تولید تخم مرغ ایمن سازی شده علیه *E. coli K99* و *Salmonella enteritidis*

محمد ملکان[1*]، فرهاد موسی خانی[2]، هادی پورتقی[2]، علی‌رضا باهنر[3]، مهیار ملکان[4]

۱. دانشجوی دوره دکتری و عضو باشگاه پژوهشگران جوان دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، کرج، ایران
۲. گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، کرج، ایران
۳. گروه بهداشت و کنترل مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران
٤. دانش آموخته دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرمسار، گرمسار، ایران
* نویسنده مسئول مکاتبات: *Dr.m.malekan@gmail.com*
(دریافت مقاله: ۸۸/۹/۲٦، پذیرش نهایی: ۸۹/۳/۸)

چکیده

باکتری‌های *E.coli K99* و *Salmonella enteritidis* از عوامل اصلی اسهال گوساله‌ها می‌باشند. جهت پیشگیری از وقوع بیماری‌های ناشی از این عوامل از روش‌های زیادی از جمله واکسیناسیون و انتقال ایمنی غیر فعال (passive) می‌توان استفاده نمود. به‌همین منظور در سال‌های اخیر بحث استفاده از تخم مرغ ایمن سازی شده در جیره غذایی گوساله‌های حساس مطرح شده است. به‌منظور تهیه آنتی ژن، باکتری‌های *E.coli K99* و*Salmonella enteritidis* پس از کشت ٢٤ ساعته در محیط کشت نوترینت براث شرکت مرک، با اضافه کردن محلول فرمالین ۱٪ غیر فعال شدند. آنتی ژن به‌دست آمده پس از سه بار شستشو توسط PBS، تصفیه شده و آماده استفاده گردیدند. میزان آنتی ژن در هر دز براساس ۲۰۰ µg/ml پروتئین و ۱×۱۰^۹ CFU/ml تنظیم شدند. مرغ‌ها ٤ تزریق به فاصله ۲ هفته یکبار همراه با ادجوانت کامل فروند شرکت سیگما (تزریق اول) و ادجوانت ناقص فروند شرکت سیگما (۳ تزریق بعدی) به‌صورت زیر جلدی دریافت کردند. نمونه‌گیری‌های مختلف هم به‌فاصله دو هفته یک بار صورت گرفت. سپس تیتر آنتی بادی در نمونه‌های سرم و تخم‌مرغ با روش آگلوتیناسیون اندازه‌گیری شدند. نتایج به‌دست آمده از لحاظ آنالیز آماری مورد مقایسه قرار گرفتند. نتایج بررسی حاضر نشان داد که شده تخم مرغ‌های ایمن سازی شده، هایپرایمیون بوده و می‌تواند برای تحریک سیستم ایمنی گوساله‌های یک روزه قابل استفاده باشد.

مجله دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز، ۱۳۸۹، دوره ٤، شماره ۱، پیاپی ۱۳، صفحات: ٧٦٤-٧٥٩.
کلید واژه‌ها: تخم مرغ ایمن‌سازی شده، *سالمونلا انتریتیدیس*، *اشریشیا کولای* K99

مقدمه

در سال‌های اخیر استفاده از تخم مرغ‌های ایمن سازی شده رواج چشمگیری پیدا کرده است. تاکنون تخم مرغ‌های ایمن سازی شده بر علیه *E.coli* عامل اسهال در خوک‌ها، روتا ویروس ایجاد کننده اسهال در نوزاد انسان ، *هلیکوباکتر پایلوری* در انسان ، *پاستورلا مولتی سیدا* و ... تولید شده است (۸، ۱۳، ۱۵، ۱۷، ۱۸ و ۱۹).

