

Animal welfare, etológia és tartástechnológia



Animal welfare, ethology and housing systems

Volume 5

Issue 4

Különszám

Gödöllő
2009



IgY KIMUTATÁSA ÚJSZÜLÖTT KÉRŐDZŐK VÉRÉBEN

Kiss Zsuzsanna, Bordán Judit, Szabó Csaba, Jung Ivett

Szent István Egyetem, Állattudományi Alapok Intézet,

Állatélettani-és Állat-egészségtani Tanszék

2103. Gödöllő, Páter Károly út 1.

Kiss.Zsuzsanna@ mkk.szie.hu

Összefoglalás

A passzív immunitást eredményezheti a természetes anyai ellenanyag és a specifikus kórokozóval szemben termelt hiperimmunsavó. Háziállataink nagy része (kérődzők, ló, sertés) syndesmochoralis placentaszerkezetű, ami meggátolja az anyai ellenanyagok intrauterinalis transzferjét, így ezek az újszülöttek az anya főcstejével veszik fel az immunglobulinokat. A csikó, a gida, a borjú anyai immunglobulinokkal megvalósuló védelme elsősorban attól függ, hogy milyen az anya által termelt colostrum immunbiológiai értéke, vagyis tartalmaz-e a főcstej minden olyan immunglobulint, amelyek megvédhetik az újszülöttet a születés helyén honos élő csíráktól, istálló-specifikus mikroflórától.

A tojássárgájában különböző vitaminok, mikroelemek és fehérje típusú vegyületek raktározódnak, amik a takarmányból történő felvételüket követően a tojó metabolizmusa során a vérszérumból szabályozott módon jutnak a tojássárgájába. Ha a tojótyúkot tetszőleges antigénnel immunizáljuk, a tojás sárgájában specifikus ellenanyag (IgY) halmozható fel.

A specifikus IgY alkalmas a betegségek megelőzésére és/vagy gyógykezelésére. Az IgY passzív immunitást előidéző szerepe különös jelentőséggel bír az újszülött gidák és borjak passzív immunitásának kialakítása miatt. A colostrum rohamosan csökkenő anyai-IgG mennyiségét kiegészíthetjük az IgY védő hatásával, mind megelőző, mind gyógyító szándékkal.

Kísérletünk során a tyúktojás sárgájából kivontuk (EGGstract[®] Promega, dextránszulfátos kicsapás, ill. vizes hígításos) az össz-IgY-t, amit kifejt colostrumba adagolva, 2-4 órás újszülött borjakkal és gidákkal itattuk meg. Azt vizsgáltuk, hogy az itatást követő 48. órában a gidák és borjak vérszérumában milyen koncentrációban jelenik meg az IgY. A vérvizsgálatokat saját fejlesztésű ELISA módszerrel végeztük.

Eredményeink azt bizonyítják, hogy az össz-IgY jó hatékonysággal vonható ki bármelyik általunk alkalmazott módszerrel. Az állatok itatását követően az újszülött borjak és gidák vérében különböző koncentrációban kimutatható az IgY.

Kulcsszavak: IgY, ELISA, gida, borjú



Detection of IgY in newborn ruminants blood

Abstract

A number of vitamins and microelements can be accumulated in egg yolk. The accumulation of vitamins and microelements in egg yolk can be achieved by supplementing the feed with the given compound, which will then be found in increased concentration in the blood plasma and egg yolk. If laying hens are immunised by specific antigen the antibody produced against it can be accumulated in the egg yolk. Most of our farm animals (ruminants, horses, pigs) have syndesmochorial placenta, which prevents the intrauterine passage of immunoglobulins from the maternal to the foetal blood. The newborns of these species can only gain access to specific immunoglobulins from the colostrum of their mother in the first few hours of life.

Egg yolk contains maternal immunoglobulins for the developing embryos in birds (yolk immunity). The amount of specific IgY in the egg yolk can be increased by immunisation. One egg contains 30 mg IgY in average, which accounts for as much as 8000 mg of IgY for the whole laying period.

