانی الکترونیک: m.rabbani@biol.ui.ac.ir

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-11-23]

چکیده

زمینه و هدف: پوسیدگی دندان از رایج‌ترین بیماری‌های عفونی است. در میان باکتری‌های دهانی استرپتوکوکوس موتانس و استرپتوکوکوس سوبرینوس به عنوان عوامل اصلی پوسیدگی دندان در نظر گرفته شده‌اند. هدف از این تحقیق تولید آغوز (کلستروم) فوق ایمن حاوی آنتی بادی‌های اختصاصی ضد باکتری‌های عامل پوسیدگی دندان در گاو و بررسی اثرات ضد میکروبی آن بر رشد و چسبندگی باکتری‌های دهانی در شرایط آزمایشگاه بود.

روش بررسی: در این تحقیق آزمایشگاهی، سه گاو باردار با آنتی‌ژن‌های کشته شده سویه‌های استرپتوکوکوس موتانس و استرپتوکوکوس سوبرینوس به تنهایی و استرپتوکوکوس موتانس توام با استرپتوکوکوس سوبرینوس، از طریق عضلانی ایمن شدند. پس از زایمان، کلستروم جمع‌آوری و تغییر مقدار آنتی بادی اختصاصی در سرم وکلستروم با روش آگلوتیناسیون بررسی شد. همچنین اثر ضد میکروبی آن روی رشد و چسبندگی باکتری‌های دهانی به روش میکروتیترپلیت بررسی شد. اطلاعات به دست آمده توسط آزمون One-Wey ANOVA در نرم‌افزار SPSS تحلیل شد.

یافته‌ها: در سرم گاوهای ایمن، آنتی بادی‌های ضد باکتری‌های تزریق شده بسته به مورد در رقت های ۱/۱۰۰۰ تا ۱/۳۰۰۰ و در آب آغوز (whey) در رقت‌های ۱/۳۲۰ تا ۱/۱۲۸۰ تشخیص داده شد. آغوز گاوهای ایمن سبب کاهش قدرت اتصال استرپتوکوکوس موتانس و استرپتوکوکوس سوبرینوس به ترتیب در روش اول به میزان ۶۹ و ۴۳ درصد در روش دوم به ترتیب ۳۸ و ۱۸ درصد شد که در روش اول در استرپتوکوکوس موتانس به طور معنی‌دار کاهش اتصال بیشتر از روش دوم است ($P<0/001$) و همچنین باعث کاهش رشد دو سویه از استرپتوکوکوس موتانس شدند ($P<0/05$).

نتیجه‌گیری: با توجه به تأثیر ضد باکتریایی کلستروم ایمن شده بر روی دو سویه از مهم‌ترین باکتری‌های عامل پوسیدگی دندان در شرایط آزمایشگاهی، به نظر می‌رسد این ماده بتواند در پیشگیری و کنترل پوسیدگی دندان مفید باشد.

کلید واژه‌ها: پوسیدگی دندان، استرپتوکوکوس موتانس، استرپتوکوکوس سوبرینوس، کلستروم

وصول:۹۵/۰۳/۰۵ اصلاح نهایی:۹۵/۱۰/۲۰ تأیید چاپ:۹۵/۱۰/۲۲

مقدمه

پوسیدگی دندان (Dental caries) به عنوان یک بیماری غیر قابل برگشت بافت کلسیفیه دندان تعریف می‌شود که به دلیل تعامل پیچیده بین میزبان، باکتری‌های تولید کننده اسید و کربوهیدرات رخ می‌دهد (۱).

استرپتوکوک‌های گروه موتانس به ویژه استرپتوکوکوس موتانس و استرپتوکوکوس سوبرینوس از عوامل اصلی ایجاد این بیماری در انسان‌ها شمرده شده‌اند (۲). با توجه به اهمیت این بیماری، به منظور کنترل پوسیدگی دندان روش‌های مختلفی به کار رفته است ولی با توجه به هزینه بالا و عدم دستیابی به کنترل کامل آن امروزه استراتژی‌های جدید برای مقابله با پوسیدگی دندان مطرح شده که ایمن‌سازی، استفاده از گیاهان دارویی و استفاده از پروبیوتیک‌ها از این موارد هستند (۳). تولید آنتی بادی بر ضد باکتری‌ها یا اجزا و مواد بیماری‌زای آن‌ها در کنترل تعداد زیادی از بیماری‌ها نقش اصلی دارد. از آنتی بادی‌ها در دو شکل ایمن سازی فعال و غیر فعال (Active and passive immunity) برای کنترل بیماری‌ها استفاده می شود (۳،۴). کاربرد روش ایمن‌سازی فعال برای کنترل پوسیدگی دندان به خاطر اثرات جانبی و واکنش متقاطع آنتی بادی‌های تولید شده با بافت قلب با محدودیت‌هایی مواجه شده است (۵،۶). روش ایمن‌سازی غیرفعال برضد پوسیدگی دندان دیدگاهی نوید بخش در جلوگیری از بروز این بیماری است و به عنوان روشی سالم در نظر گرفته شده است (۷). در این زمینه، استفاده از آنتی بادی‌های IgY موجود در زرده تخم مرغ، پلانتی بادی، شیر و کلستروم گاو ایمن شده، آنتی بادی‌های مونوکلونال تولید شده در محیط کشت و آنتی بادی‌های نوترکیب تولید شده توسط باکتری‌های ترانسژنیک مطرح شده است (۸).

شیری که در طی روزهای اولیه بعد از زایمان ترشح می شود آغوز یا کلستروم (Colostrum) نامیده می‌شود. کلستروم منبعی غنی از مواد غذایی ، آنتی بادی‌ها، مواد معدنی، ویتامین‌ها، مواد زیست فعال و فاکتورهای رشد برای شیرخواراست (۹،۱۰). ترکیب کلستروم با شیر به خصوص در علفخواران از نظر کمی و کیفی نظیر حضور آنتی بادی‌ها تفاوت‌هایی دارد. هرچند کلستروم خود به خود منبعی غنی از آنتی بادی‌هاست ولی با ایمن کردن حیوان به یک باکتری بیماری‌زای خاص می‌توان انتظار تولید آنتی بادی‌های خاصی را در کلستروم داشت (۱۱).

