

蛋黃免疫球蛋白(IgY)對防治仔豬大腸桿菌下痢之功效探討⁽¹⁾

劉振發⁽²⁾⁽⁵⁾ 許義明⁽²⁾ 劉瑞珍⁽²⁾ 戴謙⁽⁴⁾ 鄧夙君⁽²⁾ 陳立人⁽²⁾⁽⁴⁾⁽⁵⁾ 蕭振文⁽³⁾⁽⁶⁾

收件日期：100 年 11 月 29 日；接受日期：101 年 2 月 4 日

摘要

本研究旨在進行抗大腸桿菌之蛋黃免疫球蛋白 (immunoglobulin of egg yolk, IgY) 對防治仔豬下痢功效的探討。抗大腸桿菌IgY生產是選用市售的四合一疫苗，其中包含大腸桿菌k88、k99、987P、F41等四種纖毛（簡稱為CM 抗原），以肌肉注射的方式對來亨蛋雞進行免疫注射。蛋黃中抗大腸桿菌專一性IgY抗體，是以水溶液分離法（water dilution method）來進行分離，並利用抑菌測試及以誘發仔豬下痢模式，進行專一性IgY抗體功效評估。來亨蛋雞經免疫後，所生產抗CM 抗原的專一性抗體為82.25 μ g/mL WSF（water soluble fraction）。在抑菌測試及誘發仔豬下痢防治功效的測試結果顯示，專一性IgY抗體具有抑制大腸桿菌生長，及誘發21天仔豬下痢之保護效果。

關鍵詞：蛋黃免疫球蛋白、大腸桿菌、雞、仔豬。

緒言

雞蛋是廉價且有高蛋白質含量及重要營養成分的食品。此外，雞蛋也是目前應用廣泛的多功能性生物製劑原料之一。雞蛋組成包括三個部分：蛋黃、蛋白及蛋殼，其中蛋黃是應用最廣的部分。蛋黃佔整顆雞蛋重量約31%，其主要成分為51%水分、16%蛋白質、30.5%脂質和其他次要組成物，而蛋白質主要分佈在 yolk granule 和 yolk plasma。在 yolk granule 包含 phosvitin； α - and β -lipovitellins 和脂溶性 low-density lipoproteins，yolk plasma 包含 α -、 β - and γ -livetins 三種水溶性 lipoproteins，其中 γ -livetins 經分析後發現是一種 IgG-like 的免疫球蛋白（Polson and Von Wechmar, 1980），因為是從蛋黃（yolk）中發現，因而目前多被稱為 IgY。

(1) 行政院農業委員會畜產試驗所研究報告第 1727 號。

(2) 行政院農業委員會畜產試驗所生理組。

(3) 行政院農業委員會畜產試驗所技術服務組。

(4) 南台科技大學。

(5) 國立成功大學生物科技研究所。

(6) 通訊作者，E-mail: jwshiau@mail.tlri.gov.tw。

家禽之蛋黃中含有來自母禽免疫產生之抗體是在多年前就為人所發現 (Klemperer, 1893)，由於家禽蛋中的抗體存在於蛋黃，因此稱為 IgY。一隻雞如果以傳統免疫法免疫，每隻雞每個月約可生產 1,500 mg 的 IgY，其中 2–10% 是具特異性抗體 (Schade *et al.*, 1994)。另外，利用雞蛋生產抗體，除了具有不必犧牲動物的好處外，更由於人類與禽類之遺傳距離遠，人類蛋白質在家禽較易引起免疫反應 (Gassmann *et al.*, 1990)。多篇研究亦顯示 IgY 的純化過程並非十分困難 (Akita and Nakai, 1993)。由於上述多項優點，利用禽蛋生產抗體漸受重視，曾有人利用 IgY 方式生產抗體，對抗大腸桿菌 (Yokoyama *et al.*, 1992; Amaral *et al.*, 2002; Owusu-Asiedu *et al.*, 2002, 2003)、沙門氏桿菌 (Lee *et al.*, 2002)、牛冠狀病毒 (Ikemori *et al.*, 1997)、狂犬病毒 (Sun *et al.*, 2001) 或輪狀病毒 (Sarker *et al.*, 2001) 等多項研究，多數研究皆可獲得抗體，減輕病原之影響。

腸型大腸桿菌 (Enteropathogenic *Escherichia coli*) 的感染，為引起仔豬下痢的原因之一，早發性大腸菌症常發生在出生後 10 小時到 7 日內，仔豬有下痢、不吮乳、全身乏力、後軀麻痺等情形，常在兩天內死亡，死亡率高達 100%，若仔豬較大時發病則死亡率為 70%。而遲發性大腸桿菌症則在 2-4 週齡時發生，先發生黃色軟便，後轉變為慢性白痢，雖死亡率較低，但是育成會受影響，而仔豬離乳後 3-4 天也會發生大腸菌引起之下痢；若未治療，死亡率也可達 10%，病仔豬之生長速率降低，使成本提高很多。

這些由大腸菌引起之仔豬下痢，目前可用口服或注射抗生素來治療，雖然應用抗生素可以治療大腸桿菌，但是對仔豬成長已造成影響，有些小豬在治療前即已死亡。而且，繼歐盟之後，飼料中禁用抗生素即將成為家畜飼養的普遍規範。因此，使用非抗生素之豬隻大腸桿菌症預防與治療方法的開發，值得深入探討與研究。利用禽蛋來生產抗大腸桿菌纖毛之 IgY，添加於仔豬教槽飼料中，以預防或治療仔豬因感染大腸桿菌發生的下痢現象，似為一可行的方式。本研究以市售大腸桿菌四合一疫苗（含豬大腸桿菌 *k88*、*k99*、*987P*、*F41* 四種纖毛）為抗原，來進行白色來亨雞免疫，以探討生產抗大腸桿菌之 IgY 抗體，對仔豬下痢防治的功效。

