نشریه پژوهش‌های علوم دامی/ جلد ۲۲ شماره ۱/ سال۱۳۹۱

تاثیر استفاده از پودر آنتی‌بادی اختصاصی زرده تخم‌مرغ (IgY) علیه اشرشیاکلی، بر ایمنی مخاطی روده و الگوی الکتروفورتیک پروتئین خون جوجه‌های گوشتی

سید امیر حسین مهدوی*[1] و حمید رضا رحمانی[1]

تاریخ دریافت: ۹۰/۶/۱۶ تاریخ پذیرش: ۹۰/۹/۸

[1] استادیار و دانشیار گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی اصفهان

*مسئول مکاتبه: E mail: mahdavi@cc.iut.ac.ir

چکیده

آزمایش حاضر به منظور مطالعه اثر پودر آنتی‌بادی اختصاصی زرده تخم‌مرغ (IgY) علیه اشرشیاکلی O۷۸:K۸۰، بر نحوه پاسخ‌های ایمنی مخاطی و تغییرات الگوی الکتروفورتیک خون جوجه‌های گوشتی آلوده با اشرشیاکلی طراحی گردید. جهت تهیه پودر آنتی بادی، تعداد ۴۰ قطعه مرغ تخم گذار لگهورن ۳۶ هفته، با باکتری مورد آزمون ایمونیزه گردیده و پس از جمع آوری تخم مرغ ها برای یک دوره زمانی ۱۲ هفته، IgY با بهره گیری از روش استخراج بخش محلول در آب از زرده تخم مرغ ها جداسازی و لیوفیلیزه گردید. تعداد ۲۸۰ قطعه جوجه گوشتی هفت روزه به طور کاملاً تصادفی به پنج تیمار (چهار گروه آلوده شده با اشرشیاکلی و یک گروه غیر آلوده، به عنوان گروه کنترل منفی)، چهار تکرار و چهارده مشاهده در هر تکرار تقسیم گردیدند. در روز هفتم همه جوجه ها به جز گروه کنترل منفی با ۰/۵ میلی لیتر محیط کشت حاوی 10^9 CFU/ml اشرشیاکلی O۷۸:K۸۰ به روش خوراکی آلوده گردیدند. این عمل در روزهای ۱۴ تا ۲۱ با ۱ میلی لیتر از همان محیط کشت برای هر یک از جوجه‌ها انجام پذیرفت تا جمعیت اشرشیاکلی مدفوع به حدود 10^5 CFU/g رسید. سپس سطوح مختلف آنتی‌بادی از روز ۲۱ تا ۴۲، در قالب یک طرح کاملاً تصادفی به چهار گروه آلوده عرضه گردید. چهار گروه آلوده شده با اشرشیاکلی، جیره های با انرژی و پروتئین مشابه را که با سطوح صفر (کنترل مثبت)، ۰/۱ ، ۰/۲ و ۰/۴ درصد آنتی‌بادی اختصاصی مکمل شده بودند دریافت نمودند. گروه کنترل منفی نیز جیره پایه مشابه و بدون افزودن آنتی‌بادی را دریافت کردند. نتایج بیان‌گر آن است که چالش گوارشی جوجه‌های گوشتی با اشرشیاکلی O۷۸:K۸۰ سبب گردید تا شمارش اشرشیاکلی ایلئومی، غلظت IgA سرمی و مخاطی (sIgA)، غلظت‌های پروتئین سرمی کل وگلوبولین‌ها به طور معنی‌داری افزایش یابد. پس از سه هفته مصرف سطوح مختلف آنتی‌بادی اختصاصی، جمعیت اشرشیاکلی ایلئومی و غلظت sIgA در گروهایی که سطوح ۰/۲ و ۰/۴ درصد آنتی‌بادی اختصاصی را دریافت داشته بودند، به طور بسیار معنی‌داری (P<۰/۰۱) پایین‌تر از دیگر گروه‌های آلوده بود. حال آن که غلظت IgA سرمی و نسبت آلبومین به گلوبولین تنها در سطوح حاشیه‌ای به ترتیب کاهش (P=۰/۳۶) و افزایش (P=۰/۲۰) یافتند. لذا یافته‌های حاضر این احتمال را تقویت می‌نماید که در پی مصرف سطوح بالای آنتی‌بادی اختصاصی و کاهش غلظت واسطه‌های التهابی، نسبت آلبومین در سرم افزایش یافته و پروتئین‌های سرم به جای آنکه در مسیرهای التهابی به کارگرفته شوند می‌توانند به سوی مسیرهای متابولیکی هدایت شده و عملکرد تولیدی پرنده آلوده به عوامل پاتوژن را به نحو موثری تحت تاثیر قرار دهند.

واژه های کلیدی: آنتی بادی زرده تخم مرغ (IgY)، الگوی الکتروفورتیک پروتئین خون، ایمنی مخاطی، جوجه گوشتی

Effects of *Escherichia coli*-specific egg yolk antibody powder on intestinal mucosal immunity and blood protein electrophoretic patterns of broiler chicks

AH Mahdavi*[1] and HR Rahmani[1]

Received: September 07, 2011 Accepted: November 29, 2011
[1]Assistant Professor and [2]Associate professor, Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran
*Corresponding author: E mail: mahdavi@cc.iut.ac.ir

Abstract
The present study aimed at the investigation of dietary supplementation of different levels of specific egg yolk antibody (IgY) powder on intestinal mucosal immunity and serum protein electrophoretic patterns of *E. coli* O78:K80-challenged broiler chicks. For lyophilized antibody preparation, forty 36-week-old White Leghorn hens were hyperimmunized with *E. coli* O78:K80 bacteria for a 12-week-period and IgY was isolated from the eggs by the water-dilution method. Seven-day-age broiler chicks were challenged orally with 0.5 mL of *E. coli* O78:K80 suspension (except for the negative control). The challenge was continued for additional 7 days from day 14 to 21 with 1.0 mL of a late log phase culture (10^9 cfu/mL) until the level of *E. coli* in droppings reached to 10^5 cfu/g. A total of 280 broiler chicks were randomly assigned to 5 dietary treatments with 4 replicates of 14 chicks each. The four challenged-groups received a basal diet supplemented with 0 (as positive control), 0.1, 0.2, or 0.4% (wt/wt) IgY. The unchallenged-group, as negative control, fed the same unsupplemented diet. Oral infection caused increase in ileal *E. coli* enumeration, and induced systemic and mucosal inflammatory reactions. After three weeks of feeding, the levels of 0.2 and 0.4% IgY had the most suppressive effects ($P<0.01$) on the ileal *E. coli* enumeration and intestinal secretory IgA concentration. However, with at least 0.2% IgY, serum IgA concentration and the albumins to globulins ratio were slightly decreased ($P=0.36$) and increased ($P=0.20$), respectively. It was concluded that feeding high level of specific antibody powder, in addition to decreasing inflammatory factors, may increase the ratio of serum albumin. Therefore, the serum proteins can be directed toward metabolic pathways instead of being imposed on inflammatory pathways.