فراورده‌های کلستروم حاوی ایمونوگلوبولین برای حیوانات به طور

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-11-23]

تجاری در تعداد زیادی از کشورها در دسترس هستند. همچنین بعضی از محصولات بر مبنای کلستروم به عنوان مکمل غذایی روزانه برای انسان‌ها در دسترس هستند. امروزه مطالعات کلینیکی در تعداد زیادی از کشورها برای بالا بردن پتانسیل محصولات شیر ایمن به عنوان تیمار پیشگیری کننده بر ضد عفونت‌های انسانی مخصوصاً عفونت‌هایی که توسط باکتری‌های مقاوم به آنتی بیوتیک ایجاد می‌شود در حال پیشرفت است (۱۲).

در مورد مقابله با پوسیدگی دندان هم تلاش‌های مختلفی با استفاده از انتقال آنتی بادی‌ها از راه دهان به منظور تغییر کلونیزاسیون باکتریایی انجام شده است. به طوری که Lehner و همکاران (۱۳) از آنتی بادی‌های مونوکلونال تولید شده برضد یک پروتئین سطحی استرپتوکوکوس موتانس به منظور کاهش غلظت این باکتری در دهان میمون‌های رزوس استفاده کردند. در این مطالعه استفاده مکرر از آنتی بادی‌ها گسترش پوسیدگی را متوقف کرد. در مطالعه‌ای دیگر از آنتی بادی‌های شیر گاو ایمن شده با استرپتوکوکوس موتانس به عنوان بخشی از رژیم غذایی در موش‌های رت با وضعیت میکربی شناخته شده نوتوبیوتیک (Gnotobiotic Rat) استفاده شد که این امر از کلونیزاسیون باکتری در حفره دهانی جلوگیری و منجر به کاهش پوسیدگی شد (۴). هم چنین مصرف فراورده‌های محتوی آنتی بادی مانند شستشو دهنده‌های دهانی در داوطلبان انسانی تعداد باکتری‌ها را در نمونه پلاک دندان انسانی کاهش داده است (۱۴).

با توجه به گستردگی این بیماری و نیاز به تولید محصولات زیستی سالم، هدف از انجام این تحقیق، تولید آغوز فوق ایمن بر ضد باکتری‌های مهم عامل پوسیدگی دندان و بررسی اثر ضد میکروبی کلستروم ایمن تولید شده بر باکتری‌های عامل پوسیدگی دندان در شرایط آزمایشگاه بود.

روش بررسی

تهیه

در این پژوهش دو سویه استاندارد استرپتوکوکوس موتانس ATCC35668 و استرپتوکوکوس سوبرینوس ATCC27607 از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران به صورت لیوفیلیزه خریداری شد. همچنین ۵ سویه استرپتوکوکوس موتانس جدا شده از پلاک افراد دارای پوسیدگی دندان از آزمایشگاه میکروب شناسی دانشکده دندانپزشکی دانشگاه آزاد آسلامی واحد خوراسگان اصفهان تهیه شد. برای تأیید سویه‌ها چند آزمایش شاخص گروه موتانس مثل آزمایش کاتالاز، رنگ آمیزی گرم، حساسیت به باسیتراسین و اپتوچین و تولید گلوکان خارج سلولی انجام شد (۱۵).

برای تهیه آنتی‌ژن، چند کلنی خالص باکتری‌های رشد یافته روی محیط (BHIA Quelab, Montreal, Canada) برداشته شد و به ۵۰۰ سی سی محیط BHIB (Quelab, Montreal, Canada) منتقل شد و بعد از ۴۸ ساعت گرمخانه گذاری در انکوباتور CO_2 5%، ارلن حاوی محیط کشت به مدت ۳۰ دقیقه در بن ماری با دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به منظور کشتن باکتری‌ها قرار داده شد. برای اطمینان از مرگ باکتری‌ها چند میکرولیتر از محیط داخل ارلن، روی محیط آگار خوندار (Quelab, Montreal, Canada) و میتیس سالیواریوس (Quelab, Montreal, Canada) آگار تلقیح شد. در صورت عدم رشد کلنی بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون در همان شرایط از ارلن حاوی باکتری‌های کشته شده مجدداً برای اطمینان از عدم رشد باکتری‌ها روی محیط‌های فوق تلقیح صورت گرفت. به منظور شستشوی باکتری‌های کشته دو مرتبه سانتریفوژ به مدت ۳۰ دقیقه در دور ۱۰۰۰۰ گرم انجام گرفت. دو مرتبه نیز با آب مقطر استریل شستشو انجام شد و رسوبات حاصل (پودر) در آخرین مرحله در یخچال نگهداری شد و سپس باکتری‌های کشته شده لیوفیلیزه شدند (۴).

ایمن سازی گاو با آنتی‌ژن‌های تهیه شده

چهار گاو سالم آبستن در ماه هفتم حاملگی از گاوداری ایروانی و شرکاء انتخاب شدند. سه گاو به شماره‌های ۱۹۳، ۱۹۴ و ۳۸۱ به عنوان گروه آزمایش و گاو شماره ۴ به عنوان کنترل در نظر گرفته شد.

به منظور ایمن سازی سه نوع واکسن برای تزریق به سه گاو طراحی شد. واکسن تزریقی به گاو شماره ۱۹۴، چندگانه بوده و از مخلوط ۶ سویه مختلف از استرپتوکوکوس موتانس تهیه شد. به اینصورت که بعد از اطمینان از عدم رشد باکتری‌ها، پودرهای لیوفیلیزه تهیه شده با سرم فیزیولوژی به کدورت نیم مک فارلند رسانده شد و با ۱۰٪ ادجوانت هیدروکسیدآلومینیوم (تهیه شده از موسسه سرم سازی رازی) مخلوط شد (۱۴،۱۶).

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-11-23]

واکسن تزریقی به گاو شماره ۱۹۳ دوگانه است و تمام مراحل مشابه تهیه واکسن برای گاو شماره ۱۹۴ بوده با این تفاوت که مخلوط دو سویه استاندارد استرپتوکوکوس موتانس ATCC35668 و استرپتوکوکوس سوبرینوس ATCC27607 استفاده شد و در واکسن سوم برای گاو شماره ۳۸۱ تنها از استرپتوکوکوس سوبرینوس استفاده شد. هر سه نوع واکسن تحت شرایط دمایی مناسب به دامداری منتقل و به روش داخل عضلانی در ماهیچه سرینی پا به گاوهای گروه آزمایش تزریق شد (۴،۱۴،۱۶). بعد از اولین تزریق، سه تزریق یادآور در فواصل دو تا سه هفته‌ای به همین صورت انجام گرفت. قبل از هر تزریق خونگیری به عمل آمد و لوله‌های ونوجکت حاوی ژل و EDTA برای جدا سازی سرم و پلاسما استفاده شد.