IgY was extracted with different methods (EGGstract[®] Promega, dextranulphate and water dilution) in the first phase of the experiments. The extracted IgY was mixed with colostrum. The goats and calves drank this mixture, after 2-4 hours of born. We have measured the concentration of IgY (ELISA method) and it was detectable in their blood sera.

The protection should be arised for the newborns in addition to their maternal immunity by the fortification of colostrum with IgY.

Keywords: IgY, ELISA, goatling, calf

Bevezetés

A tojás sárgájában számos vitamin és mikroelem halmozható fel (*Meisel*, 1994). A vitaminok és a mikroelemek feldúsulását úgy érhetjük el, ha a tyúk takarmányát a kívánt vegyülettel egészítjük ki, amely, ezt követően mind a vérplazmában, mind a tojásban, nagyobb koncentrációban mérhető (*Kumagai et al.*, 1996, *Bárdos et al.*, 1999). A tojás elfogyasztását követően ezek a vegyületek természetes mátrixban jobb hatékonysággal szívódnak fel, mintha szintetikus formában kerülne a szervezetbe.

A tojás sárgájában specifikus ellenanyag is felhalmozható, ha a tyúkot specifikus antigénnel immunizáljuk (*Losonczy és Batke*, 1997). A tojásban termelt madár IgY kinyerése ilyen módon hatékonyabb az általánosabban elterjedt módszereknél, ahol emlősállatok szervezetében megtermelt ellenanyagokat vérvétellel nyernek ki (*Bárdos et al.*, 2000, *Szabó és Bárdos*, 2002).



A passzív immunitás kialakítható mesterséges úton, specifikus kórokozóval szemben termelt hiperimmunsavó adagolásával, de kialakulhat természetes módon magzati korban (Wilkie, 1974).

Háziállataink többségének (kérődzők, ló, sertés) placentája a méh hámjához kapcsolódó (*epitheliochorialis*, - ló, szarvasmarha, sertés), illetve a méh kötőszövetébe hatoló (*sydesmochoralis* – kiskérődzők) szerkezetű, ami meggátolja az anyai ellenanyagoknak az intrauterinalis transzferjét, így ezek az újszülöttek az anya főcstejével veszik fel azokat az immunglobulinokat, amelyek ellen az anyai szervezet ellenanyagot termelt. A csikó, a gida, a borjú anyai immunglobulinokkal megvalósuló védelme elsősorban attól függ, hogy milyen az anya által termelt colostrum immunbiológiai értéke, vagyis tartalmaz-e a főcstej minden olyan immunglobulint, amelyek megvédhetik az újszülöttet a születés helyén honos élő csírától, istálló-specifikus mikroflórától (Yokoyama et al., 1992). A colostrum ellenanyagtartalma, pl. szarvasmarhában az ellés idején a legmagasabb, ezt követően 24 óránként feleződik, majd a keringésbe felszívódó immunglobulinok 3-6 hét között eliminálódnak a szervezetből. Ezen időszak alatt azonban az ún. feed-back hatás révén gátolják az újszülött aktív immunválaszának kialakulását.

Kutatásaink célja annak tisztázása, hogy a tojótyúkok tojás sárgájában felhalmozódó ellenanyag (IgY) milyen határfokkal szívódik fel az újszülött gidák és borjak emésztőcsatornájából (Yokoyama et al., 1992, Losonczy és Batke, 1997). Kísérleteinkben tyúktojásból specifikus ellenanyagot (IgY-t) vontunk ki (Szabó et al., 1999). Az IgY-t újszülött (néhány órás) gidákkal és borjakkal itattuk meg, majd az itatást követően az újszülött emlősök vérszérumában a 48. órában megmértük a specifikus IgY koncentrációját (Kovács- Nolan és Mine, 2002).