Keywords: Broiler chick, Egg yolk antibody (IgY), Mucosal immunity, Serum protein electrophoretic patterns

مقدمه

سیستم ایمنی مجموعه ای از بافت ها، سلول ها و مولکول هایی است که وظیفه اصلی فیزیولوژیک آنها حفاظت از محیط داخلی بدن از طریق از میان بردن ارگانیسم‌های عفونت‌زای مهاجم می‌باشد. اولین سد دفاعی بدن در برابر این ارگانیسم ها، پوست و مخاطات سیستم های تنفسی، گوارشی و ادراری-تناسلی است که در حقیقت سدهای فیزیکی و شیمیایی محکمی را در مقابل آنها به وجود می‌آورند. بسیاری از میکروارگانیسم‌ها به گونه ای تکامل یافته اند که می‌توانند در مقابل تخریب و برداشت فیزیکی مقاومت کرده و به درون سیستم های دفاعی بدن نفوذ کنند (استاینس و همکاران ۱۹۹۳). در سیستم ایمنی مخاطی، عمده‌ترین ایمونوگلوبولین IgA است و از آنجا که مجاری گوارشی و تنفسی دو مسیر معمول ورود میکروب ها می‌باشند، بیشترین مقادیر تولیدی IgA در این ارگان‌هاست. این ایمونوگلوبولین به دو صورت سرمی و ترشحی یافت شده و در حدود ۵ تا ۱۵ درصد گاما گلوبولین‌های

سرمی را تشکیل می دهند (mg/ml ۳/۵-۲/۸). در سیستم ایمنی مخاطی، تعویض کلاس IgA بیشتر و به طور موثرتری انجام می‌گیرد. چرا که در مقایسه با سایر بافت های لنفاوی، بیشترین مقدار IL-5،به عنوان عامل تعویض کلاس IgA، از سلول‌های T مخاطی ترشح می‌گردد. (پینکاک ۲۰۰۲). نکته قابل توجه آن است که به دنبال هجوم عوامل پاتوژن و ترشح آنتی بادی های مخاطی، آبشاری از واکنش های مهاری و التهابی بروز می نمایند که می‌توانند با تغییر الگوی پروتئینی خون، مسیر متابولیکی و عملکردی میزبان را تحت تاثیر قرار دهند (اسنوک و همکاران ۲۰۰۶).

عفونت‌های موضعی و سپتیسمی ایجاد شده توسط اشرشیاکلی، از مهم ترین دلایل ضررهای اقتصادی صنعت طیور و اولین عامل بروز کاهش رشد، کاهش تولید تخم مرغ، کاهش بازده غذایی، افت لاشه و مرگ و میر است (اورس و همکاران ۲۰۰۴). در سال‌های اخیر میزان شیوع و شدت کلی باسیلوز به سرعت افزایش یافته و به زودی به مشکلی بزرگتر در صنعت طیور تبدیل خواهد شد (آلتکروس و همکاران ۲۰۰۲). اگرچه اشرشیاکلی جزء جمعیت نرمال میکروبی دستگاه گوارش طیور است، اما مجموعه ای از آن که به عنوان آسیب رسان ترین سروتیپ اشرشیاکلی در طیور شناخته می‌شوند، اشرشیاکلی پاتوژن پرندگان (APEC) نامیده می‌شوند (دلیکاتو و همکاران ۲۰۰۳). مهم ترین سروتیپ‌های این مجموعه O۱:K۱، O۲:K۱ و O۷۸:K۸۰ می‌باشند که عوامل اصلی بروز کلی باسیلوز هستند (اورس و همکاران ۲۰۰۴). میزان شیوع آلودگی با APEC در گله ها حدود ۵۰ درصد و میزان مرگ و میر از ۵ درصد در شرایط عادی تا ۲۰ درصد تحت تأثیر یک مدیریت ناکارآمد و یا هم زمانی با عفونت‌های دیگر، متغیر است (دومولین و فربرادر ۱۹۹۹). مطالعات گسترده انجام شده حکایت از آن دارد که در بسیاری از گله‌های پرندگان گوشتی و تخم گذار درگیر با عفونت‌های اشرشیاکلی، سروتیپ O۷۸:K۸۰، سروتیپ غالب عفونت‌ها می باشد (ژاوو و همکاران ۲۰۰۵، مک پیک و همکاران ۲۰۰۵).

متاسفانه تلاش های انجام شده جهت حذف و یا کنترل عوامل میکروبی با موفقیت های محدودی همراه بوده است (کنزویک و پترویک ۲۰۰۸). اگرچه سال‌هاست که اثرات مثبت آنتی بیوتک های خوراکی در جهت مهار عوامل باکتریایی و هم چنین بهبود سرعت رشد ثابت گردیده است، اما با توجه به نگرانی های رو به گسترش جوامع انسانی مبنی بر حضور بقایای آنتی بیوتیکی در محصولات حیوانی و محیط زیست و هم چنین امکان انتقال و گسترش مقاومت‌های باکتریایی به انسان، تمایل جهت دستیابی به جایگزین هایی موثر، بی خطر و ارزان قیمت افزایش یافته است. آنتی‌بادی زرده تخم‌مرغ (IgY)، به عنوان یک افزودنی خوراکی، کاندیدای ارزشمندی برای به کارگیری موثر ایمنی غیرفعال در جهت حذف و یا کنترل عوامل میکروبی می‌باشد. استفاده از این ماده، مزیت‌های قابل توجهی هم چون مطابقت با آیین‌نامه‌های مدرن حمایتی حیوانات، مضر نبودن، ارزانی، سهولت دسترسی و عدم توسعه میکروب‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک را به همراه دارد (هاتا و همکاران ۱۹۹۷).

لذا با توجه به ویژگی های منحصر به فرد IgY، این احتمال وجود دارد که در پی مصرف خوراکی آن بتوان میزان ترشح آنتی بادی های مخاطی و به دنبال آن الگوی پروتئینی خون پرندگان را تغییر داده و از این طریق مسیرهای متابولیکی پرندگان را تحت تاثیر قرار داد.

