

NGHIÊN CỨU CHẾ TẠO KHÁNG THỂ TỪ LÒNG ĐỎ TRỨNG GÀ (IgY) KHÁNG VI KHUẨN *EDWARDSIELLA ICTALURI* GÂY BỆNH MỦ GAN Ở CÁ TRA

Lê Văn Đông*; Dương Hương Giang** và CS

TÓM TẮT

Bệnh mủ gan thường xuyên gây thiệt hại lớn cho cá tra, mặt hàng thủy sản có giá trị kinh tế lớn của nước ta. Nguyên nhân gây bệnh là do vi khuẩn (VK) *E. ictaluri*. Hiện nay, VK này đã có dấu hiệu kháng kháng sinh, từ đó đề tài này được tiến hành nhằm chế tạo kháng thể kháng *E. ictaluri* từ trứng gà làm nguyên liệu phát triển kit chẩn đoán và chế phẩm trị liệu miễn dịch thụ động chống bệnh mủ gan cho cá. Từ trứng gà đã gây miễn dịch với kháng nguyên VK *E. ictaluri* để ra khi đã có kháng thể đặc hiệu trong máu, tiến hành tách chiết, tinh sạch IgY từ lòng đỏ trứng và khảo sát hoạt tính ức chế VK. Kết quả: đã tách chiết và tinh sạch được kháng thể IgY tinh khiết từ trứng gà bằng quy trình 3 bước phối hợp phương pháp kết tủa protein với sắc ký trao đổi ion. Sản phẩm thu được có độ tinh khiết cao, có nồng độ > 125 µg/ml, có khả năng gây ngưng kết VK *E. ictaluri* với mật độ 10^9 VK/ml trong môi trường lỏng và > 60 µg/ml ức chế nhân lên trên môi trường thạch.

* Từ khoá: Kháng thể IgY; Tách chiết tinh sạch kháng thể IgY; Vi khuẩn *E. ictaluri*.

PRODUCTION OF CHICKEN EGG YOLK ANTIBODY (IgY) TO *EDWARDSIELLA ICTALURI* -THE CAUSATIVE PATHOGEN OF LIVER PUS DISEASE IN CATFISH

SUMMARY

The liver pus disease often causes major losses in catfish farming - an important economical input of Vietnam. The causative pathogen has been identified to be E. ictaluri. This bacteria has shown resistance to some antibiotics. Since then this research was carried out to produce chicken egg yolk antibody (IgY) to E. ictaluri to be used as starting material for the development of diagnostic kits and passive immunotherapy preparation for liver pus disease in catfish. The eggs layed by hens hyper-immunized with E. ictaluri bacterial antigen were used. IgY antibody was extracted and purified from egg yolk then evaluated for the bacterial inhibition activity. Purified IgY has been obtained by combination of precipitation and ion exchange chromatography methods. The IgY preparation is pure and having bacterial agglutination at 10^9 bacteria/ml in solution at 125 µg/ml and total inhibition on solid medium at 60 µg/ml.

* Key words: IgY antibody; IgY extraction and purification; *E. ictaluri*.

* Học viện Quân y

** Đại học Cần Thơ

Phản biện khoa học: TS. Nguyễn Đặng Dũng

ĐẶT VẤN ĐỀ

Cá tra là mặt hàng thủy sản có giá trị kinh tế và xuất khẩu nước ta, đặc biệt là các tỉnh Đồng bằng sông Cửu Long. Tuy nhiên, loài cá này luôn bị các loại bệnh dịch thủy sản đe dọa, trong đó có bệnh mù gan, gây thiệt hại nghiêm trọng cho nghề cá [2]. Nguyên nhân gây bệnh do VK *E. ictaluri* gây ra [4, 5]. Cho đến nay, các biện pháp phòng và chữa bệnh chủ yếu vẫn là sử dụng thuốc sát trùng và kháng sinh. Tuy nhiên, sử dụng thuốc sát trùng thường để lại hậu quả nghiêm trọng về môi trường. Mặt khác, thuốc kháng sinh cũng có nguy cơ dẫn đến phá vỡ hệ VK chí trong môi trường, huỷ diệt các loại vi sinh vật không gây bệnh có lợi, tạo ra các chủng vi sinh vật gây bệnh kháng kháng sinh. Hơn thế nữa, thuốc kháng sinh có thể gây ra hiện tượng chuyển gen kháng thuốc cho những loại VK khác chưa hề tiếp xúc với kháng sinh. Vì thế, tồn dư thuốc sát trùng và kháng sinh trong thực phẩm luôn là vấn đề được quan tâm hàng đầu của các cơ quan quản lý an toàn vệ sinh thực phẩm của mỗi quốc gia cũng như những đơn vị xuất nhập khẩu thực phẩm [2, 5].