材料與方法

I. 試驗動物

本試驗使用 23 週齡的白色單冠來亨蛋雞 6 隻，作為大腸桿菌免疫刺激之對象，及特異性抗體之收集。另外，選用 21 日齡健康離乳仔豬 16 頭(實驗組 8 頭，對照組 8 頭)做為仔豬下痢防治的功效測試用。

II. 抗原種類

本試驗使用市售的四合一疫苗（沙氏豬大腸桿菌四價不活化菌苗；Fort Dodge Laboratories, Inc. USA），其中包含豬大腸桿菌 *k88*、*k99*、*987P*、*F41* 等四種纖毛型（簡稱為 CM 抗原）。

III. 雞隻的免疫注射

雞隻進行免疫注射前，將抗原蛋白質的含量調整為 200 mg/mL 濃度，做為免疫注射的濃度。將抗原與弗氏完全佐劑 (Freund's complete adjuvant)，以 1:1 比例調配成乳化狀液，對母雞進行注射。每隻母雞於左右胸部肌肉分為四個區塊，各注射 0.5 mL，並在第一次免疫注射後間隔 2、6、12 及 16 週，施行補強免疫注射。進行補強免疫注射時，改用弗氏不完全佐劑 (Freund's incomplete adjuvant)，整個免疫流程約 24 週。另外雞隻在每次免疫前，先從翼下靜脈採血 2 mL，並分離血清存放於 -70°C 冰箱，供日後抗體分析。

IV. 免疫蛋的收集

自免疫注射前一週開始收蛋（控制組），以每隻雞為單位，將其每週所生之免疫蛋收集，進行蛋黃

與蛋白分離，收取蛋黃部分。並將每週第 3 天所生產的免疫蛋分離的蛋黃，個別進行冷凍乾燥，以分析專一性 (*E. coli*) 抗體力價，了解在整個免疫的過程中，雞隻的免疫反應情形。其餘天數所收取之蛋黃予以混合，存放於-20℃備用，每週皆以相同的方式進行，持續收蛋到最後一次免疫完成後的第 6 週。

V. 蛋黃中 IgY 抗體的分離與純化

蛋黃中 IgY 抗體分離與純化，以水溶液分離法 (Akita and Nakai, 1992) 進行，取經過冷凍乾燥後的蛋黃粉 15g，以 20 倍 (300 ml) 去離子水溶解；及未經冷凍乾燥的蛋黃 30g，以 10 倍 (300 ml) 去離子水溶解，變成蛋黃液後調整 pH 至 5.0，隔夜再將 pH 由 5.0 調至 7.0，離心 (700 × g, 40 分鐘, 4℃)，取上清液以濾紙過濾，最後的過濾液為 water soluble fraction (WSF)，即 IgY 抗體。

VI. 血清中與蛋黃中專一性 IgY 的分析

IgY 抗體力價的分析，以商業套組進行酵素免疫分析 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)，先以牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA) 稀釋成 5 mg/mL、2.5 mg/mL、1.25 mg/mL、0.625 mg/mL、0.3125 mg/mL 及 0.156 mg/mL 的濃度，定出標準曲線，再以此標準曲線算出抗原濃度，進一步利用 ELISA 進行 IgY 抗體力價的分析，分析步驟如下：

第 1 天先求出抗原濃度，再測試最佳之抗原用量，在 96 孔反應盤中之小孔加入 100 μL 之抗原，進行抗原 (10 μg/mL) 的塗抹 (coating)，在標準曲線的反應小孔加入 100 μL 的 anti-chicken IgY (10 μg/mL) (Sigma C2288)，置於冰箱中 (4℃) 作用至次日。

第 2 天將蛋黃粉做 20 倍稀釋成蛋黃液 (0.5g 蛋黃粉加入 10 mL 去離子水置於 15 mL 離心管中震盪混勻)，冷凍備用。將第 1 天 96 孔反應盤從冰箱中取出，用磷酸緩衝溶液 (phosphate buffer saline, PBS) 沖洗 3 次，再於每小孔中加入 200 μL 的 2% BSA 後，置於冰箱中 (4℃) 作用至次日。

第 3 天取出 96 孔反應盤用 PBS 沖洗 3 次在標準曲線中，每小孔分別加入 100 μL 不同濃度 (0.5、0.25、0.125、0.06、0.03、0.015 μg/mL) 的 1 級抗體 (Monoclonal anti-Chicken IgG)。在樣品分析的小孔部分則將第 2 天已製備完成的 20 倍稀釋之蛋黃液，再稀釋 100 倍後於每個檢測小孔加入 100 μL 後，置於冰箱 (4℃) 作用至次日。

第 4 天取出 96 孔反應盤，使用含有 0.05% tween 20 的 PBS 溶液沖洗 3 次，再以 PBS 溶液沖洗 1 次以去除泡沫。隨後每個檢測小孔加 2 級抗體 (alkaline phosphate-conjugated goat anti-chicken IgY) 100 μL，置於 37℃ 作用 2 小時。2 小時之後以含有 0.05% tween 20 的 PBS 溶液沖洗 3 次，再以 PBS 溶液沖洗 1 次以去除泡沫後移除 PBS 溶液，最後加入 100 μL 的呈色劑 (disodium p-nitrophenyl phosphate) 反應 8~10 分鐘，利用 microplate reader (波長 405 nm) 進行吸光值測量。