Anyag és módszer

Laboratóriumi módszerek

Az IgY kinyerése érdekében 80 db kereskedelmi forgalomban kapható tojás fehérjétől elválasztott sárgájából a következő módszerekkel vontunk ki az össz-IgY mennyiségét:

1. EGGstract^R IgY Purification System – Promega (www.promega.com)
2. Dextrán-szulfát, vízhígítós módszer – (Szabó et al., 1999, Losonczy et al., 2000)
3. Na₂ SO₄-os kicsapás alkalmazásával (Wallmann et al., 1990)

Az össz-IgY kivonását követően az IgY-t PBS-ben oldottuk, és meghatároztuk az oldat fehérje tartalmát 280 nm-en mért OD alapján a madár IgY molaris extinkciós koefficiense alapján határoztuk meg (Danielpour, 1993).



Az újszülött állatok szérumból ELISA módszerrel (Losonczy et al., 1999), végeztük az IgY kimutatását. Az általunk kidolgozott ELISA módszer specificitásására jellemző, hogy emlős IgG-tartalmú kecske szérummal csak nagyságrenddel kisebb minimális aspecifikus reakció tapasztalható az emlős fehérjék és anti-IgY között (Jung 2009).

Kísérleti állatok

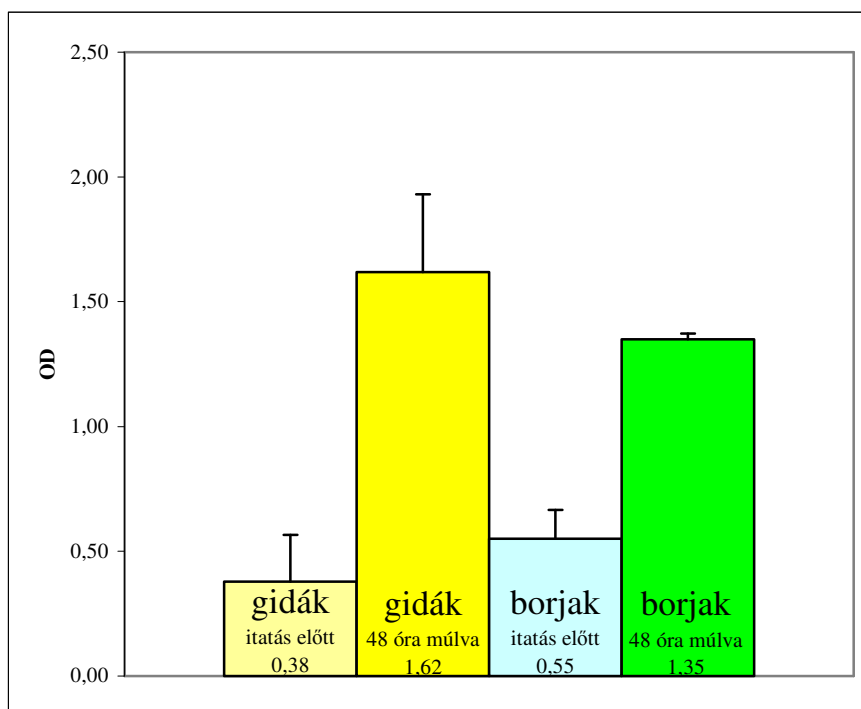
A SZIE Állattenyésztés Tudományi Intézet Tanüzemében született borjakat (n=2) és kecskegidákat (n=3) itattunk meg a kivont IgY-nal. Az ismert IgY-koncentrációjú oldatot a szopós állatok által fogyasztott főcstejbe kevertük. Itatás előtt és 48 órával az itatás után az állatokból vért vettünk. A vérmintákat centrifugáltuk, majd a centrifugálást követően ezt a szérumot -20°C -on fagyasztva tároltuk.

Eredmények

Kísérleteinkben felhasznált tyúktojások sárgájából kivont IgY-kivonat fehérje tartalma 16-18% volt, ami egyezik az irodalomban is leírtakkal (Cuceanu et al., 1991).

Az itatás előtt, majd azt követően a második napon az újszülött állatok vérszérumát ELISA módszerrel vizsgáltuk. A gidák és a borjak szérumból elvégzett ELISA meghatározások eredményeit az 1. ábra mutatja be. Az OD mértékéből következtettünk a szérum össz-IgY mennyiségére. Néma háttér reakció mérhető volt mind a gidák, mind a borjak itatás előtti szérumában is. Az itatás után 48 órával vizsgált vérminták OD értéke nagyságrenddel nagyobb az itatás előtti értékeknél (1. ábra). Tehát mindkét állatfaj újszülöttjeiben kimutatható volt a tojás sárgájából kivont IgY.