سنجش تولید آنتی بادی در سرم گاوهای ایمن شده بر ضد استرپتوکوک‌های مورد مطالعه

برای سنجش موفقیت ایمن سازی گاوها، عیار آنتی بادی اختصاصی بر علیه آنتی ژن‌های تهیه شده، در سرم گاو قبل و بعد از ایمن سازی با سه نوع آزمون آگلوتیناسیون شامل: آگلوتیناسیون در سطح لام، آگلوتیناسیون در لوله و آگلوتیناسیون در میکروتیتر پلیت اندازه‌گیری شد و افزایش عیار آنتی بادی سنجیده شد (۱۷).

سنجش آنتی بادی ضد استرپتوکوک‌های مورد مطالعه در آغوزگاوهای ایمن شده

بعد از زایمان کلستروم در ظرف‌های مناسب و جداگانه جمع‌آوری شد و بعد از انتقال به آزمایشگاه تحت شرایط دمایی مناسب تا زمان آنالیز در ۲۰- سانتی‌گراد درجه نگهداری شد.

فعالیت ایمونولوژیک کلستروم با استفاده از آزمون آگلوتیناسیون بر روی آب کلستروم (whey) ارزیابی شد. برای تهیه Whey ابتدا چربی کلستروم با سانتریفیوژ آن در دور ۱۲۰۰۰ گرم به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد جداشد. پس از آن برای حذف کازئین غیرمحلول، کلستروم بدون چربی تا دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه در بن ماری حرارت داده شد. سپس اسید لاکتیک ۵ نرمال قطره قطره به آن اضافه شد تا اسیدیته آن به ۴/۶ برسد. سپس سانتریفیوژ به مدت ۱۰ دقیقه، در دمای ۲ درجه سانتی‌گراد و دور ۱۰۰۰۰ گرم انجام شد و آنچه در این مرحله باقی می‌ماند به عنوان Whey است که حاوی آنتی بادی‌ها در نظر گرفته شد (۱۸).

برای سنجش حضور آنتی بادی در آغوز از روش میکروتیتر آگلوتیناسیون استفاده شد. به این صورت که در یک ردیف ۱۲ تایی ابتدا در هر چاهک به جز چاهک اول ۱۰۰ میکرولیتر آب اضافه شد سپس به چاهک اول ۱۰۰ میکرولیتر Whey با رقت ۱ به ۱۰ اضافه شد. از چاهک دوم ۱۰۰ میکرولیتر به چاهک سوم و به همین روش تا چاهک یازدهم انتقال صورت گرفت از چاهک یازدهم ۱۰۰ میکرولیتر دور ریخته شد. سپس به همه چاهک‌ها ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی کشته شده اضافه شد و به مدت ۲۴ ساعت انکوباسیون صورت گرفت این روش برای کلستروم کنترل هم انجام شد (۱۹).

تعیین کمی بیوفیلم تشکیل شده توسط باکتری‌ها

برای تعیین کمیت تشکیل بیوفیلم توسط باکتری‌ها روش میکروتیتر پلیت به شرح زیر انجام گرفت و از سویه‌های با چسبندگی بالا برای ادامه بررسی استفاده شد:

کشت ۱۸ تا ۲۴ ساعته از هر باکتری در محیط کشت تریپتوز سوی براث (TSB Quelab, Montreal, Canada) کامل شده با ۱٪ سوکروز و ۵٪ CO_2 تهیه گردید. سپس رقیق سازی این سوسپانسیون میکروبی با محیط (Quelab, Montreal, Canada) TSB استریل برای تهیه کدورتی معادل نیم مک فارلند صورت گرفت. از سوسپانسیون تهیه شده ۲۵۰ میکرولیتر به ۸ چاهک پلیت ۹۶ چاهکی پلی استیرن انتقال داده شد. چاهک‌های شاهد تنها حاوی محیط کشت استریل بودند. پس از ۲۴ ساعت محتویات چاهک‌ها خارج و هر چاهک ۳ مرتبه با ۳۰۰ میکرولیتر سرم فیزیولوژی استریل شسته شد. در مرحله بعد باکتری‌های متصل به دیواره و کف چاهک با ۲۵۰ میکرولیتر اتانول ۹۶٪ تثبیت شدند، بعد از گذشت ۱۵ دقیقه محتویات چاهک‌ها تخلیه و پلیت‌ها در دمای آزمایشگاه خشک گردیدند. در این مرحله رنگ‌آمیزی آن‌ها با کریستال ویوله ۲٪ به مدت ۵ دقیقه انجام گرفت و بعد از شستشوی رنگ اضافی با آب، پلیت‌ها در دمای آزمایشگاه خشک شدند و با اضافه کردن ۲۰۰ میکرولیتراسید استیک گلایسال ۳۳٪ به هر چاهک سنجش کمی از طریق جذب نوری رنگ کریستال ویوله موجود در حلال رنگ بر، در طول موج ۴۹۲ نانومتر

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-11-23]

توسط دستگاه خواننده الایزا ارزیابی شد. در نهایت کلاس بندی سویه‌های باکتریایی بر اساس جذب نوری (OD) به صورت زیر انجام گرفت (۲۰).

میانگین جذب نوری یک باکتری: OD

میانگین جذب نوری چاهک‌های شاهد: ODC

$OD \leq ODc$: غیر چسبنده

$ODc < OD \leq 2OD$: چسبندگی ضعیف

$2ODc < OD \leq 4ODc$: چسبندگی متوسط

$4ODc < OD$: شدیدا چسبنده

پس سویه‌های شدیداً چسبنده که قدرت تشکیل بیوفیلم آن‌ها از بقیه بیشتر بود برای مراحل بعد انتخاب شدند.