VII. 抑菌測試

使用購自食品工業研究所之大腸桿菌 *K99* 菌株 (*E. coli K99*; BCRC15484)，以胰化酪蛋白大豆培養液 (trypticase soy broth) 在 37℃ 下隔夜培養後，調整菌數為 1×10^5 cfu/mL，取 10 mL 分別加入 5 mL 特異性 IgY 及非特異性 IgY 混合，於 37℃ 搖晃培養，將培養時間設計為 0、2、4 及 6 小時，再以各個時間點之培養樣品，取 0.1 mL 塗抹培養於 TSB 瓊膠培養基於 37℃，經過 24 小時後，再計算每個培養盤之菌落數，以確認特異性 IgY 是否具有抑菌作用。

VIII. 螢光顯微鏡分析 (抗原與抗體結合鏡檢)

取 100 μL 之 *E. coli K99* (2.6×10^7 CFU/ml) 懸浮於 PBS 中，加入相同體積之特異性 IgY 及非特異性 IgY，於 37℃ 共同培養 1 小時，再用 PBS 清洗 2 次 (1500 rpm, 5 分鐘)，加入螢光標示之 2 級抗體

(FITC-conjugated rabbit anti-chicken IgG, 以 1:250 的比例添加), 置於 37°C 中培養 1 小時之後, 再以 PBS 清洗 2 次 (1500 rpm, 5 分鐘), 將菌體懸浮液加入 50 μ L 之 PBS, 取 10 μ L 塗抹於載玻片上風乾, 再利用螢光顯微鏡於 490 nm 波長條件下, 觀察大腸桿菌表面是否呈現螢光反應, 若有則表示大腸桿菌與專一性的 IgY 有結合反應。

IX. IgY 抗體對仔豬人工感染誘發下痢之防治

使用大腸桿菌 K99 菌株, 以胰化酪蛋白大豆培養液在 37°C 下培養隔夜後, 調整菌數量為 2×10^{10} CFU/mL, 作為誘發仔豬下痢用。另設計大腸桿菌 K99 菌株之引子序列分別為 99-A: 5' TGAATTGCAGAAGTGTGAGTGTA 3' 和 K99-S: 5' TAGGGAATGGCTAT GTTTTCTGG 3', PCR 反應的條件為 94°C 90 秒, 接著為 35 個循環之 94°C 40 秒、52°C 40 秒、72°C 60 秒, 最後為 72°C 60 秒 extension, 反應後維持於 4°C, 然後再以 1.5% agarose 濃度的膠片進行電泳分析, 作為人工感染誘發下痢之大腸桿菌監測用。

仔豬下痢觀察, 評定的方法是依據 Sherman *et al.* (1983) 將仔豬下痢區分為四個等級, 0 級為正常 (糞便結實, 外觀正常)、1 級為軟便 (糞便不結實, 無正常的外觀)、2 級為輕微的下痢 (糞便為水樣粘稠, 一般為黃色)、3 級為嚴重下痢 (糞便為水樣, 且排糞時為噴射狀)。21 日齡仔豬, 在人工口服感染大腸桿菌 K99 菌株後 24 小時餵食 IgY 抗體, 然後再觀察下痢改善的情形。排泄物採樣方法為在仔豬排便後立即以無菌棉花棒直接從肛門口進行; 另外, 於實驗期將死亡的仔豬解剖, 進行小腸內液體及直腸黏膜採樣, 採樣後的樣品 (糞便、小腸內液體及大腸黏膜) 培養於 TSB 瓊膠培養基於 37°C, 24 小時後, 分別取 0.1ml 的菌液離心 (3000 rpm) 5 分鐘, 丟棄上清液, 加入 0.05 ml 的無菌水, 置於液態氮 (-196°C) 冷凍 5 分鐘, 再取出置放於 37°C 水槽中 10 分鐘解凍, 冷凍/解凍步驟重複 3 次, 再進行離心 (3000 rpm) 5 分鐘, 然後取上清液 10 μ L 做為 PCR 檢測之最終樣本, 再利用 PCR 方法進行大腸桿菌 K99 菌株檢測分析。

結果與討論

IgY 是從鳥類 (包括家禽) 血液中的 IgG 運輸到蛋中並累積在蛋黃, 這個過程就如同在哺乳動物胎盤的 IgG 轉移目的一樣, 提供胎盤內嬰兒被動免疫, 使其有基本的防衛系統 (Klemperer, 1893)。因此, 如同目前生產抗體的實驗動物一樣, 當給予家禽特定抗原感染時, 可產生特異性抗體儲存於蛋黃中 (Leslie and Clem, 1969)。本研究是以市售的四合一疫苗 (含大腸桿菌 k88、k99、987P、F41 四種纖毛, CM) 做為抗原, 進行白色來亨蛋雞的免疫注射。實驗結果顯示, 總 IgY 之含量平均為 4.09 mg/mL WSF (圖 1)。Sunwoo *et al.* (2002) 利用大腸桿菌 O157:H7 菌株為抗原, 進行產蛋雞的免疫注射, 藉以生產抗大腸桿菌 O157:H7 的專一性 IgY 抗體指出在蛋黃中總 IgY 的含量為 12.58 mg/mL WSF, 其結果與本試驗測得之總 IgY 含量 (4–5 mg/mL WSF) 高出許多。然而, 在許多有關蛋黃中總 IgY 的含量分析之文獻指出, 蛋黃中總 IgY 的含量, 會因分離方法及分析方法的不同而有所差異 (1–25 mg/mL WSF) (Rose *et al.*, 1974; Shimizu *et al.*, 1988; Li-chan *et al.*, 1998)。