از جمله عوامل اصلی اسهال و مرگ و میر گوساله‌ها در هفته‌های اول زندگی می‌توان به *E.coli K99* و *Salmonella enteritidis* اشاره نمود (۳ و ۷). باکتری سالمونلا قادر به ایجاد بیماری‌های زیادی در گونه‌های مختلف حیوانات و انسان است. به دلیل علاقه این باکتری به دستگاه گوارش، از جمله بیماری‌های مهم ایجاد شده توسط آن اسهال

می‌باشد. به‌طوری‌که در موارد اسهال حاد، حیوان در اثر توکسمی و از دست دادن آب بدن در عرض ۲ تا ۵ روز تلف می‌شود (۱). باکتری *E.coli K99* نیز تروپیسم زیادی به دستگاه گوارش داشته و یکی از مهمترین عوامل ایجاد کننده اسهال سفید در هفته اول زندگی گوساله‌ها می‌باشد (۱ ، ۲ و ۳). این باکتری باعث اختلال در عملکرد آنتروسیت‌ها شده و نهایتاً درصورت عدم درمان دام در اثر اسهال ظرف چند روز تلف می‌شود (۲).

با توجه به اهمیت بیماری‌های ایجاد شده توسط باکتری‌های *E.coli K99* و *Salmonella enteritidis*، در این تحقیق سعی بر آن شده که با تحریک سیستم ایمنی مرغ‌ها، تخم مرغ‌هایی به‌دست آیند که دارای تیتر بالای آنتی بادی علیه عوامل یاد شده باشند. این محصولات در نهایت قابل استفاده برای گوساله‌ها به‌منظور ایجاد ایمنی مضاعف علیه، باکتری‌های *E.coli K99* و *Salmonella enteritidis* می‌باشند.

مواد و روش‌ها

تهیه آنتی ژن:

باکتری *سالمونلا انتریتیدیس* مورد استفاده در این تحقیق از بخش بیوتکنولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس تهیه گردید. باکتری *E.coli K99* استفاده شده نیز توسط کیت Capture ELISA شرکت Biox مورد شناسایی قرار گرفته و سپس کشت و جداسازی شد. هویت باکتری‌ها مجدداً توسط تست‌های بیوشیمیایی و رنگ آمیزی مورد تأیید قرار گرفت. برای تهیه آنتی ژن، باکتری‌های *E.coli K99* و *Salmonella enteritidis* در محیط کشت نوترینت براث شرکت مرک برای مدت ٢٤ ساعت در انکوباتور ٣٧ درجه سانتی‌گراد پاساژ داده شدند. سپس به آنها فرمالین ١٪ اضافه شد و برای مدت ٢٤ ساعت در دمای آزمایشگاه قرار گرفتند (٦). آنتی ژن‌های تهیه شده هم به‌منظور ایمن سازی مرغ‌ها و هم تست اندازه‌گیری میزان آنتی بادی‌ها به‌کار گرفته شدند. به منظور تأیید مرگ باکتری‌ها، به‌صورت تصادفی نمونه‌هایی روی محیط مکانکی آگار شرکت مرک کشت داده شدند که پس از ٢٤ ساعت هیچ باکتری در آن رشد نکرد. قبل از کشتن باکتری‌ها برای نمونه‌هایی از آنها به‌طور تصادفی surface plate count صورت گرفت تا میزان تقریبی باکتری‌ها در مخازن به‌دست آیند. این میزان در ۵ میلی‌لیتر محیط کشت، برای باکتری *E.coli K99*، CFU (colony forming unit) ۲×۱۰^{۸} و برای باکتری *سالمونلا انتریتیدیس* CFU ۸×۱۰^{۹} بود. به‌منظور شستشو و تهیه آنتی ژن‌های خالص از PBS (Phosphate buffer saline) استریل استفاده شد. پس از ۳ بار شستشو، آنتی ژن‌ها در PBS هم حجم محیط کشت اولیه حل شده و آماده دزاج نمودن شدند. با استفاده روش پروتئین سنجی لوری در کنار شمارش‌های صورت گرفته، میزان آنتی ژن بر پایه ٢٠٠ µg/ml پروتئین و ۱×۱۰^{۹} CFU/ml تعیین دوز گردیدند (١٢، ١٦ و ١٨). آنتی ژن‌های دزاج شده در میکرو تیوب‌های استریل تا زمان تزریق در فریزر ٢٠- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند.