تأثیر Whey بر اتصال باکتری‌های دارای قدرت اتصال زیاد

کشت شبانه استرپتوکوک‌های با قدرت اتصال بالا در محیط TSB کامل شده با ۱٪ سوکروز تهیه شد. برای بررسی نقش ترکیبات مورد بررسی در ممانعت از اتصال باکتری‌ها، از دو روش استفاده شد: در روش اول ۲۰۰ میکرولیتر از مخلوط هم حجم از عوامل ضد میکروبی و باکتری‌ها به چاهک‌ها منتقل شد در حالی که چاهک‌های شاهد فقط حاوی سوسپانسیون میکروبی بودند. در روش دوم ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر Whey وارد چاهک‌ها شده و ۳۰ دقیقه بعد سوسپانسیون استرپتوکوک‌ها به میزان ۱۰۰ میکرولیتر اضافه گردید. در چاهک‌های شاهد این مرحله ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر PBS و پس از ۳۰ دقیقه ۱۰۰ میکرولیتر استرپتوکوک اضافه شد. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون، محلول‌ها و مواد غذایی از چاهک‌ها خارج و ۳ بار شستشو با PBS انجام و با کریستال ویوله ۲٪ به مدت ۵ دقیقه رنگ‌آمیزی انجام شد. پس از افزودن اسید استیک ۳۳٪ جذب نوری حلال رنگ بر توسط دستگاه الایزا خوانده شد و با مقایسه با چاهک‌های شاهد درصد کاهش اتصال باکتری‌ها از طریق کاهش میزان جذب نوری محاسبه گردید (۲۱).

اثرWhey بر قدرت رشد باکتری‌ها

ازکشت ۱۸ تا ۲۴ ساعته از هر باکتری در محیط BHIB کدورتی معادل نیم مک فارلند تهیه شد و پس از رقیق سازی این سوسپانسیون میکروبی با محیط BHIB استریل به نسبت ۱ به ۱۰۰ رقیق سازی شد. سپس از Whey دیالیز شده استریل سریال رقت تهیه شد و در چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای ۱۰۰ میکرولیتر از رقت‌های مختلف Whey و ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون باکتریایی تهیه شده اضافه شد. چاهک‌هایی به عنوان شاهد کدورت حاوی ۱۰۰ میکرولیتر محیط و ۱۰۰ میکرولیتر از هر رقت نیز در نظر گرفته شد. بعد از پوشاندن سطح پلیت‌ها با پارافیلم به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵٪ CO_2 گرمخانه گذاری شد و سپس کدورت آن توسط دستگاه خواننده الایزا در طول موج ۶۳۰ نانومتر خوانده شد (۲۲).

آنالیزهای آماری

داده‌های آماری و نمودارها با استفاده از نرم‌افزار SPSS23 محاسبه و رسم شدند. از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون توکی و برای بررسی قدرت اتصال باکتری‌ها از آزمون واریانس یک طرفه و تست تکمیلی دانت استفاده شد. اگر $P<0/05$ بود بین داده‌ها اختلاف معنی‌دار وجود داشت.

یافته‌ها

ایمن سازی گاوها با آنتی ژن‌های استرپتوکوکی

تهیه آنتی‌ژن‌های باکتریایی: با انجام کشت باکتری‌های مورد استفاده به عنوان آنتی ژن (استرپتوکوکوس موتانس و استرپتوکوکوس سوبرینوس) روی محیط‌های آگارخوندار و میتسی سالیواریوس آگار و ۴۸ ساعت گرمخانه گذاری آن‌ها، رشد هیچ کلنی مشاهده نشد که نشان دهنده کشته شدن باکتری‌ها بود.

آزمایش آگلوتیناسیون لوله ای سرم گاوهای ایمن

نتایج حاصل از آگلوتیناسیون در لوله بر روی سرم گاوهای ایمن، نشان داد که عیار (تیتر) آنتی بادی طی تزریق‌های متوالی روند فزاینده داشت چنانچه از عیار۱/۱۰ مربوط به قبل از تزریق به عیار ۱/۲۰۰۰ (در مورد سرم گاوهای شماره ۱۹۳) و عیار ۱/۳۰۰۰ (در مورد سرم گاو شماره ۳۸۱) رسید. بیشترین عیارها در مورد هر گاو در دو هفته پس از دومین تزریق مشاهده شد و تزریق سوم سبب افزایش عیار آنتی بادی نشد (جدول ۱).

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-11-23]

جدول ۱- نتایج حاصل از آزمایش آگلوتیناسیون سرم در لوله و میکروتیتر پلیت گاوهای ایمن با آنتی‌ژن‌های باکتری‌های تزریق شده

نوع آگلوتیناسیون	زمان / گاو	قبل از اولین تزریق	دو هفته بعد از اولین تزریق	دو هفته بعد ازدومین تزریق	دوهفته بعداز سومین تزریق
در لوله	۱۹۳	۱/۱۰	۱/۱۰۰	۱/۲۰۰۰	۱/۱۰۰۰
	۱۹۴	۱/۱۰	۱/۱۰۰	۱/۱۰۰۰	۱/۱۰۰۰
	۳۸۱	۱/۱۰	۱/۱۰۰	۱/۳۰۰۰	۱/۲۰۰۰
در میکروتیتر پلیت	۱۹۳	۱/۱۰	۱/۸۰	۱/۱۲۸۰	۱/۶۴۰
	۱۹۴	۱/۲۰	۱/۳۲۰	۱/۶۴۰	۱/۶۴۰
	۳۸۱	۱/۲۰	۱/۸۰	۱/۲۵۶۰	۱/۱۲۸۰

جدول ۲- نتایج آگلوتیناسیون در لوله و میکروآگلوتیناسیون Whey به دست آمده از کلستروم

نوع آگلوتیناسیون	رقت Whey			
	۱۹۳	۱۹۴	۳۸۱	کنترل
در لوله	۱/۱۰۰	۱/۱۰۰	۱/۱۰۰۰	–
در میکروتیتر پلیت	۱/۳۲۰	۱/۶۴۰	۱/۱۲۸۰	۱/۱۰

آزمایش آگلوتیناسیون سرم گاوهای ایمن در میکروتیترپلیت

نتایج حاصل از آگلوتیناسیون در میکروتیتر پلیت با نتایج آگلوتیناسیون لوله‌ای همخوانی داشت چنانچه در گاو شماره ۱۹۳ از عیار ۱/۱۰ مربوط به قبل از تزریق به ۱/۱۲۸۰ بعد از دومین تزریق و در گاو شماره ۳۸۱ از ۱/۱۰ به ۱/۲۵۶۰ رسید. در گاوهای مورد آزمایش غالباً بعد از تزریق دوم بالاترین تیتر آنتی بادی مشاهده شد (جدول ۱).