Kariyawasam *et al.* (2004) 利用四株不同種的大腸桿菌 (*FimH*、*IutA*、*PapG*、和 *LPS*) 為抗原來免疫雞隻, 指出雞隻血清中 IgY 的濃度, 在每間隔一週免疫一次, 於第三次免疫後, 血清中 IgY 的濃度逐漸上升, 在第 4 週時血清中 IgY 的濃度會顯著增加達到高峰, 並且會持續到第五週後才開始下降。在本研究中來亨雞血清中專一性 IgY 含量的變化, 亦觀察到類似的結果 (圖 2)。來亨雞之血清中專一性 IgY 含量變化, 依免疫刺激之週數 (0、2、6、12 及 16 週), 其 IgY 含量約在抗原刺激 2 週後會上升, 在第 4 週會出現第一個高峰, 且在每次抗原施打後即有上升之變化, 且抗體力價達 1,000–2,500 μ g/mL。在相關文獻亦有提到不同母雞, 對於抗原免疫後的免疫反應及所產生的特異性抗體含量會有

差異 (Amaral *et al.*, 2002; Kitaguchi *et al.*, 2008)。另外，抗原使用的部分也是影響家禽免疫效果的重大因素，在以 *Staphylococcus*、*Salmonella*、*E. coli* 等細菌類的抗原，發現用不同的膜外蛋白 (outer membrane protein)，或纖毛蛋白 (fimbrial adhesions) 進行家禽免疫後，所產生的特異性抗體含量有高低差別 (Yokoyama *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 2002)。

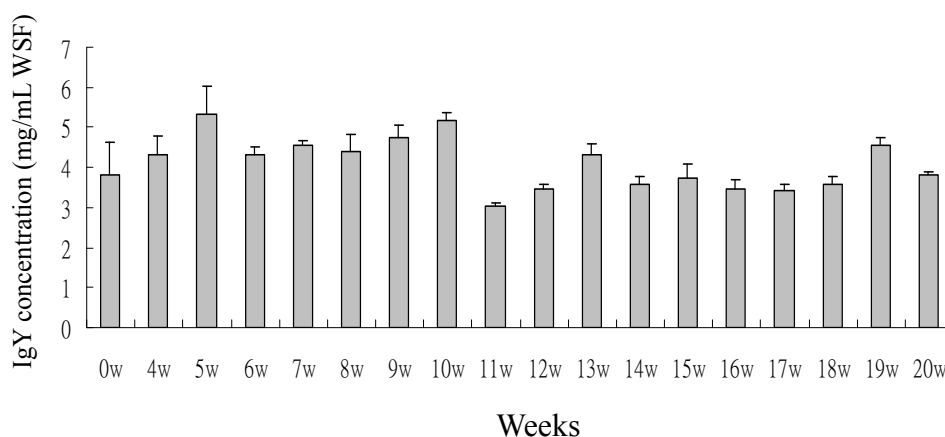


圖1. 來亨蛋雞經 CM 之抗原免疫注射後0—20週之蛋黃中總IgY含量 (mg/mL WSF)。

Fig. 1. The concentration (mg/mL WSF) of total IgY content of White Leghorn chickens in 0-20 weeks post immunization with CM antigen.

在上述血清中專一性抗體分析的結果，是在第四週會出現第一個高峰；因此，在本研究中來亨蛋雞免疫蛋的抗體分析，是從抗原免疫注射後第4週開始，直到第22週結束，蛋黃中專一性IgY抗體的含量變化如圖3所示，在蛋黃中專一性IgY抗體的含量變化，與血清中專一性IgY抗體的含量變化，呈現類似的變化曲線，在每次補強免疫14天後抗體力價明顯上升，約在第21天左右抗體力價達到最高，然後再下降。

來亨蛋雞在整個免疫期間於第9週、第11週和第16週出現三個高峰，其中是以第16週呈現最高量，其蛋黃中所含CM的專一性IgY抗體的含量為96.28 μ g/mL。Yokoyama *et al.* (1999) 利用 enterotoxigenic *E. coli* 為抗原進行雞隻免疫，來生產抗 *E. coli* 的IgY抗體，報告指出抗體的含量也是在抗原注射2個星期後明顯上升，然後在3-4個星期後抗體開始下降。但是 Marquardt *et al.* (1999) 利用 *E. coli* K88 為抗原進行雞隻免疫，其IgY抗體的變化與本研究的結果相同。

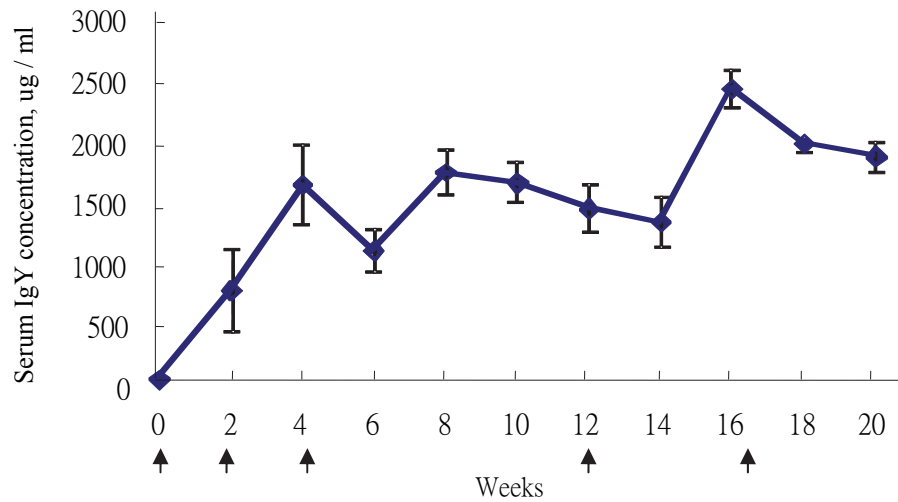


圖2. 來亨蛋雞經CM抗原免疫注射後，0—20週之血清中專一性IgY含量($\mu\text{g}/\text{mL}$ serum)。

▲：表示抗原免疫時間。

Fig. 2. The serum specific IgY concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$ serum) of White Leghorn in 0—20 weeks after immunization with CM antigen.