Trước tình hình trên, cần có các chế phẩm sinh học không độc, chứa những thành phần có tác dụng ức chế và tiêu diệt đặc hiệu mầm bệnh gây bệnh, khi đưa vào môi trường nuôi cá có thể phòng và chữa được bệnh cho cá. Những yêu cầu này có thể được giải quyết thông qua miễn dịch trị liệu thụ động sử dụng kháng thể đặc hiệu chống mầm bệnh *E. ictaluri* bổ sung vào thức ăn cho cá [11]. Để đạt được mục tiêu này cần có những phương pháp sản xuất kháng thể với số lượng lớn và giá rẻ. Công

nghệ chế tạo kháng thể IgY ở gà đã được chứng minh có khả năng đáp ứng được các yêu cầu trên do kháng thể IgY từ máu gà mái được chuyển qua và tích tụ trong lòng đỏ trứng của chúng, nên khi sản xuất IgY, chỉ cần gây miễn dịch cho gà mái và thu hoạch trứng do chúng đẻ ra có kháng thể [6, 11]. Trên thế giới, các tác giả sử dụng IgY đặc hiệu mầm bệnh để chữa bệnh cho các loài lươn và cá [8, 12]. Từ đó, đề tài nghiên cứu này được tiến hành nhằm mục tiêu chế tạo kháng thể từ lòng đỏ trứng gà (IgY) kháng VK *E. ictaluri* làm nguyên liệu để phát triển kit chẩn đoán, làm thức ăn dự phòng và trị liệu bệnh mù gan cho cá tra theo phương pháp miễn dịch thụ động.

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Đối tượng nghiên cứu.

Trứng gà mái được gây miễn dịch với VK *E. ictaluri* đã tạo kháng thể với hiệu giá cao trong máu và trứng gà, là sản phẩm của nghiên cứu trước của chúng tôi [1]; hóa chất vật tư tiêu hao và thiết bị dùng cho nuôi cấy VK *E. ictaluri*, phản ứng ELISA, sắc ký trao đổi ion, điện di SDS-PAGE đều đạt tiêu chuẩn phân tích và do các hãng Sigma, Merck, Bio-Rad cung cấp.

2. Phương pháp nghiên cứu.

2.1. Tách chiết, tinh sạch IgY từ lòng đỏ trứng:

Tách chiết kháng thể IgY từ lòng đỏ trứng gà đã có hiệu giá kháng thể trong máu kiểm tra bằng phản ứng ELISA cao > 16.000. Tinh sạch IgY dựa theo quy trình đã được Bizhanov (2000) và Ko (2006) mô tả, có cải tiến cho

phù hợp với điều kiện của phòng thí nghiệm [3, 10].

- Bước 1: loại bỏ lipid, thu protein toàn phần của lòng đỏ trứng: tách lòng đỏ trứng, đánh tan thành huyền dịch, sau đó pha loãng với nước cất được chỉnh pH = 6,0 với thể tích 1:9 lòng đỏ trứng:nước cất để ở 4°C qua đêm. Thu phần dịch nổi lọc qua giấy lọc Whatman No1 bỏ cặn.

- Bước 2: kết tủa kháng thể bằng muối sulphat amôn (SA): tủa phân đoạn dung dịch lọc chứa IgY bằng muối SA với nồng độ bão hòa tăng dần từ 20 - 80% ở 4°C trong 2 giờ. Ly tâm bỏ dịch nổi thu phần cặn kết tủa.