آزمایش آگلوتیناسیون آغوز گاوهای ایمن درمیکروتیتر پلیت

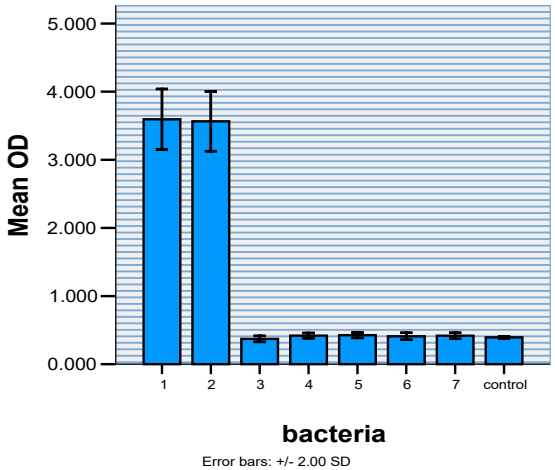
نتایج میکروآگلوتیناسیون Whey در جدول ۲ نشان داده شده است. همانطور که مشاهده می شود تیتر آنتی بادی در گاو شماره ۱۹۴ به ۱/۶۴۰ وگاو شماره ۳۸۱ به ۱/۱۲۸۰ رسید. این در حالی است که در گاو شماره ۱۹۳ تیتر آنتی بادی کمتری وجود داشت. اما با مقایسه تیتر آنتی بادی در گاوهای ایمن و غیر ایمن می توان افزایش تیتر آنتی بادی به مقدار را مشاهده کرد.

آزمایش آگلوتیناسیون لوله‌ای آغوز گاوهای ایمن

نتایج آگلوتیناسیون در لوله نیز نشان داد ایمن سازی در گاو شماره۳۸۱ مؤثرتر از دو گاو دیگر بود. به گونه‌ای که در گاوهای شماره ۱۹۳ و ۱۹۴ از ۱/۱۰ به ۱/۱۰۰ و در گاو شماره ۳۸۱ به ۱/۱۰۰۰ رسید. در این روش نیز گاو کنترل تیتر آنتی بادی کمی را نشان می‌دهد (جدول ۲).

تأثیر Whey بر اتصال استرپتوکوک‌های با قدرت اتصال بالا

در بین باکتری‌ها تنها باکتری‌های Streptococcus mutans و Steptococcus sobrinus استاندارد نسبت به گروه کنترل جزو سویه‌های شدیدا چسبنده بودند (P<۰/۰۰۱) و سایر باکتری‌های ۴، ۵، ۶ و ۷ جدا شده از دهان افراد چسبندگی ضعیفی داشتند و باکتری شماره ۳ غیر چسبنده بود (نمودار ۱).



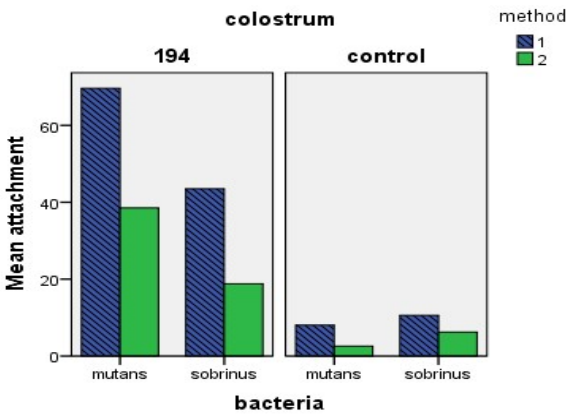
نمودار ۱- نمودار میانگین جذب نوری سویه‌های استرپتوکوک مورد مطالعه باسه بار تکرار (نشانگر قدرت تشکیل بیوفیلم استرپتوکوک)

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-11-23]

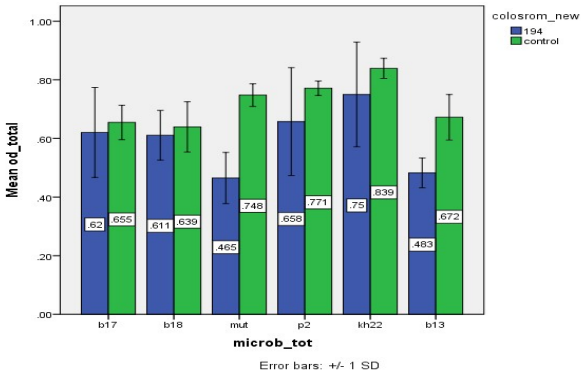
جدول ۳- درصد کاهش اتصال Whey از گاوهای مختلف بر استرپتوکوکوس موتانس و استرپتوکوکوس سوبرینوس

Whey	باکتری	درصد کاهش اتصال (روش ۱)	درصد کاهش اتصال (روش ۲)
۱۹۴	استرپتوکوکوس موتانس	۶۹	۳۸
	استرپتوکوکوس سوبرینوس	۴۳	۱۸
کنترل	استرپتوکوکوس موتانس	۸	۲
	استرپتوکوکوس سوبرینوس	۱۰	۶