▲：Time of antigen immunization.

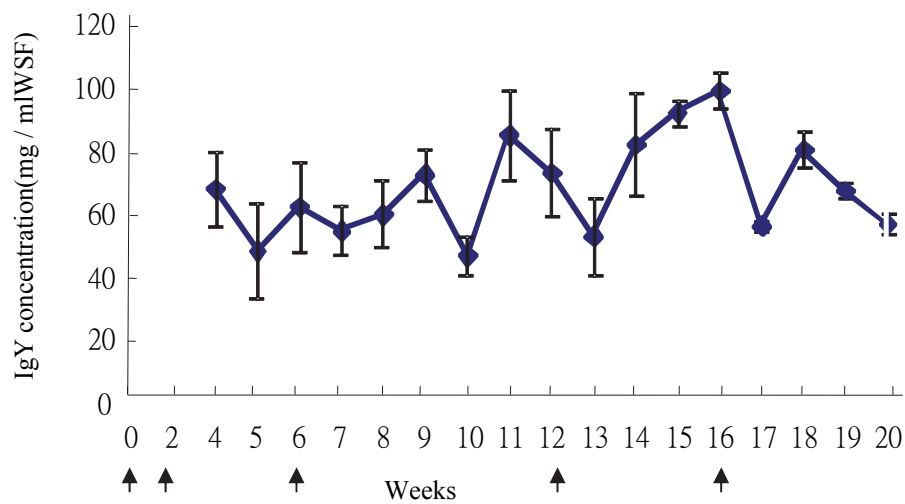


圖3. 來亨雞蛋雞CM抗原免疫注射後，4—20週之蛋中專一性IgY含量($\mu\text{g}/\text{mL}$ WSF)。

▲：表示抗原免疫時間。

Fig. 3. The production of anti-*E. coli* IgY ($\mu\text{g}/\text{mL}$ WSF) of White Leghorn chickens immunization with CM antigen, value was represented as the average of the eggs collected from 3 chickens in each week from 4-20 weeks after immunization.

▲：Time of antigen immunization.

雞隻免疫後專一性 IgY 的產量如圖 3 所示，平均每個蛋所含 CM 的專一性 IgY 抗體的含量為 65.28

$\mu\text{g/mL}$ 。在不同品種間其遺傳背景的差異，對相同的抗原免疫後，會呈現出不同的免疫反應 (Kitaguchi *et al.*, 2008)。在家禽的免疫反應除了品種間的差異外，抗原的種類和型式亦有很大影響，不同的抗原有其不同的抗原決定位 (epitope)，因此引起的免疫反應也不同 (Yokoyama *et al.*, 1992)。目前研究顯示，以完整細菌或病毒取代部分病原菌蛋白質作為抗原，所產生的特異性抗體的含量會較佳，其抗體在活體內中和病毒的效果也是最好的 (LeClaire *et al.*, 2002)。

為確認 anti-*E. coli* IgY 是否具有抑制 *E. coli* 生長的效果，本研究是以 *E. coli* K99 菌株和 anti-*E. coli* IgY 專一性抗體，共培養進行抑菌測試，取免疫後第 11 週 ($82.25\ \mu\text{g/mL}$) 所生產的 anti-*E. coli* IgY 專一性抗體，進行抑菌測試。在 *E. coli* K99 菌株與 anti-*E. coli* IgY 的共培養，測試結果如圖 4 所示，顯示 anti-*E. coli* IgY 是具有抑制 *E. coli* 生長的效果。Sunwoo *et al.* (2002) 利用 $45\ \mu\text{g/mL}$ 、 $90\ \mu\text{g/mL}$ 和 $180\ \mu\text{g/mL}$ 的抗 *E. coli* O157:H7 菌株專一性 IgY，對 *E. coli* O157:H7 菌株進行抑菌試驗，結果顯示專一性 IgY 抗體只要達 $90\ \mu\text{g/mL}$ 以上，就有顯著的抑菌效果，而在本報告結果顯示 CM 的專一性 IgY 抗體在 $82.25\ \mu\text{g/mL}$ 以上就有顯著的抑菌效果。在抑菌測試中，結果顯示在 *in vitro* 試驗中，抗大腸桿菌 IgY 對大腸桿菌生長具有抑制的效果。被動免疫主要是藉由抗體與抗原進行專一性的結合之特性，來達到清除病原的功效；因此，本實驗進一步利用螢光顯微鏡，進行 anti-*E. coli* IgY 抗體與 *E. coli* 抗原的結合觀察，結果如圖 5 所示，僅專一性的 IgY 抗體觀察到螢光反應，非專一性的 IgY 抗體則無觀察到螢光反應，證實 CM 的專一性 IgY 抗體能辨識 *E. coli* K99 菌株，並完成抗體與抗原專一性的結合。Sunwoo *et al.* (2002) 研究指出，專一性 IgY 抗體能夠抑制病原菌的生長，主要的機制是 IgY 抗體與病原菌具有專一性結合的特性，因抗體能夠辨識特定病原菌，並有效結合到病原菌的表面，使得病原菌的生長受到抑制，本研究也觀察到相同的結果。