مواد و روش ها

تهیه آنتی ژن

اشرشیاکلی O۷۸:K۸۰ مورد نیاز جهت آزمایشات *in vitro* و *in vivo*، به عنوان یکی از مهم‌ترین سروتیپ های اشرشیاکلی پاتوژن پرندگان، از موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی (کرج، ایران) فراهم آمد. برای تهیه آنتی ژن مورد نیاز جهت ایمونیزاسیون مرغ های تخم گذار، پس از دو مرحله کشت باکتری در محیط TSB و برآورد مقدار مورد نیاز جهت تزریق، باکتری مورد نظردر دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و با سرعت گردش ۱۸۰ دور در دقیقه به مدت ۶ ساعت (انتهای فاز لگاریتمی) کشت گردید. سپس

سلول ها توسط سانتریفیوژ با سرعت g × ۵۰۰۰ برای ۱۵ دقیقه و در دمای ۴ درجه سانتی گراد رسوب داده شدند. رسوب حاصله سه بار با بافر نمکی فسفات (PBS، pH=۷/۲) شستشو گردید و سپس برای حصول غلظت CFU/ml ۲×۱۰^۹، با PBS مخلوط گردید. برای تهیه واکسن کشته شده، ۱۰۰ میلی لیتر از سوسپانسیون باکتریایی، در شرایط حمام یخ، تحت تاثیر دستگاه سونیکاتور با حداکثر جریان برای ۱۵ دقیقه قرار گرفت. سپس برای استریل نمودن سوسپانسیون باکتریایی از فیلتر های ۰/۴۵ میکرومتری استفاده گردید که برای تایید آن، نمونه ای از سوسپانسیون استریل شده بر روی TSA کشت گردید. در نهایت واکسن به دست آمده، تا زمان استفاده در ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد.

تهیه آنتی بادی

اولین مرحله در تولید IgY، ایمونیزه نمودن مرغ‌های تخم گذار با آنتی ژن است. در آزمایش حاضر جهت تهیه آنتی بادی مورد نیاز، تعداد ۴۰ قطعه مرغ تخم‌گذار لگهورن ۳۶ هفته ایمونیزه گردیدند. این مرحله مطابق روش ران و همکاران (۲۰۰۵) انجام پذیرفت. به طوری که ابتدا در اولین ایمن سازی به ازاء هر مرغ ۰/۵ میلی لیتر سوسپانسیون حاوی CFU ۱۰^۹ باکتری اشرشیاکلی O۷۸:K۸۰ به همراه ۰/۵ میلی لیتر ادجوانت کامل فروند[۱] مخلوط و در دو جایگاه سینه ای به روش عضلانی تزریق گردید. تزریق‌های یادآور نیز دو و چهار هفته بعد از اولین ایمن سازی، به ترتیب با ادجوانت ناقص فروند[۲] و بدون ادجوانت انجام پذیرفت. تخم مرغ‌ها به صورت روزانه از هفته اول تا دوازدهم جمع آوری شده و تا زمان انجام آزمایشات در پایان هر هفته، در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری می شدند. جهت تهیه آنتی بادی، بخش محلول در آب (WSF) زرده تخم مرغ، به عنوان بخش حاوی IgY، با استفاده از روش آکیتا و ناکایی (۱۹۹۲) و با اندکی تغییرات استخراج گردید. بر اساس این روش ابتدا زرده تخم مرغ از سفیده جدا گردیده و پس از پاره نمودن غشاء زرده، حجم آن اندازه گیری شده و ۶ برابر حجم آن آب دوبار تقطیر اسیدی (pH=۲، تهیه شده با اسید کلریدریک ۰/۱ مولار) اضافه و خوب مخلوط شد تا pH آن در محدوده ۵/۲-۵ حفظ گردد. این مخلوط به مدت ۱۲ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شد و سپس با سرعت g × ۱۲۰۰۰ در دمای ۴ درجه سانتی گراد برای مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. محلول رویی پس از فیلتراسیون، به عنوان WSF جدا گردید و تا زمان استفاده در ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد. در زمان تهیه پودر IgY جهت اطمینان از عدم تداخل اثر pH پایین WSF بر رشد میکروب، قبل از تهیه پودر IgY، pH نمونه ها با استفاده از هیدروکسید سدیم ۰/۱ مولار به ۷ افزایش یافت و سپس با استفاده از دستگاه فریز درایر، WSF به صورت لیوفیلیزه درآمد.

غلظت پروتئین کل WSF و پودر IgY

غلظت پروتئین کل WSF و پودر IgY با بهره‌گیری از روش بردفورد (۱۹۷۶) و با استفاده از آلبومین سرم گاوی[۳] به عنوان پروتئین استاندارد، انجام پذیرفت. برای این منظور، پس از تهیه منحنی استاندارد و ایجاد رقت های مختلف با PBS، غلظت پروتئین کل در WSF و پودر IgY، در رقت های ۱:۱۰ و ۱:۴۰۰ محاسبه گردید.

برآورد فعالیت اختصاصی و غلظت IgY

فعالیت اختصاصی آنتی بادی در سرم پرندگان تخم‌گذار و WSF با استفاده از روش الیزای توصیه شده توسط مهدوی و همکاران (۲۰۱۰)، انجام پذیرفت و تیترها بر اساس میانگین±انحراف معیار لگاریتم بر پایه ۱۰ ضریب رقت، در نسبت جذب نوری نمونه‌ها به جذب نوری کنترل‌ها (سرم یا WSF حاصل از مرغ‌های غیر ایمونیزه) برآورد گردید.

برای برآورد غلظت IgY کل در WSF و پودر IgY از کیت اندازه گیری IgG جوجه[۴] شرکت Bethyl به

[۱و۲]- Biogen, Mashhad, Iran

[۳]- Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA

[۱]- Chicken IgG ELISA quantitation kit, E30-104, Bethyl Laboratories, Inc.,USA

همراه کیت شروع کننده[۱] بهره برده شد. در این مرحله نمونه های WSF و پودر IgY اختصاصی و غیر اختصاصی با رقت های ۱:۲۰۰۰۰ تهیه و به چاهک ها اضافه گردیدند.

آزمایشات مزرعه ای و جیره های غذایی

جهت انجام آزمایشات *in vivo*، جوجه های یک روزه گوشتی نژاد راس سویه ۳۰۸ تهیه و تا پایان هفته اول به صورت تجمعی با جیره آغازین تغذیه گردیدند. تعداد ۲۸۰ قطعه جوجه گوشتی هفت روزه به طور کاملاً تصادفی به پنج تیمار (چهار گروه آلوده شده با اشرشیاکلی و یک گروه غیر آلوده، به عنوان گروه کنترل منفی)، چهار تکرار و چهارده مشاهده در هر تکرار (۷ جوجه ماده و ۷ جوجه نر) تقسیم گردیدند. در روز هفتم همه جوجه ها به جز گروه کنترل منفی با ۰/۵ میلی لیتر محیط کشت حاوی 10^{9} CFU/ml اشرشیاکلی O۷۸:K۸۰ به روش خوراکی آلوده گردیدند. این عمل پس از گذشت هفت روز و در روزهای ۱۴ تا ۲۱ (به مدت هفت روز) با ۱ میلی لیتر از همان محیط کشت برای هر یک از جوجه‌ها انجام پذیرفت تا جمعیت اشرشیاکلی مدفوع به حدود 10^{5} CFU/g رسید. سپس سطوح مختلف آنتی‌بادی از روز ۲۱ تا ۴۲، در قالب یک طرح کاملاً تصادفی به چهار گروه آلوده عرضه گردید. چهار گروه آلوده شده با اشرشیاکلی، جیره های با انرژی و پروتئین مشابه را که با سطوح صفر (کنترل مثبت)، ۰/۱ ، ۰/۲ و ۰/۴ درصد آنتی‌بادی اختصاصی مکمل شده بودند دریافت نمودند. گروه کنترل منفی نیز جیره پایه مشابه و بدون افزودن آنتی‌بادی را دریافت کردند.