- Bước 3: tinh sạch IgY bằng sắc ký trao đổi ion: sử dụng cột trao đổi ion dương SP-streamline trên hệ thống sắc ký áp suất thấp Biologic-LP của hãng BioRad. Thẩm tích sản phẩm sau kết tủa bằng SA với dung dịch đệm citrate phosphate 20 mM, pH 5,0. Sau đó, cho dung dịch protein qua cột trao đổi ion đã cân bằng trước với đệm citrate nói trên, tốc độ dòng chảy 1 ml/phút. Sau khi mẫu cho hết qua cột, rửa cột bằng dung dịch đệm trên để loại protein không bám trên cột. Rửa giải protein bám trên cột bằng cách tăng dần pH của dung dịch đệm citrate phosphate, từ pH 5,0 đến pH 6,4 với thể tích 100 ml, mỗi phân đoạn (ống nghiệm) chứa 2 ml.

Sản phẩm protein thu được ở mỗi bước đều kiểm tra bằng ELISA, tìm sự có mặt của kháng thể IgY đặc hiệu với *E. ictaluri* như mô tả trong nghiên cứu trước của chúng tôi [1]; định lượng nồng độ bằng phương pháp Bradford và điện di SDS-PAGE, kiểm tra độ tinh sạch của protein thu được.

2.2. Phản ứng ngưng kết VK trong môi trường lòng:

Dung dịch IgY sau khi tinh sạch, pha loãng bậc hai với PBS trong giếng đáy hình chữ U của phiến nhựa 96 giếng. Sinh khối VK *E. ictaluri* sau khi nuôi cấy, thu hoạch và rửa 3 lần với PBS, sau đó tạo huyền dịch 10^9 VK/ml và cho lượng bằng nhau vào kháng thể đã pha ở những nồng độ khác nhau trong giếng của phiến nhựa. Ủ ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ, sau đó đánh giá hiện tượng ngưng kết VK bằng 2 cách. Cách 1: lấy 10 μ l dịch ủ cho lên lam kính và quan sát ngưng kết VK dưới kính hiển vi, phóng đại 6.000 lần, đánh giá kích thước và số lượng các đám VK ngưng kết. Cách 2: để lắng tự nhiên ở 4°C qua đêm, quan sát hình ảnh có tạo đám ngưng kết hay VK không bị ngưng kết nằm tập trung chủ yếu ở trung tâm của đáy giếng chữ U.

2.3. Phản ứng ức chế VK trên môi trường thạch:

Chế phẩm IgY sau tinh sạch bằng sắc ký, lọc vô khuẩn bằng phương pháp lọc với màng lọc kích thước 0,22 μ m, sau đó cho 1 ml kháng thể ở nồng độ từ 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 và 1,0 mg/ml vào đĩa petri có thể tích 10 ml môi trường thạch BHI. Đĩa đối chứng không có IgY. Ủ trong 4 giờ ở 37°C để kháng thể khuếch tán vào trong môi trường. 10 μ l VK *E. ictaluri* cấy trải trên đĩa môi trường với IgY ở nồng độ như trên. Nuôi cấy ở 28°C trong tủ ủ, sau 48 giờ quan sát sự phát triển của khuẩn lạc.

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ BÀN LUẬN

1. Tách chiết, tinh sạch IgY.

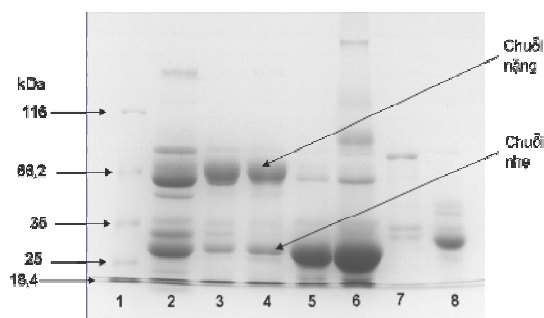
Tách chiết protein toàn phần từ 1 lòng đỏ trứng gà (18 ml) bằng nước cất lạnh với tỷ lệ lòng đỏ trứng: nước cất là 1:9, sau đó

kết tủa protein với SA ở nồng độ bão hòa

Bảng 1: Sản lượng protein và hoạt tính kháng thể thu được sau tủa phân đoạn.