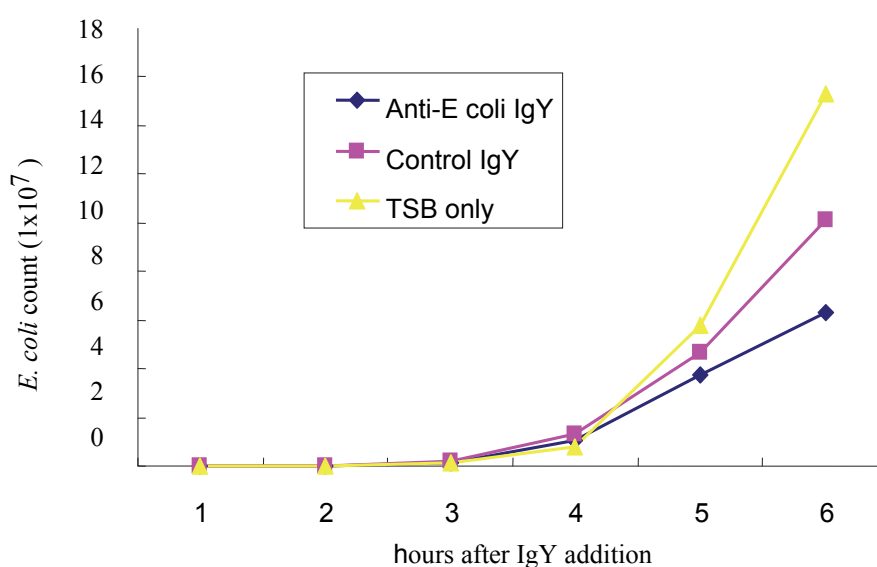


圖4. 培養液中添加 IgY 對 *E. coli* K99 菌株生長的影响。

Fig. 4. The effect of IgY addition on the growth of *E. coli* K99 in a liquid medium.

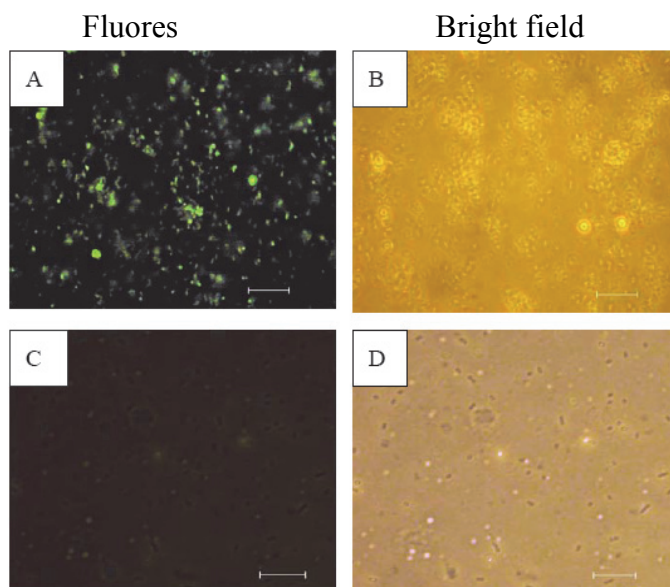


圖 5. 大腸桿菌 *K99* 菌株與抗大腸桿菌之專一性 IgY 抗體 (A：螢光視野，B：明視野) 及非專一性 IgY 抗體 (C：螢光視野，D：明視野) 共培養之螢光顯微鏡檢查。

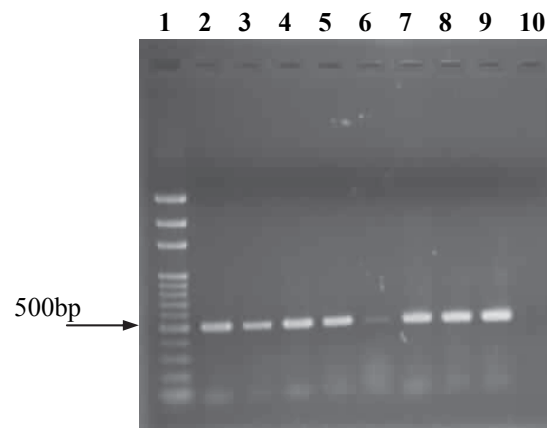
Fig. 5. Immunofluorescence micrographs of *E. coli K99* incubated with (A : Fluorescence, B : Bright field) specific IgY and (C : Fluorescence, D : Bright field) non-specific IgY. Scale slit shows 20 μm at X400.

另外，本研究進一步以人工感染 *E. coli K99* 菌株，誘發仔豬下痢後，再餵食 IgY 抗體，藉以探討專一性 IgY 抗體對仔豬下痢是否有防治效果。結果健康仔豬在以人工感染 *E. coli K99* 菌株後 24–48 小時，就可觀察到有下痢的情形發生其下痢情形如表 1 所示，經採集下痢豬隻的糞便，以 *E. coli K99* 菌株之基因序列合成專一性引子，以 PCR 方式進行檢測，檢測後呈陽性反應者可獲得長度約 500 bp 之產物。分析的結果顯示在所有受測的仔豬均可被測出有 500 bp 產物 (圖 6)，此結果確認這些仔豬的下痢，確實為 *E. coli K99* 攻毒後所誘發造成的下痢。經過連續餵食 IgY 抗體的仔豬，於 72 小時後就沒有下痢的情形，但是對照組則是持續下痢且又日益嚴重的現象，並且有 25% (2/8) 的仔豬死亡。將死亡豬隻解剖，發現腸道有脹氣現象，腸繫膜之淋巴結有腫脹的情形；另外採取空腸內部之黏液及糞便，以 *E. coli K99* 菌株之基因序列合成專一性引子以 PCR 方式進行檢測，結果呈現陽性反應 (圖 7)。

表 1. 21 日齡仔豬以 *E. coli* K99 菌株攻毒後給與 IgY 抗體餵食的臨床反應Table 1. Clinical response of 21-day-old pigs after challenging with *E. coli* K99 and trged with IgY antibodies.