ایمن سازی مرغ‌ها:

در این تحقیق از ٢٨ مرغ لگهورن سفید که از سن ٩٠ روزگی به محل تحقیق انتقال پیدا کرده بودند، استفاده شد. این پولت‌ها پس از به تخم آمدن در سن ١٥٠ روزگی برای آزمایش استفاده شدند. شرایط نگه‌داری از جمله تغذیه، شرایط محیطی و ... برای هر دو گروه آزمایش و شاهد یکسان و در حد مطلوب در نظر گرفته شد. به مرغ‌های هر دو گروه شاهد و آزمایش به‌فواصل دو هفته، ٤ تزریق به دوصورت زیر جلدی و داخل عضلانی صورت گرفت (٦). ١٤ قطعه مرغ از گروه آزمایش تزریق اول را همراه با ادجوانت کامل فروند (با اضافه کردن میکروب کشته شده سل به روغن معدنی سبک و آب و یک ماده امولسیون کننده مثل مونولئات مانید ادجوانت کامل فروند به‌وجود می‌آید که با تحریک ماکروفاژها و سلول‌های کمکی T واکنش ایمنی را تشدید می‌کند.) شرکت سیگما و تزریقات بعدی را همراه ادجوانت ناقص (روغن معدنی سبک و آب و

یک ماده امولسیون کننده مثل مونولئات مانید است که با ایجاد التهاب موضعی موجب آزادسازی کند پادگن گردیده و تا حدود زیادی به بروز پاسخ ایمنی مناسب کمک می‌کند.) فروند شرکت سیگما دریافت کردند (٤ و ٦). مرغ‌های گروه شاهد نیز آب مقطر استریل دریافت کردند.

اندازه‌گیری تیتر آنتی بادی‌ها:

نمونه‌های خون و تخم مرغ اخذ شده به ترتیب شامل روز صفر، هفته دوم، هفته چهارم، هفته ششم، هفته هشتم و هفته دهم می‌باشند. به منظور اندازه‌گیری تیتر آنتی بادی در سرم و تخم مرغ از روش آگلوتیناسیون استفاده شد (٤). در روز صفر علاوه بر اندازه‌گیری تیتر آنتی بادی بر علیه باکتری‌های *E.coli K99* و *Salmonella enteritidis* در تخم مرغ‌ها و سرم، از تخم مرغ‌ها نیز بر روی محیط مکانکی آگار شرکت مرک کشت تهیه شد که پس از ٢٤ ساعت در انکوباتور ٣٧ درجه سانتی‌گراد هیچ باکتریی روی محیط ظاهر نگردید. برای جداسازی و آماده سازی زرده تخم مرغ‌ها برای آزمایش آگلوتیناسیون از روش رقیق کردن با PBS استفاده شد (١٠). در این روش از فاز مایع سطحی که حاوی ایمونوگلوبولین‌های محلول بود برای آزمایش آگلوتیناسیون استفاده شد.

برای هر یک از مرغ‌های گروه آزمایش و شاهد یک نمونه سرم و یک نمونه تخم مرغ در روزهای یاد شده اخذ شدند. برای سنجش میزان آنتی بادی تولید شده بر علیه باکتری‌های *E.coli K99* و *سالمونلا انتریتیدیس* در سرم و زرده تخم مرغ‌ها از روش آگلوتیناسیون استفاده شد. برای این منظور از دو سری لوله ١٠ تایی برای هر نمونه سرم و دو سری لوله ١٠ تایی دیگر برای هر نمونه تخم مرغ استفاده شد. و در کنار هر نمونه ٣ لوله شاهد نیز در نظر گرفته شد تا از خطاهای احتمالی جلوگیری شود.