Eredményeink alapján elmondható, hogy a tyúktojásból kivont IgY ELISA módszerrel mérhető koncentrációban megjelenik az újszülött gidák és borjak vérszérumában. Az IgY itatását követően az eltelt 48 óra vizsgálataink szerint elegendő ahhoz, hogy a madarakra jellemző ellenanyag az újszülött emlősök bélcsatornájából felszívódjon. A felszívódás mértéke mind állatfajok tekintetében, mind az egyedi vizsgálatok alapján különböző. Azt azonban bizonyosan elmondhatjuk, hogy az IgY felszívódása nyomon követhető és jól mérhető ELISA módszerrel. Az IgY, mint specifikus ellenanyag alkalmas lehet számos olyan fertőző betegség leküzdésére, mely a passzív immunitás biztosítása nélkül az újszülött megbetegedését, illetve elhullását okozhatja (Gross és Speck, 1996, Losonczy és Batke, 1997).



1. ábra: Gidák és borjak szérum-IgY ELISA OD értékei

Fig. 1: IgY content in sera of newborn goats and calves

A több rétegű (*epithelio- és syndesmochorialis*) placentájú anyaállatok utódaiban a születés után a passzív ellenanyagok szintje rohamosan csökken. A megfelelő antigénnel immunizált tyúkok tojásából kivont IgY alkalmas lehet arra, hogy a hamar kiürülő specifikus ellenanyagokat pótoljuk. Ilyen módon megelőző és gyógyító szerepe is lehet az IgY-nak. Az a tény, hogy a tojótyúkok tetszőleges antigénekkkel immunizálhatók, vagyis tetszőleges specifitású IgY nyerhető a tojásból, újabb távlatokat nyit meg a megelőző és gyógyító munkában egyaránt (Bauwens et al., 1987, Cuceanu et al., 1991, Sugita-Konishi et al., 1996, Yang et al., 1997). Az „IgY-technológia” mind a humán-, mind az állatgyógyászatban sikeresen alkalmazható. Tehát a tojás összetételének megváltoztatásával annak biológiai értékét lehet növelni. Ennek nemcsak táplálkozás élettani jelentősége van, de pl. terápiás célú felhasználása is lehetséges, valamint specifikus immunanyagai *in vitro* diagnosztikum, ill. *in vivo* terapeutikum előállítását is lehetővé teszik (Bárdos et al., 1999).

Irodalmi adatok szerint az IgY takarmánnyal, ivóvízzel gyakorlatias megoldással adható az állatoknak. Az IgY itatása újszülött borjakkal, gidákkal nem helyettesítheti az anyai colostrum minél gyakoribb és minél nagyobb mennyiségben kívánatos elfogyasztását, azonban kísérleteink alapján a colostrum itatás mellett a specifikus IgY kiegészítő szerepet is kap.

További kutatómunkát igényel az IgY adagolásának optimalizálása, a mennyiség, a gyakoriság, az itatás időtartamának megállapítása. Kísérletünkben annak vizsgálata volta a cél, hogy laboratóriumi



szinten sikeresen alkalmazhatóak-e az általunk választott IgY kivonási módszerek. Az újszülött állatok itatása szopókával ellátott üvegből egyszerű, gyakorlatias módszer.