Treatment	No. of pigs	No. of pigs with diarrhea (FC score ^a) after			
		24h	48h	72h	96h
Control	8	5/8 (1.62)	8/8 (2.5)	7/7 (2.3)	6/6 (2.5)
Treatment	8	4/8 (1.25)	2/8 (1.87)	0/8 (1.12)	0/8 (0.62)

^aFC score is the mean fecal consistency score: 0, normal; 1, soft feces; 2, mild diarrhea; 3, severe diarrhea. Pigs with a fecal score of ≤ 1 were considered not to have diarrhea.

圖 6. 利用 PCR 進行下痢仔豬糞便 *E. coli* K99 之檢測。

編號：1 為 100 bp 之 DNA 標記；編號：2 - 8 為下痢仔豬直腸內糞便樣品；編號：9 為 *E. coli* K99 (+對照組)；編號：10 為無菌水 (-對照組)。

Fig. 6. Detection of *E. coli* K99 in the feces of dysentery piglet's by PCR method.

Lane 1: 100bp DNA marker. Lane 2 - 8: Feces of dysentery piglet's. Lane 9: *E. coli* K99(positive control). Lane 10: Deionized water (negative control).

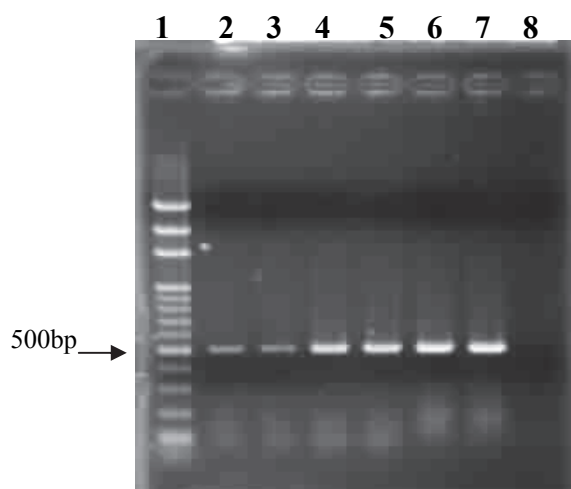


圖 7. 利用 PCR 進行下痢仔豬小腸內液體與直腸壁黏膜 *E. coli K99* 之檢測。

編號：1 為 100 bpDNA 標記；編號：2-3 為下痢仔豬直腸壁黏膜樣品；編號：4-5 為下痢仔豬小腸內液體樣品；品編號：6-7 為 *E. coli K99* (+ 對照組)；編號：8 為滅菌水 (- 對照組)。

Fig. 7. Detection of dysentery piglet's after challenge with *E. coli K99* of rectum mucous membrane and small intestines fluid by PCR method. Lane 1: 100 bp DNA marker. Lanes 2, 3: Rectum mucous membrane. Lanes 4, 5: Fluid of small intestines Lanes 6, 7: *E. coli K99* (positive control). Lane 8: Deionized water (negative control).

Yokoyama *et al.* (1992) 指出，給予新生仔豬不同抗體力價之抗 *K88*、*K99* 與 *987P* 三種大腸桿菌 IgY 抗體進行試驗，結果顯示投與 625 及 2,500 力價之組別，可有效清除仔豬腸道中之病原性大腸桿菌，且顯著降低下痢發生率。Owusu-Asied *et al.* (2002) 利用乾燥豬血漿粉及動物血漿粉搭配含有 *F18* 及 *K88* 兩種大腸桿菌抗體的 IgY 蛋黃粉，餵給以 *F18* 及 *K88* 兩種大腸桿菌攻毒後之豬隻服用，以觀察抗大腸桿菌 IgY 的蛋黃粉，對於因大腸桿菌感染引起下痢的豬隻，是否具有治療效果。試驗結果顯示，有給予抗大腸桿菌 IgY 的蛋黃粉的試驗組，在下痢情形及糞便中大腸桿菌的數量，均較對照組明顯降低；且於 *in vitro* 的試驗結果，也顯示試驗組較對照組具有抑制大腸桿菌增生的效果。

Owusu-Asied *et al.* (2003) 探討利用植物性蛋白質添加於抗大腸桿菌抗體蛋黃粉，對於哺乳仔豬進行大腸桿菌攻毒試驗的保護效果。結果顯示，亦可降低仔豬下痢發生率及死亡率。同年 Owusu-Asiedue *et al.* 將其試驗以添加抗生素組作為對照，結果發現不論是乾燥豬血漿粉組或植物蛋白質組，在添加抗體蛋黃粉後，對於仔豬下痢情形、腸道菌數分析和死亡率的影响，均與添加抗生素組有相同之效果。綜和以上文獻及本研究的結果，顯示含有抗大腸桿菌抗體的蛋黃粉應具有取代抗生素之潛力。