برای انجام آزمایش آگلوتیناسیون ابتدا از سرم و یا فاز مایع ایجاد شده در زرده تخم مرغ‌ها رقت‌های متوالی تهیه شد. به منظور تهیه رقت‌های متوالی ابتدا ٠/٩ میلی‌لیتر PBS در لوله ابتدایی ریخته و به آن ٠/١ میلی‌لیتر سرم یا فاز مایع ایجاد شده در زرده تخم مرغ‌ها اضافه شدند. پس از هموژن سازی میزان ٠/٥ میلی‌لیتر از لوله اول به لوله دوم که حاوی ٠/٥ میلی‌لیتر PBS بود اضافه گردید و این کار تا لوله دهم ادامه پیدا کرد و در انتها ٠/٥ میلی‌لیتر از مایع هموژن لوله دهم دور ریخته شد. سپس به تمامی رقتها مقدار ٠/٥ میلی‌لیتر آنتی ژن هموژن شده، اضافه شده و برای مدت ٢٤ ساعت در دمای آزمایشگاه قرار داده شد (٤). بعد از سپری شدن مدت مذکور، تمامی لوله‌ها از نظر ایجاد آگلوتیناسیون مورد بررسی قرار گرفتند و به‌منظور تأیید تشخیص لوله‌های مشکوک، ازآنها لام تهیه و در زیر میکروسکوپ نوری بررسی شدند.

نتایج حاصل از این بررسی توسط نرم افزار spss مورد آنالیز قرار گرفت.

یافته‌ها

تغییرات مربوط به آنتی بادی در سرم و تخم مرغ برای باکتری‌های *E.coli K99* و *Salmonella enteritidis* در جدول ١ آورده شده است.

جدول ١- میانگین‌های حسابی (ح) و هندسی (**ه**) لوله‌های مورد آزمایش برای باکتری‌های مختلف در سرم و تخم مرغ در طول مطالعه

		سرم				تخم مرغ			
باکتری		E.coli		Sal. ent.		E.coli		Sal.ent.	
هفته	گروه	آزمایش	شاهد	آزمایش	شاهد	آزمایش	شاهد	آزمایش	شاهد
هفته صفر	ح	۰/۸۵	۱	۰	۰	۰/۷۱	۰/٦۹	۰	۰
	ه	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
هفته ۲	ح	۲/۱٤	۱	۱/۵	۰	۲	۰/۹۲	۱/٤۲	۰
	ه	۱/۲۲	۰	۱/۱٤	۰	۱/۲۰	۰	۱/۳۰	۰
هفته ٤	ح	٤/۷۱	۱/۰۷	۳/۵۷	۰	٤/۰۷	۱	۳/۳۵	۰
	ه	۱/۱۳۱	۰	۱/۵۹	۰	۱/۸٤	۰	۱/۵۱	۰
هفته ٦	ح	۵/۵۷	۱/۰۷	٤/۵	۰	۵/٤۲	۰/۹۲	٤/۲۸	۰
	ه	۱/۲۳۷	۰	۱/۱۱۳	۰	۱/۲۱۵	۰	۱/۹۷	۰
هفته ۸	ح	٦/۸۵	۱	۵/۷۱	۰	٦/٦٤	۰/۹۲	۵/٦٤	۰
	ه	۱/۵۷۹	۰	۱/۲٦۲	۰	۱/٤۹۹	۰	۱/۲۵۰	۰
هفته ۱۰	ح	۷/۳۵	۱	٦/٤۲	۰	۷/۰۷	۰/۹۲	٦/۳۵	۰
	ه	۱/۸۱۹	۰	۱/٤۳۰	۰	۱/٦۷۲	۰	۱/٤۰۹	۰