شمارش اشرشیاکلی ایلئومی در جوجه های گوشتی

در روزهای ۲۱و ۴۲، دو قطعه جوجه از هر تکرار به طور تصادفی انتخاب و محتوای ایلئوم در حد فاصل زائده مکل تا دریچه ایلئوسکال، با دقت جمع آوری گردید و درون قوطی‌های استریل موجود در مجاورت یخ ریخته و بلافاصله به آزمایشگاه منتقل شد. سپس یک گرم از مدفوع به طور متوالی با سرم فیزیولوژی (محلول نمک ۰/۸۵ درصد) تا رقت 10^{-6} رقیق گردید و سپس ۱۰۰ میکرولیتر از هر رقت با دو تکرار بر روی محیط کشت EMB-آگار کشت گردید. این محیط ها در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد برای ۲۴ ساعت نگهداری شد و پس از آن، کلنی های اشرشیاکلی مورد شمارش واقع گردیدند. برای تایید کلنی های شمارش شده، از تست‌های بیوشیمیایی واکنش‌های IMViC استفاده گردید. در نهایت تعداد واحد های تشکیل دهنده کلنی در هر پلت با استفاده از روش کشت سطحی مورد شمارش قرار گرفت تا تعداد CFU در هر گرم مدفوع محاسبه گردد.

تعیین میزان ایمونوگلوبولین A در سرم

در روز ۴۲، دو قطعه جوجه به طور تصادفی از هر تکرار انتخاب و برای اندازه گیری IgA سرمی و روده ای ذبح گردیدند. برای جدا سازی سرم، نمونه های خون به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت هزار دور در دقیقه سانتریفیوژ شده و سرم‌های حاصله تا آماده شدن کیت ELISA در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری گردیدند. کیت اندازه گیری میزان IgA جوجه[۲] به همراه کیت شروع کننده از شرکت Bethyl تهیه و مورد استفاده قرار گرفت. مراحل انجام آزمایش ELISA بر اساس راهنمای شرکت سازنده صورت پذیرفت.

میزان ایمونوگلوبولین A در بافت پوششی ژژنوم

جهت اندازه گیری میزان IgA بافت پوششی ژژنوم، حدود ۲ سانتی متر از ناحیه خلفی زائده مکل برداشته و به صورت طولی برش داده شد. سپس این نمونه توسط محلول بافر نمکی فسفات (PBS، pH=۷/۲) شستشو و در ظروف پلاستیکی در دار، بر روی یخ خشک به صورت منجمد نگهداری و در نهایت به فریزر منتقل گردید. برای تهیه شیرابه بافت پوششی روده، نمونه‌ها در دمای ۴ درجه سانتیگراد از حالت انجماد خارج شده و سپس بر سطحی از یخ که با ورقه آلومنیومی پوشانده شده بود مرحله جداسازی بافت پوششی انجام گرفت. تمامی مراحل در مجاورت یخ انجام شد تا تخریب پروتئینی به حداقل خود رسد.

[۱]- Chicken IgA ELISA quantitation kit, E30-103, Bethyl Laboratories, Inc., USA

[۲]- ELISA Starter accessory package

برداشتن بافت پوششی روده به وسیله تیغ جراحی صورت گرفت و بافت جدا شده از روی تیغ به لوله آزمایش منتقل و وزن کشی شد تا مقدار بافت تازه مورد آزمایش ثبت گردد. سپس ۴ برابر این میزان، بافر نمکی فسفات (PBS، pH=۷/۲) به بافت‌ها اضافه و به خوبی همگن شد و پس از آن، به مدت ۳۰ دقیقه با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه و دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ گردید. مایع شفاف رویی بعد از رقیق سازی در آزمایش ELISA مورد استفاده قرار گرفت. به علت اختلاف بین نمونه‌ها از لحاظ میزان آب بافت تازه، احتمال خطا وجود داشت. از این رو برای یکسان سازی اعداد بین نمونه‌ها، میزان ایمونوگلوبولین A بر حسب مقدار پروتئین نمونه بیان شد. برای این منظور میزان پروتئین شیرابه بافتی به روش بردفورد اندازه گیری و مقدار IgA بافتی به ازاء هر میلی گرم پروتئین گزارش گردید. مراحل انجام آزمایشات ELISA در این بخش هم چون مراحل اندازه گیری IgY بود، با این تفاوت که چاهک ها با ۱۰۰ میکرولیتر آنتی IgA جوجه پوشانده شد و آنتی IgA کنژوگه شده با آنزیم پرواکسیداز (HRP) با نسبت ۱:۷۵۰۰۰ با TBS-T[۱] رقیق گردید.

اندازه گیری جدایه های پروتئین سرم خون پرندگان

در روز ۴۲، دو قطعه جوجه به طور تصادفی از هر تکرار انتخاب و برای اندازه گیری جدایه های پروتئین سرمی ذبح گردیدند. غلظت سرمی پروتئین کل با استفاده از روش بیورت انجام گرفت. جهت بررسی نسبت آلبومین به گلوبولین، از روش الکتروفورز پروتئین سرم با استفاده از نوار استات سلولز بهره برده شد.

مدل و طرح آزمایش

آزمایشات *in vivo* بر پایه یک طرح کاملاً تصادفی با ۴ تیمار، ۴ تکرار و ۱۴ مشاهده در هر تکرار انجام گرفت. پس از ثبت و ویراش داده ها، تجزیه وتحلیل نهایی با استفاده ازرویه GLM نرم افزارSAS انجام شد (SAS ۲۰۰۱). میانگین داده ها با استفاده از روش حداقل مربعات مورد مقایسه قرار گرفتند. مقایسه گروه کنترل مثبت و منفی نیز جهت بررسی اثر آلوده نمودن جوجه‌های گوشتی با اشرشیاکلی، بر صفات مورد آزمون انجام شد. مدل آماری که جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها مورد استفاده قرارگرفت به صورت زیر می باشد.

$$Y_{ij} = \mu + A_i + e_{ij}$$

Y_{ijk}= مقدار هرمشاهده، μ= میانگین مشاهدات

A_i = اثر تیمار، e_{ijk} = اثرات باقی مانده

نتایج و بحث

ویژگی های پودر IgY

مطالعات اولیه ما نشان داد که پس از اولین ایمونیزاسیون، فعالیت اختصاصی آنتی‌بادی در سرم و زرده تخم‌مرغ مرغ‌های تخم گذار به سرعت افزایش یافت و به حدود ۴ برابر خود به ترتیب در روزهای ۷ و ۱۴ رسید. این افزایش در تمام دوره جمع آوری تخم مرغ (۱۲ هفته) در سطوح بالای خود باقی ماند. هرچند مقدار پروتئین پودر آنتی بادی اختصاصی و غیر اختصاصی (به دست آمده از تخم مرغ های غیر ایمونیزه) علیه اشرشیاکلی O۷۸:K۸۰ تفاوت معنی داری را نشان نداد، اما با این وجود غلظت IgY کل در آنتی‌بادی اختصاصی در حدود ۳۰ درصد بالاتر بود (مهدوی و همکاران ۲۰۱۰).