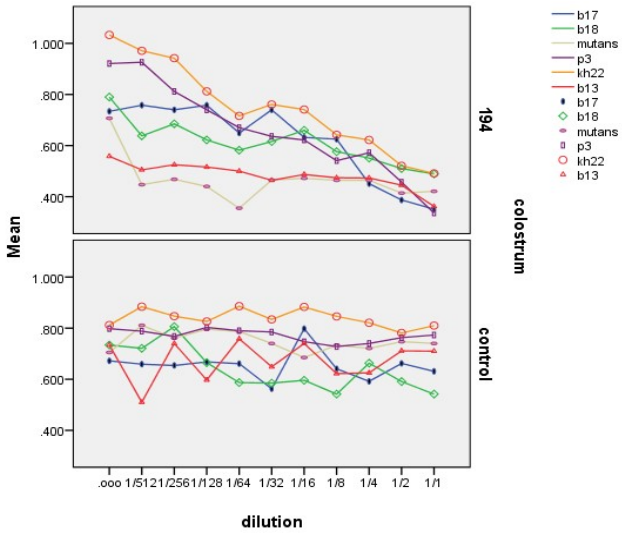
Whey تهیه شده از کلستروم گاو ایمن شماره ۱۹۴ در روش اول در هر دو باکتری استرپتوکوکوس موتانس و استرپتوکوکوس سوبرینوس و در روش دوم در استرپتوکوکوس موتانس باعث کاهش معنی‌دار در اتصال باکتری‌ها در مقایسه با Whey تهیه شده از کلستروم گاو کنترل گردید (P<۰/۰۰۱) و در Whey تهیه شده از کلستروم گاو شماره ۱۹۴ در روش اول که ۳۰ دقیقه زودتر از استرپتوکوک‌ها به کار برده شد، سبب کاهش اتصال استرپتوکوکوس موتانس و استرپتوکوکوس سوبرینوس به ترتیب ۶۹ و ۴۳ درصد و در روش دوم (که Whey با استرپتوکوک همزمان به چاهک‌ها وارد شده بود) سبب کاهش اتصال برای این باکتری‌ها به ترتیب ۳۸ و ۱۸ درصد شد که در روش اول در استرپتوکوکوس موتانس به طور معنی‌دار کاهش اتصال بیشتر از روش دوم بود (P<۰/۰۰۱) و در استرپتوکوکوس سوبرینوس نیز بین روش اول و دوم تفاوت معنی‌دار مشاهده گردید (P=۰/۰۱۷) (جدول ۳) (نمودار ۲).



نمودار ۲- تأثیر Whey حاصل از کلستروم گاو ایمن شماره ۱۹۴ وگاو کنترل بر قدرت اتصال باکتری‌های استرپتوکوکوس موتانس و استرپتوکوکوس سوبرینوس
روش اول: Whey و باکتری ها همزمان به چاهک ها منتقل شدند.
روش دوم: Whey ۳۰ دقیقه قبل از باکتری ها وارد چاهک ها شدند.



نمودار ۳- نمودار مقایسه‌ای تأثیر کلستروم کنترل و ۱۹۴ بر کاهش رشد ۶ سویه استرپتوکوکوس موتانس
منحنی X= سویه‌های استرپتوکوکوس موتانس
منحنی Y= جذب نوری در طول موج ۶۳۰ نانومتر



نمودار ۴ - نمودار مقایسه ای تأثیر کلستروم کنترل و ۱۹۴ بر کاهش رشد ۶ سویه استرپتوکوکوس موتانس
منحنی X= رقت‌های مختلف کلستروم
منحنی Y = جذب نوری در طول موج ۶۳۰ نانومتر

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-11-23]

بررسی تأثیر Whey بر قدرت رشد استرپتوکوک‌ها

در بررسی اثر کلستروم ۱۹۴ بر کاهش رشد ۶ سویه موتانس در رقت‌های مختلف بین کلستروم‌های کنترل و ایمن ۱۹۴ در باکتری‌های شماره ۳ (P<۰/۰۰۱) و ۶ (P=۰/۰۰۲) اختلاف معنی‌داری در کاهش رشد مشاهده شد. اما در باکتری‌های شماره ۱ و ۲ (P=۱/۰۰۰) ۳ (P=۰/۲۹۶) و ۴ (P=۰/۶۷۳) با وجود کاهش در رقت‌های پایین در کل اختلاف معنی‌داری بین اثر کاهش کلستروم ایمن با کنترل مشاهده نشد (نمودارهای ۳ و ۴).

بحث و نتیجه‌گیری

ایمن سازی گاو بر علیه عوامل عفونی در مطالعات گوناگون گزارش شده است چنانچه: مطالعاتی در زمینه تولید کلستروم و فراورده‌های شیر ایمن بر ضد باکتری‌های بیماری‌زای روده‌ای نظیر اشرشیاکلی، شیگلا، سالمونلا و صورت گرفته است (۱۶). یکی از ویژگی‌های ایمونوگلوبولین‌های گاوی این است که به طور نسبی مقاوم به پروتئولیز توسط آنزیم‌های هضمی انسانی است. در واقع مطالعات با داوطلبان انسانی نشان داده است که ۸۹٪ ایمونوگلوبین‌های گاوی با مصرف دهانی و عبور از مجرای گوارشی می‌توانند باقی بمانند (۱۱،۱۲). در مطالعه‌ای محققان کلستروم گاوی ایمن برضد ۱۷ سویه مختلف عامل اسهال تولید کردند. آن‌ها در رقت ۱/۱۰۰۰۰ از محصولات ایمن تولید شده، تیتر آنتی بادی معنی‌داری را برضد این باکتری مشاهده کرده بودند (۱۶).

در مورد ایمن سازی بر علیه استرپتوکوک‌های دهانی نیز گزارش‌هایی وجود دارد:

– Beck (۲۳) در سال ۱۹۷۴ چهارسویه مختلف استرپتوکوکوس موتانس را به گاوی که تا زمان زایمان آن یک ماه باقی مانده بود تزریق کرد و بعد از زایمان نیز به مدت یک ماه تزریق را ادامه داد و توانست در شیر گاوهای ایمن شده آنتی بادی بر ضد این باکتری‌ها تولید کند. او نشان داد که در رقت ۱/۱۰۲۴ Whey به دست آمده از شیر ایمن برضد سویه‌های تزریق شده آنتی بادی وجود دارد.

– Michalek و همکاران (۴) گاوهای باردار را یک ماه قبل از زایمان با ۷ سویه مختلف استرپتوکوکوس موتانس ایمن کردند و روش ایمن کردن را در طول دوره شیردهی ادامه دادند آن‌ها تیتر معنی‌داری از آنتی بادی‌های G را در رقت‌های۱/۲۰۰۰، ۱/۱۰۰۰ از سرم Whey به دست آوردند. آن‌ها آنتی بادی‌های ضد استرپتوکوکوس موتانس را در شیرگاو تولید کردند. آن‌ها گاوها را با ۷ سروتایپ مختلف از استرپتوکوکوس موتانس ایمن کرده و نشان دادند که رت‌های تغذیه شده با Whey تهیه شده از شیر ایمن به طور معنی‌داری نسبت به رت‌های کنترل پلاک کمتری دارند و فعالیت پوسیدگی دندان کاهش یافته است.