NỒNG ĐỘ SA BÃO HÒA	10%	20%	30%	40%	50%	60%	70%	80%
Lượng protein thu được (mg) từ 18 ml lòng đỏ trứng	0	0	37,6	134	93,3	55	11,3	1,4
Hoạt tính IgY	-	-	++	+++	+	-	-	-

Các phân đoạn từ 10% và 20% SA bão hòa không thấy có protein kết tủa. Protein bắt đầu kết tủa ở nồng độ SA 30 - 60% bão hòa và đạt cao nhất ở nồng độ SA 40% bão hòa. Khảo sát hoạt tính kháng thể đặc hiệu với *E. ictaluri* cho thấy: phân đoạn protein ở 30% và 40% SA bão hòa có hoạt tính kháng thể mạnh nhất. Riêng phân đoạn 50% SA bão hòa, mặc dù có hàm lượng protein cao, nhưng hoạt tính IgY lại rất thấp. Đây có thể là phần lớn các protein tạp tách chiết tập trung ở phân đoạn này. Phân đoạn tủa ở nồng độ cao hơn 50% SA bão hòa có lượng protein rất thấp và hầu như không có hoạt tính IgY. Có thể thấy, bằng cách tủa phân đoạn với SA bước đầu đã phân lập được phân đoạn protein có hàm lượng kháng thể cao, tập trung chủ yếu ở nồng độ SA trong khoảng 30 - 40% bão hòa. Kết quả này tương tự với nghiên cứu của Ko và Ahn (2006), khi tủa phân đoạn IgY bằng muối SA ở nồng độ 40% và pH 5,0 [10].

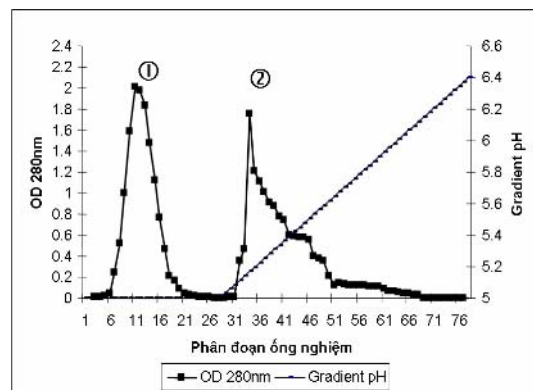


Hình 1: Kết quả điện di SDS-PAGE trong điều kiện biến tính sản phẩm sau tủa phân đoạn. (Ghi chú: 1: Protein chuẩn; 2: Dung dịch protein toàn phần sau loại lipid; Từ 3 - 8: Các phân

khác nhau, tăng dần từ 10 - 80%.

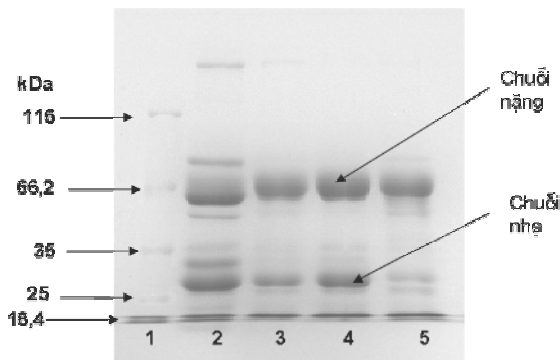
đoạn tủa tương ứng từ 30, 40, 50, 60, 70 và 80% SA bão hòa).

Đánh giá độ tinh sạch kháng thể IgY sau khi tách chiết bằng nước cất từ lòng đỏ trứng gà và tủa phân đoạn với SA bão hòa bằng kỹ thuật điện di trên gel (SDS-PAGE) trong điều kiện biến tính bằng β -mercaptoethanol. Hình 1 cho thấy thành phần protein toàn phần trong dung dịch tách chiết bằng nước cất khá đa dạng (hàng 2). Riêng các phân đoạn protein ở 30 và 40% SA bão hòa (hàng 3 và 4) có các băng protein với kích thước tương ứng chuỗi nặng (66,2 kDa) và chuỗi nhẹ (27 kDa) của IgY như đã được Shimizu và CS công bố trước đây [11]. Các phân đoạn protein có hoạt tính IgY mạnh ở 30 - 40% SA bão hòa có hình ảnh rõ ràng và khá sạch so với khi chưa kết tủa. Có thể thấy rõ những phân đoạn còn lại (hàng 5 - 8) chứa hầu hết protein tạp có trong lòng đỏ trứng. Như vậy, kết quả điện di cũng phù hợp với kết quả đánh giá hoạt tính kháng thể. Kết quả này cho thấy: phương pháp kết tủa phân đoạn bằng muối SA bão hòa bước đầu đã loại được phần lớn protein tạp tách chiết từ lòng đỏ trứng gà và nồng độ SA bão hòa khác nhau sẽ kết tủa protein khác nhau.