شمارش اشرشیاکلی ایلئومی در جوجه های گوشتی

پس از آلوده نمودن جوجه‌های گوشتی با اشرشیاکلی O۷۸:K۸۰ برای ۷ روز، جمعیت اشرشیاکلی در محتوای ایلئومی به طور بسیار معنی‌داری افزایش یافت و به حدود $۱۰^{۵}$ CFU/g مدفوع رسید (NC در مقایسه با PC، P<۰/۰۱). میانگین جمعیت اشرشیاکلی در نمونه های ایلئومی جوجه های آلوده شده در روز ۲۱، ۵/۳۹ ± ۰/۰۹ CFU/g ($\log_{۱۰}$CFU/g ± SE) مدفوع بود. این در حالی بود که جمعیت این باکتری در گروه غیر آلوده (کنترل منفی) CFU/g ۰/۰۵ ± ۳/۶۴ برآورد گردید (جدول ۱). در طول دوره آزمایش، جمعیت اشرشیاکلی محتوای ایلئومی جوجه های آلوده، به طوربسیار معنی داری بالاتر از گروه کنترل منفی حفظ گردید (NC در مقایسه با PC، P<۰/۰۱) که این امر

[۲]-50 m*M* Tris Buffered Saline, pH 8.0, and 0.05% Tween 20 **(TBS-T)**; Sigma,USA

علاوه بر امکان دسترسی پرنده به مدفوع، می‌تواند به دلیل امکان کلونیزاسیون باکتری مورد آزمون در دستگاه گوارش پرنده باشد. بدون شک مهم ترین مرحله در ایجاد کلونیزاسیون میکروبی و بروز بیماری، مرحله اتصال است. هرچند نقش انواع عوامل چسبنده هم چون، مژه های نوع یک، P، Curli، AC/I و هم چنین تاژک ها، عموماً در عفونت های تنفسی مرتبط با اشرشیاکلی مورد بررسی قرارگرفته است (دومولین و فربرادر ۱۹۹۹)، اما تحقیقات جالب توجه دیگری نیز بر مطالعه‌ی توانایی این باکتری ها، در اتصال به سلول‌های مخاطی روده متمرکز گردیده است. در این میان ادلمن و همکاران (۲۰۰۳) بیان داشتند که مژه نوع ۱ اشرشیاکلی O۷۸، به طورقابل توجهی می‌تواند به سلول های اپیتلیوم چینه دان، سلول های لامیناپروپریای روده، سلول‌های بالغ موجود در راس پرزها، سلول های نابالغ موجود در عمق کریپت، موکوس، ماکروفاژها و هم چنین سلول‌های مربوط به سیستم ایمنی مخاطی متصل گردد. آنها هم چنین گزارش نمودند که مژه AC/I نیز توانست به طور مشخصی به سلول های جامی پرزهای روده متصل گردد. مطالعات لاریجیون و همکاران (۲۰۰۰) نیز مؤید آن است که مژه های نوع ۱ و Curli و هم چنین تاژک های موجود بر روی سروتیپ O۷۸:K۸۰، دارای نقش های اساسی در اتصال باکتری به سلول های روده ای می‌باشند. لذا با عنایت به این نتایج و یافته های به دست آمده در آزمایش حاضر مبنی بر ابقای اشرشیاکلی در روده پرندگان آلوده برای بیش از سه هفته، می توان چنین پنداشت که این باکتری می تواند به خوبی با سلول‌های روده ای اتصال یافته و زمینه های بروز عفونت های گوارشی و سپتیسمی متعاقب آن را سبب گردد.

استفاده از سطوح مختلف آنتی بادی اختصاصی سبب بروز تفاوت های بسیار معنی داری در شمارش اشرشیاکلی ایلئومی جوجه های آلوده در روز ۴۲ گردید ($P<۰/۰۱$). در این میان، مؤثرترین سطوح در جهت کاهش جمعیت اشرشیاکلی ایلئومی به ترتیب سطوح ۰/۲ و ۰/۴ درصد آنتی بادی اختصاصی بودند. این یافته ها، با نتایج گزارشات قبلی مبنی بر اثرگذاری آنتی بادی اختصاصی حاصل از زرده تخم مرغ بر گونه های مختلف میکروبی موجود در روده حیوانات مختلف مطابقت کامل دارد (گیرارد و همکاران ۲۰۰۶ و ابراهیم و همکاران ۲۰۰۸). در مقابل این نتایج مثبت، گزارشاتی نیز حکایت از عدم تأثیرگذاری این مواد بر کلونیزاسیون روده ای عوامل پاتوژن دارند که عمده دلیل آن را مدت زمان کوتاه مصرف آنتی بادی می‌دانند (ویکی و همکاران ۲۰۰۶).

علاوه براین، عموماً پس از مصرف آنتی‌بادی‌های پلی کلنال به دست آمده از بخش های مختلف باکتری، واکنش های متقاطع آنتی بادی-آنتی ژن نیز بین آنتی‌بادی تولید شده و گونه های دیگر باکتریایی بروز می نماید. این امر به عنوان یک سودمندی خوشایند و اضافه بر خواص ویژه آنتی بادی اختصاصی، در جهت مهار تغذیه ای دیگر عوامل پاتوژن مورد توجه قرار گرفته است (لی و همکاران ۲۰۰۲). با این وجود، نتایج اکثر آزمایشات بیان گر آن است که بیشترین اثر مهاری آنتی بادی اختصاصی تنها بر روی باکتری‌های هومولوگ با باکتری هدف بروز کرده است (آمارال و همکاران ۲۰۰۸). لذا این امر نیز بسیار متحمل به نظر می‌رسد که با توجه به یافته های قبلی، کاهش تعداد اشرشیاکلی در نمونه های ایلئومی پرندگان آلوده عمدتاً مربوط به کاهش سروتیپ O۷۸:K۸۰ بوده باشد.

لذا بر طبق نتایج به دست آمده می توان سه عامل را در بهره برداری مؤثر و کار آمد از آنتی بادی اختصاصی دخیل دانست. ابتدا شناخت ویژگی های منحصر به فرد آنتی ژن جهت ایمونیزاسیون مرغ های تخم گذار و تولید آنتی بادی اختصاصی، و پس از آن شناخت مدت زمان و مقدار مصرف آنتی بادی جهت ایمونیزاسیون غیر فعال پایدار، پیوسته و مؤثر. بر این اساس با عنایت به یافته‌های ارائه شده در جدول شماره ۱ می توان پیشنهاد نمود که استفاده از حداقل ۰/۲ درصد آنتی‌بادی اختصاصی برای سه هفته می تواند جمعیت اشرشیاکلی نمونه‌های ایلئومی جوجه های آلوده را تا حدود یک لگاریتم نسبت به گروه کنترل مثبت کاهش دهد.