Irodalomjegyzék

- Bárdos L, Kiss Zs, Szabó Cs, Losonczy S, Csuka Gy* (1999): Tojás, ami más: funkcionális élelmiszer, diagnosztikum és terapeutikum-forrás. *Állatteny. Tak.*,48. 793-795.
- Bárdos L., Losonczy S., Szabó Cs., Kiss Zs.* (2000): Az interspecifikus ellenanyagok alkalmazási lehetőségei - *Klinikai és Kísérletes Laboratóriumi Medicina* 27. 91.
- Bauwens R.M, Kint J.A, Devos M.P, Van Brussel K.A, De Leenheer A.P.* (1987): Production, purification and characterization of antibodies to 1,25-dihydroxyvitamin D raised in chicken egg yolk. *Clin Chim Acta*,170. 37-44.
- Cuceanu N, Constantinescu C, Ionita E.* (1991): Isolation and characterization of egg yolk antibodies IgY from hens immunized with different influenza virus strains.- *Roum Arch Microbiol Immunol*, 50. 215-222.
- Danielpour D.* (1993): Improved sandwich enzyme-linked immunosorbent assays for transforming growth factor beta 1. *J Immunol Methods*.158. 17-25.
- Gross M, Speck J.* (1996): Avian yolk antibodies in diagnosis and research. *Dtsch. Tierarzt Wochenschr.*,103. 417-422.
- Jung I.* (2009): Házityúk, japánfürj, lúd és kacsá tojás IgY mérése különböző kromogént használó ELISA módszerrel XV.Ifjúsági Tudományos Fórum Keszthely, ISBN 978-96 3-9639-33-1 CD
- Kovacs-Nolan, J., Mine, Y.* (2002): Avian egg antibodies: basic and potential applications.*Avian and Poultry Biology Reviews* 15. 2004, 25-46.
- Kumagai S.* (1996): Immune functions of immunoglobulin Y isolated from egg yolk of hens immunized with various infectious bacteria. *Biosci.Biotechnol.Biochem.*,60. 886-888.
- Losonczy S, Batke J.* (1997): Madarak tojásszik eredetű specifikus immunglobulinjainak felhasználása az állatorvosi immundiagnosztikában és immunterápiában. *Magy.Áo.Lapja*. 119. 339-343.
- Losonczy S., Szabó Cs., Kiss, Zs., Bárdos L.* (2000): ELISA for the measurement of IgY concentrations of hen's and quail's serum and yolk - 6th Internet World Congress for Biomedical Sciences (INABIS 2000) - <http://www.uclm.es/inabis2000/posters/index.htm>
- Losonczy, S. Szabó, Cs. Kiss, Zs. Bárdos, L.* (1999): Application of an anti-HQIgY antibody for the measurement of IgY concentration of hen's and quail's serum and yolk, *Acta Physiol. Hung.*, 86. 253-258.



- Meisel H.* (1994): Antibodies from egg yolk of immunized hens against a bio-active caseinopeptide (beta-casokinin-10). *Biol Chem Hoppe Seyler*, 375. 401-405.
- Sugita-Konishi Y, Shibata K, Yun SS, Hara-Kudo Y, Yamaguchi K, Kumagai S.* (1996): Immune functions of immunoglobulin Y isolated from egg yolk of hens immunized with various infectious bacteria. *Biosci.Biotechnol.Biochem.*,60. 886-888.
- Szabó Cs, Bárdos L, Losonczy S, Karchesz K.* (1999): Ellenanyag kinyerés tyúk és fürjtojásból. *Klin.Kísér.Lab.Med.*, 25:149.
- Szabó M., Bárdos L.* (2002): Tojástermelés, ellenanyagtermelés céljából. *Baromfi*, 5. 54-56.
- Wallmann J, Staak C, Luge E.* (1990): A simple method for the isolation of immunoglobulin (Y) from the eggs of immunized hens. *Zentralbl. Veterinarmed [B]*, 37. 317-320.
- Wilkie, B.,N.* (1974): Review of bovine immunology for the veterinary practitioner. *Can Vet J.*, 15. 243–248.
- Yang J, Jin Z, Yu Q, Yang T, Wang H, Liu L.* (1997): The selective recognition of antibody IgY for digestive system cancers. *Chin.J.Biotechnol.*,13. 85-90.
- Yokoyama H, Peralta RC, Diaz R, Sendo S, Ikemori Y, Kodama Y.* (1992): Passive protective effect of chicken egg yolk immunoglobulins against experimental enterotoxigenic *Escherichia coli* infection in neonatal piglets. *Infect.Immun.*;60. 998-1007.