Hình 2: Sắc ký đồ trao đổi ion tinh sạch IgY bằng cột SP-streamline.

Phân đoạn protein tủa ở 40% SA bão hòa được phân tách tiếp bằng sắc ký trao đổi ion. Sắc ký đồ ở hình 2 cho thấy có 2 đỉnh protein. Đỉnh 1 là protein không bám vào cột và được đẩy ra cùng với dung dịch đệm ở giai đoạn rửa cột ở pH 5,0. Đỉnh 2 là phân đoạn protein được đẩy ra khỏi cột trong khoảng pH 5,2. Kết quả khảo sát hoạt tính kháng thể đặc hiệu kháng VK *E. ictaluri* cho thấy: phân đoạn ở đỉnh 1 không có hoạt tính kháng thể, có thể thấy đây là protein tạp. Phân đoạn ở đỉnh 2 có hoạt tính kháng thể mạnh với *E. ictaluri*.



Hình 3: Kết quả điện di SDS-PAGE trong điều kiện biến tính các sản phẩm sau mỗi bước tách chiết, tinh sạch IgY từ lòng đỏ trứng gà.

(Ghi chú: 1: Protein marker; 2: Protein toàn phần tách bằng nước cất; 3: Protein sau kết tủa bằng SA 40% bão hòa; 4: Phân đoạn bám cột sắc ký trao đổi ion (đỉnh 2); 5: Phân đoạn không bám cột sắc ký trao đổi ion (đỉnh 1).

Hình 3 là kết quả điện di SDS-PAGE trong điều kiện biến tính sản phẩm sau từng bước tách chiết, tinh sạch IgY. Đỉnh 2 sau sắc ký (hàng 4) có thành phần protein giống như thành phần protein trước khi qua cột của phân đoạn kết tủa ở 40% SA bão hòa (hàng 3), gồm các chuỗi nặng (66,2 kDa) và chuỗi nhẹ (27 kDa). Đỉnh 1 sau sắc ký (hàng 5) chứa phần lớn protein có trọng lượng phân tử tương tự với chuỗi nặng, nhưng thành phần tương ứng với chuỗi nhẹ

lại rất mờ nhạt. Điều này cho thấy đây là các protein có kích thước gần giống chuỗi nặng của IgY và cùng kết tủa đồng thời với IgY trong phân đoạn 30 - 40% SA bão hòa. Protein này chỉ có thể loại bỏ được sau khi qua sắc ký trao đổi ion.

Từ các kết quả trên cho thấy protein toàn phần từ lòng đỏ trứng sau tách bằng nước cất chứa rất nhiều protein tạp. Các protein này được loại bỏ lần lượt bằng tủa phân đoạn với SA bão hòa và sắc ký trao đổi ion dương trên cột SP-streamline. Quy trình tinh sạch này tương đối đơn giản, cho IgY có độ tinh sạch cao hơn, trên SDS-PAGE thành phần protein tạp ít hơn nhiều so với sử dụng sắc ký ái lực trên cột T-gel [9], hay Gradiflow [7].

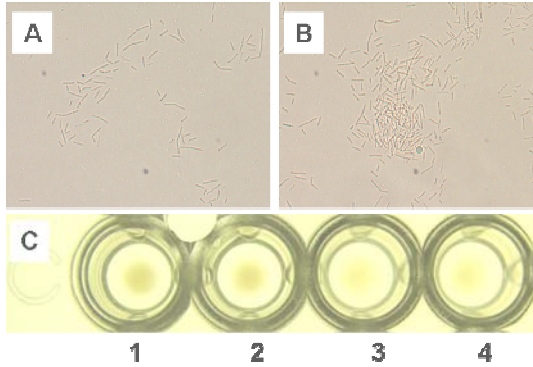
Bảng 2: Hiệu suất thu hồi protein qua các bước tách chiết và tinh sạch IgY.