غلظت IgA سرمی و مخاطی (sIgA)

پس از آلوده نمودن گوارشی جوجه های گوشتی با اشرشیاکلی O۷۸:K۸۰، غلظت IgA سرمی افزایش یافت و این افزایش برای تمام طول دوره آزمایشی به طور بسیار معنی داری بالاتر از گروه کنترل منفی باقی ماند (P<۰/۰۱). این روند به صورت مشابه در غلظت sIgA ژژنومی نیز بروز نمود (جدول ۱). این نحوه پاسخ نشان‌گر آن است که اشرشیاکلی O۷۸:K۸۰ به عنوان یک باکتری انتروپاتوژنیک، توانایی القای تولید و ترشح IgA سرمی و مخاطی را به شکل بسیار گسترده ای دارا است.

امروزه به خوبی ثابت شده است که بروز پاسخ‌های ایمنی مخاطی، تحت تاثیر یک مکانیسم بسیار حساس بوده و نه تنها باکتری‌های انتروپاتوژن، بلکه باکتری‌های همزیست به عنوان پروبیوتیک نیز توانایی القای ترشح sIgA را دارا می باشند (پردیگون ۱۹۹۱). این رویداد عموماً در نتیجه یک مکانیسم پیوسته شامل اتصال و برداشت آنتی ژن توسط سلول های اپیتلیومی (خصوصاً سلول های M)، عرضه آنتی ژن به سلول های دندرتیک موجود در لامیناپروپریا برای معرفی به لنفوسیت‌های B، T و بیگانه خوارها، و در نهایت تولید و ترشح IgA سرمی و مخاطی، اتفاق می افتد (اسنوک ۲۰۰۶).

پس از مصرف سه هفته‌ای سطوح مختلف آنتی‌بادی اختصاصی در جوجه‌های آلوده شده با اشرشیاکلی مورد آزمون، غلظت sIgA در گروه هایی که سطوح ۰/۲ و ۰/۴ درصد آنتی بادی اختصاصی را دریافت داشته بودند، به طور بسیار معنی داری (P<۰/۰۱) پایین تر از دیگر گروه های آلوده بود. در این میان سطح ۰/۴ درصد آنتی بادی اختصاصی، بیشترین اثر را در کاهش غلظت sIgA جوجه های آلوده از خود نشان داده بود. این یافته‌ها، همسو با نتایج حاصل از شمارش اشرشیاکلی ایلئومی بودند.

جدول۱- اثر افزودن سطوح مختلف IgY اختصاصی (sIgY) در جیره جوجه های گوشتی بر شمارش اشرشیاکلی محتویات ایلئومی و غلظت IgA سرمی و مخاطی(sIgA).

	شمارش میکروبی محتویات ایلئومی (Log 10 CFU/گرم)		**غلظت IgA سرمی و مخاطی در ۴۲ روزگی**	
تیمار	روز ۲۱	روز ۴۲	IgA سرمی µg/ml	sIgA µg/mg protein
کنترل منفی (NC)[1]	۳/۶۴	۵/۰۷	۴۶۳/۶۲	۱۸/۰۷
کنترل مثبت (PC)[1]	۵/۱۷	[c]۶/۸۷	۷۲۱/۷۰	[c]۲۹/۲۸
sIgY (٪)				
۰/۱	۵/۴۴	[bc]۶/۷۱	۶۷۳/۶۰	[bc]۲۶/۵۲
۰/۲	۵/۳۶	[a]۵/۹۷	۶۶۳/۵۲	[ab]۲۳/۸۱
۰/۴	۵/۵۳	[a]۶/۱۴	۵۵۸/۰۰	[a]۲۰/۰۱
	(*P*-value)			
تیمارها[2]	۰/۵۳	<۰/۰۱	۰/۳۶	<۰/۰۱
اثر متقابل	<۰/۰۱	<۰/۰۱	<۰/۰۱	<۰/۰۱
NC در مقایسه با PC	۰/۰۸	۰/۰۷	۳۳/۱۹	۱/۰۵
SE				

[1] گروه های کنترل منفی و مثبت به ترتیب شامل پرندگان غیر آلوده و آلوده با اشرشیاکلی O۷۸:K۸۰ است که هیچ سطحی از آنتی بادی را دریافت ننموده اند.

[2] سطوح احتمال برآورد شده برای جوجه های آلوده با اشرشیاکلی O۷۸:K۸۰.

[a-c] میانگین های با حداقل یک حرف غیر مشابه از نظر آماری تفاوت معنی داری دارند.

همان گونه که در بخش قبل نیز ذکر گردید، افزودن دو سطح بالای آنتی بادی اختصاصی، موجب کاهش معنی‌داری در شمارش اشرشیاکلی ایلئومی جوجه‌های آلوده در روز ۴۲ گردیده بود. این امر سبب شده تا پس از سه هفته مصرف آنتی بادی، میزان تولید و ترشح sIgA تحت تاثیر قرار گرفته و کاهش یابد. بر خلاف این یافته ها، کاسایفی و ماین (۲۰۰۴) احتمال داده بودند که ترکیبات موجود در زرده تخم مرغ ممکن است مستقیماً بر مخاط روده اثر کرده و با تحریک تولید sIgA، جمعیت پاتوژن ها را کاهش دهد. اما یافته های ما نشان داد که آنتی بادی اختصاصی نه تنها غلظت sIgA را افزایش نداد، بلکه با کاهش شمار پاتوژن القا شده در روده، موجبات کاهش غلظت sIgA را نیز فراهم آورد.

هر چند استفاده از سطوح مختلف IgY سبب بروز تغییرات معنی داری در IgA سرمی نگردید، اما به نظر می رسد که بهره گیری از سطوح بالای آنتی بادی اختصاصی توانسته در یک سطح حاشیه ای (P=۰/۳۶) موجب کاهش غلظت IgA سرمی گردد. این یافته‌ها بیانگر آن است که تغییرات غلظت IgA سرمی می تواند انعکاسی از روند تغییرات در IgA مخاطی باشد. این وابستگی تغییرات توسط مطالعات موير و همکاران (۲۰۰۲) نیز تصدیق گردید. لذا به نظر می رسد که بهره‌گیری از سطح ۰/۴ درصد آنتی بادی اختصاصی (به عنوان مؤثرترین سطح در کاهش sIgA)، توانسته از طریق کاهش جمعیت باکتری پاتوژن مورد آزمون، تولید و ترشح sIgA و IgA سرمی (به عنوان یک متغیر وابسته به sIgA) را کاهش داده و به این واسطه موجب ممانعت از بروز واکنش های ایمونوژنیکی گردد که نتیجه آن در عملکرد رشد پرنده بروز خواهد نمود.