میانگین مقادیر تیتر آنتی بادی در سرم و تخم مرغ علیه باکتری *E.coli K99* براساس شماره لوله‌های ثبت شده در هفته‌های تحت بررسی، به‌طور جداگانه با آزمون آماری من ویتنی در دو گروه آزمایش و شاهد مورد مقایسه قرار گرفت و به‌جز روز صفر که میانگین فاقد اختلاف معنی‌دار بود (سرم ٦١٪ و تخم مرغ ٩٤٪) در بقیه هفته‌ها، تیتر گروه آزمایش به طور معنی‌داری بیش از گروه شاهد بود. (p=۰/۰۰۵). میانگین مقادیر تیتر آنتی بادی در سرم و تخم مرغ علیه باکتری *سالمونلا اینتریتیدیس* براساس شماره لوله های ثبت شده در هفته های تحت بررسی به‌طور جداگانه با آزمون من ویتنی در دو گروه آزمایش و شاهد مورد مقایسه قرار گرفت و به‌جز روز صفر که میانگین فاقد اختلاف معنی‌دار بود، در بقیه هفته‌ها، تیتر گروه آزمایش به‌طور معنی‌داری بیش از گروه شاهد بود (p=۰/۰۰۰۵). همچنین تغییرات در طول زمان تیتر آنتی بادی علیه باکتری‌های *E.coli K99* و *سالمونلا انتریتیدیس* در دو گروه آزمایش و شاهد با روش آنالیز واریانس با اندازه‌گیری مکرر (Repeated Measure ANOVA) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و مشخص گردید تغییرات در دو گروه شاهد معنی‌دار نبوده ولی در گروه آزمایش هم در مورد سرم و هم تخم مرغ به‌طور معنی‌داری افزایش یافته است (p<۰/۰۰۱).

بحث و نتیجه‌گیری

استفاده از تخم مرغ به عنوان حامل فاکتورهای بیولوژیک مختلف در چند دهه اخیر مورد توجه قرار گرفته و از آنجائی‌که تخم مرغ در سبد غذایی انسانی به‌صورت معمول مصرف می‌شود، تحقیقات در مورد این نوع تخم مرغ‌ها جهت درمان بیماری‌های مختلف و همچنین کاهش میزان مصرف داروها به‌صورت وسیع در حال انجام است. در سال ٢٠٠٦ Li و همکاران با تولید ایمونوگلوبولین در زرده بر علیه *آئروموناس هیدروفیلا*، از آن جهت ایمن سازی گونه‌هایی از ماهی استفاده نمودند و طی آن، هم در شرایط آزمایشگاهی (in vitro) و هم در شرایط درون تنی (in vivo) نتایج معنی‌دار و قابل قبولی کسب نمودند بدین معنی که توانستند با استفاده از زرده‌های هایپرایمن ایمنی پاسیو را به ماهی‌های مورد آزمایش منتقل نمایند. در سال ٢٠٠٢ Shin و همکاران با تهیه تخم مرغ ایمن سازی شده بر علیه *هلیکوباکتر پایلوری*، از آن به‌عنوان روش کمکی در درمان زخم معده انسان استفاده نمودند (١٨). Chang و همکاران در سال ١٩٩٩ با تولید تخم مرغ ایمن سازی شده بر علیه سروتیپ C *استرپتوکوکوس موتانس* توانستند از آن در جهت جلوگیری از رشد باکتری مذکور در محوطه دهانی انسان استفاده کرده و نتایج معنی‌داری به‌دست آورند (٦). در سال ١٩٩١ نیز Wiedemann و همکاران تخم مرغ ایمن سازی شده‌ای علیه *E.coli* عامل اسهال در خوک‌ها تولید نمودند (٢٠). در سال ١٩٩٤ Kuroki و همکاران توانستند با تولید تخم مرغ ایمن سازی شده بر علیه روتا ویروس عامل اسهال گوساله‌ها و مصرف آن در حیوانات زنده تیتر بالایی از آنتی بادی را علیه این عامل به آنها منتقل نمایند (١١). در سال ١٩٩٨ Ling و همکاران نیز توانستند با واکسیناسیون طیور علیه *پاستورلا مولتو* سیدا به تیتر حداکثری در تخم مرغ دست پیدا کنند (١٣). در سال ١٩٩٢ Farrelly و همکاران توانستند بعد از تولید تخم مرغ ایمن سازی شده علیه یکی از سویه انتروتوکسیژنیک *E.coli* و مصرف خوراکی آن در خرگوش‌ها به نتایج خیلی خوبی دست پیدا کنند (٩). در سال ٢٠٠٨ Chalghoumi و همکاران موفق به تولید تخم مرغ ایمن سازی شده بر علیه *سالمونلا تایفی موریوم* و *سالمونلا انتریتیدیس* شدند (٥). با توجه به نتایج به‌دست آمده توسط محققین مختلف، تولید تخم مرغ ایمن سازی شده به‌منظور استفاده در صنعت دامپروری و به‌ویژه کنترل اسهال گوساله‌ها در دامپروری‌ها امری دور از ذهن نبوده و کاربردی خواهد بود. هدف اصلی این تحقیق با به‌دست آوردن حداکثر تیتر آنتی بادی مورد نیاز در زرده تخم مرغ‌ها برعلیه باکتری‌های *E.coli K99* و سالمونلا انتریتیدیس تأمین گردید. زرده تخم مرغ‌های ایمن سازی به‌دست آمده، هایپر- ایمیون بوده و به منظور کمکی برای سیستم ایمنی گوساله‌های یک روزه قابل استفاده می‌باشد.