– Loimaranta و همکاران (۱۴) بر ضد استرپتوکوکوس موتانس و استرپتوکوکوس سوبرینوس در کلستروم گاو، آنتی بادی تولید کردند. آن‌ها تیتر معنی‌داری از آنتی بادی را در رقت ۱/۳۰۰ محصولات ایمن مشاهده کردند همچنین آن‌ها گزارش کردند کلستروم گاوی ایمن بر ضد استرپتوکوکوس موتانس و استرپتوکوکوس سوبرینوس باعث مهار آنزیم‌های تولید کننده کپسول گلیکوپروتئینی چسبناک در آن‌ها می‌شود که نتیجه این اثر کاهش اتصال باکتری‌ها به سطوح است.

در تحقیق حاضر سه گاو باردار که تا زمان زایمان آن‌ها دو ماه باقی مانده بود با سه واکسن مخلف ایمن شدند. گاو اول با ۶ سویه مختلف استرپتوکوکوس موتانس که ۵ سویه آن از پلاک دندان افراد دارای پوسیدگی دندان در شهر اصفهان جدا سازی شده بود ایمن سازی شد. گاو دوم با دو سویه مختلف استرپتوکوکوس موتانس و استرپتوکوکوس سوبرینوس استاندارد ایمن سازی شد و گاو سوم تنها با یک سویه باکتریایی استرپتوکوکوس سوبرینوس ایمن سازی شد. نتایج نشان دهنده تولید آنتی بادی برضد این استرپتوکوک‌ها در سرم و کلستروم گاو بود.

برای تولید آنتی بادی‌های اختصاصی در گاو روش ایمن سازی بسیار مهم است. اینکه گاو از نظر وضعیت سلامتی در چه مرحله‌ای باشد، سن گاو، تعداد تزریق، مکان تزریق و ادجوانت استفاده شده در تولیدآنتی بادی مؤثر است (۱۱،۱۴،۱۶). در این تحقیق ۴ تزریق متوالی در ماهیچه سرینی پای گاو همراه با ادجوانت هیدروکسید آلومینیوم صورت گرفت که منجر به تولید آنتی بادی اختصاصی در کلستروم و سرم گاو شد. یافته‌های این مطالعه با نتایج Michalek که با روش مشابهی ایمن سازی را انجام دادند تطبیق می‌کند (۴).

تیتر آنتی بادی در سرم این سه گاو در پی تزریق‌های متوالی افزایش یافت به گونه‌ای که در خون گیری دو هفته بعد از تزریق دوم

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-11-23]

در مورد سه گاو آنتی بادی بالاتری مشاهده شد. با بررسی‌های به عمل آمده مشخص شد که به ترتیب در گاو ایمن شده با ۶ سویه مختلف استرپتوکوکوس موتانس، گاو ایمن شده با دو سویه مختلف استرپتوکوکوس موتانس و استرپتوکوکوس سوبرینوس و گاو ایمن شده با یک سویه استرپتوکوکوس سوبرینوس رقت ۱/۱۰۰۰، ۱/۲۰۰۰ و ۱/۳۰۰۰ سرم دارای دارای آنتی بادی بر ضد باکتری‌های تزریق شده به گاو بود.

با توجه به افزایش تیتر آنتی بادی در سرم گاو در تزریق‌های متوالی اطمینان حاصل شد که روش ایمن کردن صحیح است. بنابراین انتظار می‌رفت که بعد از زایمان تیتر آنتی بادی معنی‌داری در کلستروم گاو مشاهده گردد. در Whey به دست آمده از کلستروم همان گاوها به ترتیب در رقت‌های ۱/۶۴۰، ۱/۳۲۰، ۱/۱۲۸۰ درست بعد از زایمان آنتی بادی وجود داشت. به طور کلی نتایج نشان دهنده افزایش تیتر آنتی بادی در سرم و کلستروم گاوها با تیترهای مختلف برای هرگاو بود. علت تفاوت تیتر آنتی بادی در گاوهای مختلف می‌تواند مربوط به دفعات آبستنی آن‌ها و پاسخ دهی متفاوت سیستم ایمنی در هر حیوان باشد.

در این تحقیق اثر Whey تهیه شده از گاوهای ایمن بر توانایی اتصال باکتری‌های موتانس و سوبرینوس با دو روش بررسی شد و بر اساس نتایج حاصله از این تحقیق Whey ایمن توانایی کاهش اتصال این باکتری‌ها را دارد و زمانی که این محصول زودتر از باکتری‌ها وارد چاهک شود کاهش اتصال بیشتر است. آنتی بادی‌ها می‌توانند به سطح چاهک‌ها متصل شوند و از اتصال باکتری‌ها با پوشاندن جایگاه اتصال آن‌ها در چاهک‌ها جلوگیری کنند. آنتی بادی‌ها همچنین قادر به پوشاندن سطح سلول‌های باکتری‌ها هستند و از این طریق جایگاه‌های اتصالی باکتری‌ها را می‌پوشانند. پوشاندن سطح باکتری‌ها ویژگی سطحی آن‌ها را از طریق افزایش هیدروفوبیستی و تغییر در بارالکتریکی سطح سلول بکتری که از آن به پتانسیل زتا تعبیر می شود را تغییر می‌دهد و از این توان اتصال با کتری به سطوح را تحت الشعاع قرار می‌دهد (۱۴،۲۴،۲۵).

در این تحقیق هرچند در رقت‌های پایین، در مواردی، اختلاف معنی‌داری در کاهش رشد نسبت به Whey تهیه شده از کلستروم کنترل مشاهده شد اما در کل به جز در مورد دو باکتری برای ۴ سویه دیگر کاهش معنی‌داری در رشد نسبت به نمونه کنترل تا رقت ۱/۵۱۲ مشاهده نشد. به نظر می‌رسد این کاهش رشد در رقت‌های پایین احتمالاً به خاطر آنتی بادی‌های اختصاصی تولید شده در مقدار بالا می‌باشد که منجر به مهار سیستم‌های متابولیسمی باکتری و اختلال در جذب قند می‌شود و از این طریق رشد باکتری را کاهش می‌دهد. در رقت‌های بالاتر هر دو کلستروم ایمن و غیر ایمن اثر مهاری تقریباً مشابهی را نشان دادند که شاید این مهار در رقت‌های بالاتر که میزان آنتی بادی در محصول کمتر می‌شود مربوط به دیگر عوامل ضدمیکروبی موجود در Whey باشد.

نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد کلستروم ایمن شده با باکتری‌های بیماری‌زای دهانی قادر به کاهش اتصال و رشد این باکتری‌ها در آزمایشگاه می‌باشد و بنابراین می‌تواند راهی برای کاهش خطر پوسیدگی دندان باشد. این نتایج می‌تواند زمینه پژوهش‌های بیشتری را برای کارایی آن در زمینه بالینی، بهینه سازی بیشتر روش ایمن سازی حیوان و تولید محصولات ایمن گاوی در مقیاس صنعتی فراهم آورد.

تشکر و قدردانی

مقاله حاضر نتیجه پایان‌نامه کارشناسی ارشد خانم فاطمه رمضانعلی زاده مصوب دانشگاه اصفهان در سال ۱۳۹۰ می‌باشد. بدین وسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه اصفهان که حمایت مالی این پژوهش را به عهده داشتند تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع:

1- Chhabra R, Rajpal K. Caries vaccine: A boom for public health. Annals Tropical Med Pub Health. 2016;9(1):1-3.

2- Koga T, Oho T, Shimazaki Y, Nakano Y. Immunization against dental caries. Vaccine.2002;20(16):2027-44.

3- Lamont RJ, Jenkinso HF. Oral microbiology at a glance. Wily Black well. 2010;85 p.

4- Michalek SM, Gregory RL, Harmon CC, Katz J, Richardson GJ, Hilton T, et al. Protection of gnotobiotic rats against dental caries by passive immunization with bovine milk antibodies to

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-11-23]

Streptococcus mutans. Infec and immun. 1987;55(10):2341-7.

5- M Hughes M, Machardy SM, Sheppard AJ, Woods NC. Evidence for an immunological relationship between Streptococcus mutans and human cardiac tissue. Infect Immun. 1980;27(2):576-88.

6- Silva AC, Silva DR, Silva IG, Oliveira PA, Agripino GG, Marinho SA. Caries vaccine: current reality or remote future? In: Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education (A. Méndez-Vilas, Ed.): Formatex; 2013;1548-52.

7- Wei H1, Loimaranta V, Tenovuo J, Rokka S, Syväoja EL, Korhonen H, et al. Stability and activity of specific antibodies against Streptococcus mutans and Streptococcus sobrinus in bovine milk fermented with Lactobacillus rhamnosus strain GG or treated at ultra high temperature.Oral Microbial Immunol. 2002;17(1):9-15.

8- Rabbani KM, Aliasghari A, Khoroushi M. Comparison of methods for controlling dental caries in the classical medicine and alternative medical practices and future prospects. J Dent Med (Tehran) Sciences. 2015;28(2):122-3.

9- Uruakpa FO, Ismond MA. Akobundu EN. Colostrum and its benefits: a review. Nutrition Research. 2002;22(6):755-67.

10- Saalfeld MH, Pereira DIB, Valente JSS, Borchardt JL, Weissheimer CF, Gularte MA et al. Effect of anaerobic bovine colostrum fermentation on bacteria growth inhibition. Cienc. Rural. 2016;46(12):2152-57.

11- Korhonen H, Marnila P, Gill HS. Bovine milk antibodies for health. Br J Nutr. 2000;1;84(S1):135-46.

12- EI-loly. MM. Bovine milk immunoglobulins in relation to human health. int j dairy sci. 2007;2(3):183-95.

13- Lehner T, Caldwell J, Smith R. Local passive immunization by monoclonal antibodies against streptococcal antigen I/II in the prevention of dental caries. Infect Immun. 1985;50(3):796-9.

14- Loimaranta V, Laine M, Söderling E, Vasara E, Rokka S, Marnila P, et al. Effects of bovine immune and non-immune whey preparations on the composition and pH response of human dental plaque. Eur J Oral Sci. 1999;107(4):244-50.

15- Aliasghari A, Rabbani M, Vaezifar S, Rahimi F, Younesi H, Khoroushi M. Evaluation of antibacterial efficiency of chitosan and chitosan nanoparticle on cariogenic Streptococci: an in vitro study. IJM. 2016;8(2):1-7.

16- Xu LB, Chen L, Gao W, Du kH. Bovine immune colostrums against 17 strains of diarrhea bacteria and in vitro and in vivo effects of its specific IgG. Vaccine. 2006 Mar 15;24(12):2131-40.

17- Fukuizumi T1, Inoue H, Tsujisawa T, Uchiyama C. Tonsillar application of killed Streptococcus mutans induces specific antibodies in rabbit saliva and blood plasma without inducing a cross-reacting antibody to human cardiac muscle. Infect Immun. 1997;65(11):4558-63.

18- Takahashi N, Eisenhuth G, Lee I, Schachtele C. Nonspecific Antibacterial Factors in Milk from Cows Immunizedwith Human Oral Bacterial Pathogens. J Dair Sci. Volume 75, Issue 7, July 1992, Pages 1810-20.

19- Tempelmans Plat-Sinnige MJ, Verkaik NJ, van Wamel WJ, de Groot N, Acton DS, van Belkum A. Induction of Staphylococcus aureus-specific IgA and agglutination potency in milk of cows by mucosal immunization. 2009;Vaccine. 2009;27(30):4001-9.

20- O'Toole GA, kolter R. Initiation of biofilm formation in Pseudomonas fluorescens WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis, Mol Microbiol. 1998;28(3):449-61.

21- Tahmourethpour A, Kermanshahi R, Salehi R, Nabinezhad A. In vitro effect of probiotic Lactobacillus fermentom on adhesion of oral Streptococci. Iranian J of Med Microbiology. 2008;2(1):45-51.

22- Chockalingam A, Zarlenga DS, Bannerman DD. Antimicrobial activity of bovine bactericidal permeability-increasing protein–derived peptides against gram-negative bacteria isolated from the milk of cows with clinical mastitis. Am J Vet Res. 2007 Nov;68(11):1151-9.

23- Beck LR. Dental caries in habiting product of immunize cow's milk having antibodies specific to killed Streptococcus mutans cells. United States patent US 4,324,782. 1982 Apr 13.

24- van Raamsdonk M, van der Mei HC, de Soet JJ, Busscher HJ, de Graaff J. Effect of polyclonal and monoclonal antibodies on surface properties of Streptococcus sobrinus. Infect Immun. 1995;63(5):1698-702.

25- Halder S, Yadav KK, Sarkar R, Mukherjee S, Saha P, Haldar S, et al. Alteration of Zeta potential and membrane permeability in bacteria: a study with cationic agents. Springerplus. 2015;4;4:672.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-11-23]