IgY	THỂ TÍCH (ml)	NỒNG ĐỘ (mg/ml)	TỔNG LƯỢNG (mg)	HIỆU SUẤT THU HỒI PROTEIN (%)
Tách chiết bằng nước cất	190	2,3	437	100
Sau tủa bằng muối SA	47	2,85	134	30,7
Sau sắc ký trao đổi ion	93	1,09	101	23,2

Đánh giá chung quy trình tách chiết, tinh sạch kháng thể IgY kháng VK *E. ictaluri* từ lòng đỏ trứng gà. Từ 1 quả trứng với trung bình 18 ml lòng đỏ, thu nhận được 101 mg IgY. Hàm lượng IgY nhận được trong nghiên cứu này cao hơn so với báo cáo của một số tác giả khác [6, 9]. Gee và CS (2003) tách chiết IgY từ lòng đỏ trứng bằng cách loại lipid với PEG, sau đó tinh sạch bằng cột Gradiflow thu được trung bình 40 mg IgY/1 trứng [7]. Hansen và CS (1998) sử dụng muối sodium sunphate 20% kết hợp với sắc

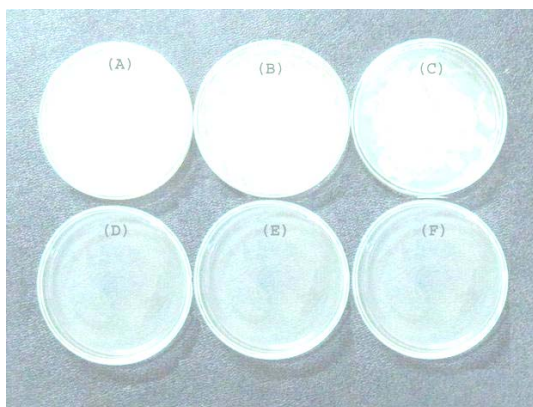
ký ái lực (T-gel chromatography) thu được

2. Hoạt tính của chế phẩm IgY.



Hình 4: Các mức độ ngưng kết tế bào VK. (Ghi chú: A và B: Nhìn dưới kính hiển vi (A: Không ngưng kết; B: Ngưng kết); C: Quan sát trực tiếp giếng nhựa (C1,2: Không ngưng kết; C3,4: Ngưng kết).

Quan sát dưới kính hiển vi cho thấy hình ảnh không ngưng kết (ảnh A) và ngưng kết (ảnh B) có độ tương phản rõ rệt. Quan sát trực tiếp phản ứng ngưng kết trong phiến nhựa đáy hình chữ U (ảnh C) thấy các giếng 1 và 2 VK không bị ngưng kết, nằm tập trung ở trung tâm của đáy giếng. Các giếng 3, 4 có hình ảnh VK nằm phân tán rải rác khắp bề mặt giếng do bị ngưng kết không dồn tập trung về trung tâm đáy giếng theo trọng lực như ở giếng không ngưng kết. Nồng độ IgY tối thiểu gây ngưng kết được VK là 125 µg/ml.



khoảng từ 26,8 - 51 mg/1 trứng gà [9].

Hình 5: Sự phát triển của VK *E. ictaluri* trên môi trường thạch BHI có IgY.

(Ghi chú: Đĩa A: Chứng âm không có IgY; Đĩa B - F: Có IgY (B: 20, C: 40; D: 60; E: 80; F: 100 µg/ml).

Kết quả cho thấy ở nồng độ IgY là 20 µg/ml (đĩa B), khuẩn lạc phát triển gần tương tự với đối chứng không có IgY (đĩa A). Ở nồng độ IgY là 40 µg/ml, khuẩn lạc phát triển ít hơn (đĩa C). Ở nồng độ IgY ≥ 60 µg/ml (đĩa D, E, F), sự phát triển của VK bị ức chế hoàn toàn.

Kháng thể IgY kháng VK *E. ictaluri* tinh sạch từ lòng đỏ trứng gà gây miễn dịch với *E. ictaluri* có khả năng gây ngưng kết và ức chế sự phát triển của VK. Mặc dù nồng độ kháng thể ≥ 60 µg/ml đã ức chế hoàn toàn sự phát triển của VK trên môi trường thạch, nhưng để ngưng kết được VK ở mật độ 10⁹ VK/ml cần nồng độ ≥ 125 µg/ml. Điều này có thể do độ nhạy của kỹ thuật ngưng kết không cao, mật độ thực tế của 10 µl VK khi trải đều ra khắp đĩa thạch đã giảm đi, do vậy lượng kháng thể trong thạch dù ở nồng độ thấp hơn nhưng cũng đủ để gây bất hoạt VK.