منابع

١. حسنی طباطبایی، ع. و فیروزی، ر. ١٣٨٤. بیماری‌های باکتریای دام. چاپ دوم، انتشارات دانشگاه تهران، صفحات: ٢١٩-٢١٨ و ٢٤٥.

٢. ذوقی، ا.، وند یوسفی، ج. و حاجی خانی، ر. ١٣٨٣. پاتوژنز عفونت‌های باکتریای. (ترجمه)، تالیف: گیز، ک.، توئن، چ.، چاپ اول، انتشارات دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، صفحات: ٣٠٣-٢٦٦.

٣. سیفی، ح.، رئوفی، ا.، گرجی دوز، م. و مخبر دزفولی، م. ١٣٧٩. طب داخلی دام بزرگ. (ترجمه)، تالیف: اسمیت، پی. چاپ اول، جلد دوم، انتشارات نوربخش، صفحات: ٢٣٥-٢٣٦.

٤. شیمی ، ا. ١٣٨٠. ایمنی شناسی دامپزشکی. (ترجمه)، تالیف: تیزارد، ا. چاپ اول، انتشارات نوربخش، صفحات: ٢٧٨-٢٧٧ و ٣٢٩-٣٢٧.

5. Chalghoumi, R., Théwis, A., Portetelle, D. and Beckers, Y. 2008. Production of hen egg yolk immunoglobulins simultaneously directed against Salmonella enteritidis and Salmonella typhimurium in the same egg yolk. Poultry Science. 87(1):32-40.
6. Chang, H., Yang, R.F., Chen, Y.T. and Chen, C.C. 1999. Productivity and some properties of immunoglubin specific against *Streptococcus mutans* serotype C in chicken egg yolk. Journal of Agriculture and Food Chemistry. 47:61-66.
7. Divers, T.J. and Peek, S. 2008. Rebhun's Disease of Dairy Cattle. Saunders, Philadelphia, p: 200-205&219-225.
8. Ebina, T., Tsukada, K., Umezu, K., Nose, M., Tsuda, K., Hatta, H., et al. 1990. Gastroenteritis in suckling mice caused by human rotavirus can be prevented with egg yolk immunoglobulin (IgY) and treated with a protein-bound polysaccharide preparation (PSK). Microbiol Immunolog. 34(7):617-629.
9. Farrelly, C., Branton, D. and Wanke, C.A. 1992. Oral ingestion of egg yolk immunoglobulin from hens immunized with an enterotoxigenic *Escherichia coli* strain prevents diarrhea in rabbits challenged with the same strain. Infection and Immunity. 60(7): 2593-2597.
10. Fulton, R.M. Nersessian, B.N. and Reed, W.M. 2002. Prevention of *Salmonella enteritidis* infection in commercial duckling by oral chicken egg derived antibody alone or in combination with probiotics. Poultry Science. 81:34-40.
11. Kuroki, M., Ohta, M., Ikemori, Y., Peralta, R.C., Yokoyama, H. and Kodama, Y. 1994. Passive protection against bovine rotavirus in calves by specific immunoglobulins from chicken egg yolk, Arch Virology. 138(1-2):143-148.
12. Li, X.L., Shuai. J.B. and Fang, W.H. 2006. Protection of *Carassus auratus* gibelio against infection by *Aeromonas hyedrophila* using specific immunoglobulins from hen egg yolk. Journal of Zhejiang University. 7(11):922-928.