پروتئین کل سرمی و نسبت آلبومین به گلوبولین

از آنجا که پروتئین های موجود در سرم، دارای نقش های بسیار متعدد در موجودات مختلف می باشند، لذا مطالعه آنها می تواند معیاری مفید جهت بررسی وضعیت سلامت و تولید حیوان باشد (دنو و همکاران ۲۰۰۸).

پس از آلودگی جوجه ها با باکتری مورد آزمون، غلظت های پروتئین کل سرمی (P=۰/۰۳) وگلوبولین ها (P<۰/۰۱) افزایش و نسبت آلبومین سرمی به گلوبولین (P<۰/۰۱) کاهش معنی داری را نشان داد (جدول ۲). این کاهش در نسبت آلبومین به گلوبولین، عمدتاً در نتیجه افزایش گلوبولین های سرم بروز نموده بود. هرچند، غلظت آلبومین نیز به شکل غیر معنی داری کاهش یافته بود. این نحوه تغییر جدایه های پروتئین سرم که در نتیجه حضور عوامل پاتوژن ایجاد گردیده بود با نتایج کیلگاس و همکاران (۲۰۰۶) مطابقت دارد.

بر اساس مطالعات انجام شده، عموماً از نسبت آلبومین به گلوبولین به عنوان شاخص بررسی وضعیت متابولیک و یا تحریک سیستم ایمنی استفاده می شود (کیلگاس و همکاران ۲۰۰۶ و دنو و همکاران ۲۰۰۸). چرا که پروتئین آلبومین نقش های بسیار مهمی را در اجرایی نمودن فعالیت های متابولیکی بر عهده دارد که از آن جمله می‌توان به انتقال اسید های چرب بلند زنجیر، جابه‌جایی فلزات سنگین، ایجاد فشار اسمزی کلوئیدی پلاسما و انتقال هورمون های متابولیکی مهمی مانند کورتیزول، آلدوسترون و تیروکسین اشاره نمود (بورتیس و اشوود ۱۹۹۴). از سویی دیگر یافته های دنو و همکاران (۲۰۰۸) نشان دهنده آن است که پس از بروز عفونت های حاد و یا مزمن، گلوبولین‌های سرمی به دلیل تحت تأثیر قرار گرفتن غلظت پروتئین‌های مختلف سرمی دخیل در سیستم ایمنی همچون سایتوکین‌ها، پروتئین‌های فاز حاد، سرولوپلاسمین، ترانسفرین، هموپکسین، جزء سوم سیستم کمپلمان و یا ایمونوگلوبولین‌ها، افزایش یافته و به دنبال آن نسبت آلبومین کاهش می‌یابد. مؤید این نکته در آزمایش حاضر، افزایش غلظت IgA سرمی، به عنوان دومین ایمونوگلوبولین سرمی از لحاظ فراوانی است (موير و همکاران ۲۰۰۲) که تغییرات همسویی را با غلظت گلوبولین های سرمی نشان می‌دهد. نکته جالب توجه آن است که IgA ترشحی توانایی القای سیستم های التهابی و هجوم گروه های مختلف لوکوسیتی به محل مخاط را ندارد. این ویژگی منحصر به فرد سبب می شود تا در

شرایط حضور پاتوژن، آسیب های مخاطی حاصل از وجود لوکوسیت ها و یا فعالیت مسیرهای کمپلمان و به دنبال آن گسترش نفوذ پذیری دیواره مخاطی به حداقل خود برسد. حال آن که برخلاف IgA ترشحی، IgA سرمی به شدت می تواند از طریق القای سیستم‌های کمپلمان و افزایش فعالیت‌های التهابی، هم‌چون آزادسازی سایتوکین ها و یا افزایش تعداد لوکوسیت‌های با هسته های چند بخشی مانند هتروفیل ها، به عنوان یک آنتی بادی برانگیزنده سیستم ایمنی عمل نماید (اسنوک و همکاران ۲۰۰۶). لذا تغییر غلظت IgA سرمی می تواند عامل بسیار موثری بر تغییر الگوی الکتروفورتیک پروتئین سرم خون پرندگان باشد.

هرچند تغذیه سطوح مختلف آنتی‌بادی اختصاصی اثرات معنی داری را بر غلظت پروتئین کل، آلبومین و گلوبولین سرمی نداشت، اما نتایج ما نشان می دهد که به دنبال مصرف سطوح بالای آنتی بادی، نسبت آلبومین به گلوبولین تمایل به معنی داری داشته و در یک سطح حاشیه‌ای (P=۰/۲۰) افزایش یافته است. لذا یافته‌های مطالعه حاضر این احتمال را تقویت می نماید که در پی مصرف سطوح بالای آنتی بادی اختصاصی و کاهش غلظت واسطه های التهابی هم چون ایمونوگلوبولین‌های خون (برای مثال IgA سرمی)، نسبت آلبومین در سرم افزایش یافته و پروتئین های سرم به جای آن که در مسیرهای التهابی به کارگرفته شوند می توانند به سوی مسیرهای متابولیکی هدایت شده و عملکرد تولیدی پرنده را به نحو موثری تحت تاثیر قرار دهند.

نتیجه گیری کلی

نتایج مطالعه حاضر نشان دهنده آن است که در نتیجه استفاده از سطوح بالای پودر آنتی بادی اختصاصی (حداقل ۰/۲ درصد)، در جهت اعمال ایمنی غیر فعال خوراکی، جمعیت پاتوژن روده به طور معنی داری کاهش یافته و این امر سبب می گردد تا نیاز به تولید و ترشح IgA مخاطی و به دنبال آن غلظت واسطه های التهابی خون که در بخش گلوبولینی سرم حضور دارند کاهش یابد. به دنبال این تغییرات، نسبت آلبومین به عنوان شاخص عملکرد متابولیکی افزایش یافته و لذا احتمال تاثیر مثبت آنتی بادی اختصاصی بر عملکرد تولیدی پرندگان آلوده به عوامل پاتوژن تقویت می گردد.

جدول ۲- اثر افزودن سطوح مختلف IgY اختصاصی (sIgY) در جیره جوجه های گوشتی بر اجزای پروتئین سرم خون.