KẾT LUẬN

Đã chế tạo được kháng thể IgY kháng VK *E. ictaluri* từ lòng đỏ trứng gà bằng quy trình 3 bước: tách protein toàn phần và loại lipid bằng nước cất để lạnh ở 4°C; rửa phân đoạn bằng muối sulphat amôn và sắc ký trao đổi ion dương trên cột SP-Streamline. Sản phẩm IgY tinh sạch thu được từ nồng độ ≥ 125 µg/ml có khả năng gây ngưng kết VK ở mật độ 10⁹ VK/ml trong môi trường lỏng và từ nồng độ ≥ 60 µg/ml ức chế hoàn toàn sự phát triển của VK trong môi trường

thạch. Sản phẩm này có thể dùng làm nguyên liệu để phát triển kit chẩn đoán, cũng như tạo chế phẩm miễn dịch trị liệu thụ động chống *E. ictaluri*.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Hoàng Trung Kiên, Đỗ Khắc Đại và CS. Nghiên cứu chế tạo kháng thể kháng *Edwardsiella ictaluri* gây bệnh mũ gan ở cá tra bằng công nghệ tạo kháng thể IgY ở gà. Tạp chí Thông tin y dược, số chuyên đề Miễn dịch học. 2010, tr.71-76.

2. Đặng Thị Hoàng Oanh, Trần Thị Tuyết Hoa, Từ Thanh Dung. Giáo trình bệnh học thủy sản. Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ. 2005.

3. Bizhanov G., Vyshniauskis G. A comparison of three methods for extracting IgY from the egg yolk of hens immunized with Sendai virus. Veterinary Research Communications. 2000, Vol 24 (2), pp.103-113.

4. Crumlish M., Dung T.T. et al. Identification of *Edwardsiella ictaluri* from disease fresh water catfish *Pangasius hypophthalmus* (sauvage) culture in Mekong Delta, Vietnam. J Fish Disease. 2002, Vol 25, pp.733-736.

5. Ferguson H.W., Turnbull et al. Bacillary necrosis in farmed *Pangasius hypophthalmus* (sauvage) from the Mekong Delta, Vietnam. J Fish Diseases. 2001, Vol 24, pp.509-513.

6. Gassmann M., P. Thommes et al. Efficient production of chicken egg yolk antibodies against

a conserved mammalian protein. J Immunol Methods. 1990, Vol 164, pp.141-142.

7. Gee S.C., I.M. Bate et al. The purification of IgY from chicken egg yolk by preparative electrophoresis. Protein Expression and Purification. 2003, Vol 30 (2), pp.151-155.

8. Gutierrez M.A., Miyazaki T. et al. Protective properties of egg yolk IgY containing anti-*Edwardsiella tarda* antibody against paracolo disease in the Japanese eel, *Anguilla japonica*. J Fish Diseases. 2006, Vol 16 (2), pp.113-122.

9. Hansen P., J.A. Scoble et al. Isolation and purification of immunoglobulin from chicken eggs using thiophilic interaction chromatography. J Immunol Methods. 1998, Vol 45 (215), pp.1-7.

10. Ko K.Y., D.U. Ahn. Preparation of Immunoglobulin Y from egg yolk using ammonium sulfate precipitation and ion exchange chromatography. Department of Animal Science. 2006, Vol 52, pp.176-182.

11. Shimizu M., R. Fitzsimmons, S. Nakai. Anti-*E. coli* immunoglobulin Y isolated from egg yolk of immunized chicken as a potential food ingredient. J Food Sci. 1988, Vol 53, pp.1360-1366.

12. Xiao-liang L.I., Jiang-bing S., Wei-huan F. Protection of *Carassius auratus* Gibelio against infection by *Aeromonas hydrophila* using specific immunoglobulins from hen egg yolk. J Zhejiang University Sci. 2006, Vol 7 (11), pp.922-928.