13. Ling, Y.S., Guo, Y.J., Li, J.D., Yang, L.K., Luo, Y.X., Yu, S.X., et al. 1998. Serum and egg yolk IgG antibody titers from laying chickens vaccinated with *Pasteurella multocida*. Avian Disease. 42(1):186-189
14. Marquardt, R.R., Jin, L.Z., Kim, J.W., Fang, L., Frohlich, A.A. and Baidoo, S.K. 1999. Passive protective effect of egg-yolk antibodies against enterotoxigenic *Escherichia coli* K88+ infection in neonatal and early-weaned piglets. FEMS Immunology and Medical Microbiology. 23(4):283-288.
15. Owusu-Asiedu, A., Nyachoti, C.M. and Marquardt, R.R. 2003. Response of early-weaned pigs to an enterotoxigenic *Escherichia coli* (K88) challenge when fed diets containing spray-dried porcine plasma or pea protein isolate plus egg yolk antibody, zinc oxide, fumaric acid, or antibiotic. Journal of animal science. 81(7):1790-1798.
16. Salerno, R., Odell, C., Cyanovich, N., Bubnis, B., Morges, W. and Gray, A. 1985. Lowry protein determination by automated flow injection analysis for bovine serum albumin and hepatitis B surface antigen. Analytical Biochemistry. 151:309-314.
17. Sarker, S.A. , Casswall, T.H. , Juneja, L.R. , Hoq, E., Hossain, I., Fuchs, G.J., et al. 2001. Randomized, placebo-controlled, clinical trial of hyperimmunized chicken egg yolk immunoglobulin in children with rotavirus diarrhea. Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition. 32(1):19-25.
18. Shin, J.H., Yang, M., Nam, S.W., Kim, J.T., Myung, N.H., Bang, W.G. et al. 2002. Use of yolk derived immunoglobulin as an alternative to antibiotic treatment for control of helicobacter pylori infection. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology. 9(5):1061-1066.
19. Shin, J.H., Nam, S.W., Kim, J.T., Yoon, J.B., Bang, W.G. and Roe, I.H. 2003. Identification of immunodominant Helicobacter pylori proteins with reactivity to H. pylori-specific egg-yolk immunoglobulin. Journal of Medical Microbiology. 52(Pt 3):217-222.
20. Wiedemann, V., Linckh, E., Kühlmann, R., Schmidt, P. and Lösch, U. 1991. Chicken egg antibodies for prophylaxis and therapy of infectious intestinal diseases. V. In vivo studies on protective effects against Escherichia coli diarrhea in pigs. Journal of Veterinary Medicine, Series B. 38(4):283-291.