تیمار	*پروتئین کل (گرم در دسی لیتر)*	*آلبومین (گرم در دسی لیتر)*	*گلوبولین (گرم در دسی لیتر)*	**گلوبولین/آلبومین**
کنترل منفی (NC)[1]	۳/۴۶	۱/۵۱	۱/۹۵	۰/۷۷
کنترل مثبت (PC)[1]	۳/۹۲	۱/۴۱	۲/۵۱	۰/۵۶
sIgY (٪)				
۰/۱	۳/۷۱	۱/۲۳	۲/۴۸	۰/۵۰
۰/۲	۳/۶۲	۱/۳۴	۲/۳	۰/۵۸
۰/۴	۳/۶۸	۱/۴۴	۲/۲۵	۰/۶۴
		(*P*-value)		
تیمارها[2]	۰/۴۹	۰/۴۲	۰/۲۵	۰/۲۰
اثر متقابل	۰/۰۳	۰/۴۹	<۰/۰۱	<۰/۰۱
NC در مقایسه با PC	۰/۰۷	۰/۰۵	۰/۰۶	۰/۰۳
SE				

[1] گروه های کنترل منفی و مثبت به ترتیب شامل پرندگان غیر آلوده و آلوده با اشرشیاکلی O۷۸:K۸۰ است که هیچ سطحی از آنتی بادی را دریافت ننموده اند.

[2] سطوح احتمال برآورد شده برای جوجه های آلوده با اشرشیاکلی O۷۸:K۸۰.

منابع مورد استفاده

Akita EM and Nakai S, 1992. Immunoglobulins from egg yolk: Isolation and purification. J Food Sci 57: 629-634.

Altekruse SF, Elvinger F, Lee KY, Tollefson LK, Pierson EW, Eifert J and Sriranganathan N, 2002. Antimicrobial susceptibilities of *Escherichia coli* strains from a turkey operation. J Am Vet Med Assoc 221: 411-416.

Amaral JA, De Franco MT, Zapata-Quintanilla L and Carbonare SB, 2008. In vitro reactivity and growth inhibition of EPEC serotype O111 and STEC serotypes O111 and O157 by homologous and heterologous chicken egg yolk antibody. Vet Res Commun 32: 281-290.

Bradford MM, 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 72: 248-254.

Burtis CA and Ashwood ER, 1994. Tietz textbook of clinical chemistry. 2nd ed. W.B.Sunders CO. Philadelphia. pp: 735-736.

Delicato ER, De Brito BG, Gaziri LC and Vidotto MC, 2003. Virulence-associated genes in *Escherichia coli* isolates from poultry with colibacillosis. Vet Microbiol 94: 97-103.

De Neve L, Fargallo JA, Vergara P, Lemus JA, Jaren-Galan M and Luaces I, 2008. Effects of maternal carotenoid availability in relation to sex, parasite infection and health status of nestling kestrels (Falco tinnunculus) J Exp Biol 211: 1414-1425.

Dho-Moulin M and Fairbrother JM, 1999. Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). Vet Res 30: 299-316.

Edelman S, Leskelä S, Ron E, Apajalahti J and Korhonen TK, 2003. In vitro adhesion of an avian pathogenic *Escherichia coli* O78 strain to surfaces of the chicken intestinal tract and to ileal mucus. Vet Microb 91: 41-56.

Ewers C, JanBen T, KieBling S, Philipp HC and Wieler LH, 2004. Molecular epidemiology of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from colisepticaemia in poultry. Vet Microbiol 104: 91-101.

Girard F, Batisson I, Martinez G, Breton C, Harel J and Fairbrother JM, 2006. Use of virulence factor specific egg yolk-derived immunoglobulins as a promising alternative to antibiotics for prevention of attaching and effacing *Escherichia coli* infections. FEMS Immunol Med Mic 46: 340-350.

Hatta H, Ozeki M and Tsuda K, 1997. Egg yolk antibody IgY and its application. PP. 151-178. In: Yamamoto T, Juneja LR, Hatta H and Kim M (Eds.), Hen eggs: Their- basic and applied science. CRC press.

Ibrahim El-SM, Rahman AK, Isoda R, Umeda K, Van Sa N and Kodama Y, 2008. In vitro and in vivo effectiveness of egg yolk antibody against *Candida albicans* (anti-CA IgY). Vaccine 26: 2073-2080.

Kassaify ZG and Mine Y, 2004. Nonimmunized egg yolk powder can suppress the colonization of *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* O157:H7, and *Campylobacter jejuni* in laying hens. Poult Sci 83: 1497-1506.

Kilgas P, Tilgar V and Mand R, 2006. Hematological health state indices predict local survival in a small passerine bird, the great tit (Parus major). Physiol Biochem Zool 79: 565-572.

Knezevic P and Petrovic O, 2008. Antibiotic resistance of commensal *Escherichia coli* of food-producing animals from three Vojvodinian farms, Serbia. Int J Antimicrob Agents 31: 360-363.

La Ragione RM, Cooley WA and Woodward MJ, 2000. The role of fimbriae and flagella in the adherence of avian strains of *Escherichia coli* O78:K80 to tissue culture cells and tracheal and gut explants. J Med Microbiol 49: 327-338.

Lee EN, Sunwoo HH, Menninen K and Sim JS, 2002. In vitro studies of chicken egg yolk antibody (IgY) against *Salmonella enteritidis* and *Salmonella typhimurium*. Poult Sci 81: 632-641.

Mahdavi AH, Rahmani HR, Nili N, Samie AH and Soleimanian-Zad S, 2010. Chicken Egg Yolk Antibody (IgY) Powder Against Escherichia coli O78:K80. J Anim Vet Adv 9: 366-373.

McPeake SJ, Smyth JA and Ball HJ, 2005. Characterisation of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) associated with colisepticemia compared to faecal isolates from healthy birds. Vet Microbiol 110: 245-253.

Muir WI, Husband AJ and Bryden WL. 2002. Dietary supplementation with vitamin E modulates avian intestinal immunity. Br J Nutr 87: 579-585.

Perdigon G, Alvarez S and Pesce de Ruiz Holgado A, 1991. Immunoadjuvant activity of oral *Lactobacillus casei*: influence of dose on secretory immune response and protective capacity in intestinal infections. J Dairy Res 58: 485-496.

Pinchuk G, 2002. Schaum's outline of theory and problems of immunology. McGraw-Hill, New York.

Ruan GP, Ma L, He XW, Meng MJ, Zhu Y, Zhou MQ, Hu ZM and Wang XN, 2005. Efficient production, purification, and application of egg yolk antibodies against human HLA-A*0201 heavy chain and light chain (β2m). Protein Expr Purif 44: 45-51.

SAS Institute. 2001. SAS User's Guide. Version 8.02 ed. SAS Institute Inc., Cary, NC.

Snoeck V, Peters IR and Cox E, 2006. The IgA system: a comparison of structure and function in different species. Vet Res 37: 455-467.

Staines N, Brostoff J and James K, 1993. Introducing Immunology, 2nd ed, Mosby, London.

Wilkie DC, Van Kessel AG, Dumonceaux TJ and Drew MD, 2006. The effect of hen-egg antibodies on *Clostridium perfringens* colonization in the gastrointestinal tract of broiler chickens. Prev Vet Med 74: 279-292.

Zhao S, Maurer JJ, Hubert S, De Villena JF, McDermott PF, Meng J, Ayers S, English L and White DG, 2005. Antimicrobial susceptibility and molecular characterization of avian pathogenic *Escherichia coli* isolates. Vet Microbiol 107: 215-224.