參考文獻

- Akita, E. M. and S. Nakai. 1992. Immunoglobulins from egg yolk: isolation and purification. *J. Food Sci.* 57: 629-634.
- Akita, E. M. and S. Nakai. 1993. Comparison of four purification methods for the production of immunoglobulins from eggs laid by hens immunized with an enterotoxigenic *E. coli* strain. *J. Immunol. Methods.* 60: 207-214.
- Amaral, J. A., D. E. Tino, M. Franco, M. M. S. Carneiro-Sampaio and S. B. Carbonare. 2002. Anti-enteropathogenic *Escherichia coli* immunoglobulin Y isolated from eggs laid by immunized Leghorn chickens. *Res. Vet. Sci.* 72: 229-234.
- Gassmann, M., P. Thommes, T. Weiser and U. Hübscher. 1990. Efficient production of chicken egg yolk antibodies against a conserved mammalian protein. *Faseb J.* 4: 2528-32.
- Ikemori, Y., M. Ohta, K. Umeda, F. C. J. Icatlo, M. Kuroki, H. Yokoyama and Y. Kodama. 1997. Passive protection of neonatal calves against bovine coronavirus-induced diarrhea by administration of egg yolk or colostrum antibody powder. *Vet. Microbiol.* 58: 105-111.
- Kariyawasam, S., B. N. Wilkie and C. L. Gyles. 2004. Resistance of broiler chickens to *Escherichia coli* respiratory tract infection induced by passively transferred egg-yolk antibodies. *Vet. Microbiol.* 98: 273-284.
- Kitaguchi, K., K. Osada, F. Horio and A. Murai. 2008. Exclusion of polymeric immunoglobulins and selective IgY transport that recognizes its Fc region in avian ovarian follicles. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 121: 290-299.
- Klemperer, F. 1893. XV. Ueber naturliche Immunitat und ihre Verwerthung fur die Immunisierungstherapie. In: Naunyn, B., Schmiedeberg, O. (Eds.).
- Lee, E. N., H. H. Sunwoo, K. Menninen and J. S. Sim. 2002. In vitro studies of chicken egg yolk antibody (IgY) against *Salmonella enteritidis* and *Salmonella typhimurium*. *Poult. Sci.* 81: 632-641.
- LeClaire, R. D., R. E. Hunt and S. Bavari. 2002. Protection against bacterial superantigen staphylococcal enterotoxin B by passive vaccination. *Infect. Immunol.* 70: 2278-2281.
- Leslie, G. A. and L. W. Clem. 1969. Phylogen of immunoglobulin structure and function. Immunoglobulins of the chicken. *J. Exp. Med.* 130: 1337-1352.
- Li-Chan, E. C. Y., S. S. Ler, A. Kummer and E. M. Akita. 1998. Isolation of lactoferrin by immunoaffinity chromatography using yolk antibodies. *J. Food Biochem.* 22: 179-195.
- Marquardt, R. R., L. Z. Jin, J. W. Kim, L. Fang and A. A. Frohlich. 1999. Passive protective effect of egg-yolk antibodies against enterotoxigenic *Escherichia coli* K88+ infection in neonatal and early-weaned piglets. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 23: 283-288.
- Owusu-Asiedu, A., S. K. Baidoo, C. M. Nyachoti and R. R. Marquardt. 2002. Response of early-weaned pigs to spray-dried porcine or animal plasma-base diets supplemented with egg-yolk antibodies against enterotoxigenic *Escherichia coli*. *J. Anim. Sci.* 80: 2895-2903.
- Owusu-Asiedu, A., C. M. Nyachoti and R. R. Marquardt. 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. *J. Anim. Sci.* 81: 790-7908.

- Polson, A. and M. B. Von Wechmar. 1980. Isolation of viral IgY antibodies from yolks of immunized hens. *Immunol. Commun.* 9: 476-493.
- Rose, M. E., E. Orlans and N. Buttress. 1974. Immunoglobulin classes in the hen's egg their segregation in yolk & white. *Eur. J. Immunol.* 4: 521-523.
- Sarker, S. A., T. H. Casswall, L. R. Juneja, E. Hoq, I. Hossain, G. J. Fuchs and L. Hammarström. 2001. Randomized, placebo-controlled, clinical trial of hyperimmunized chicken egg yolk immunoglobulin in children with rotavirus diarrhea. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 32: 19-25.
- Schade, R., W. Burger, T. Schöneberg, A. Schniering, C. Schwarzkopf, A. Hlinak and H. Kobilk. 1994. Avian egg yolk antibodies. The egg laying capacity of hens following immunisation with antigens of different kind and origin and the efficiency of egg yolk antibodies in comparison to mammalian antibodies. *Altex* 11: 75-84.
- Sherman, D. M., S. D. Acres, P. L. Sadowski, J. A. Springer, B. Bray, T. J. G. Raybould and C. C. Muscoplat. 1983. Protection of calves against fatal enteric colibacillosis by orally administered *Escherichia coli* K99-specific monoclonal antibody. *Infect. Immun.* 42: 656-658.
- Shimizu, M., R. C. Fitzsimmons and S. Nakai. 1988. Anti-E. coli immunoglobulin Y isolated from egg yolk of immunized chickens as a potential food ingredient. *J. Food Sci.* 53: 1360-1366.
- Sunwoo, H. H., E. N. Lee, K. Menninen, M. R. Suresh and J. S. Sim. 2002. Growth inhibitory effect of chicken egg yolk antibody (IgY) on O157:H7. *J. Food Sci.* 67: 1486-1494.
- Sun, S., W. Mo, Y. Ji and S. Liu. 2001. Preparation and mass spectrometric study of egg yolk antibody (IgY) against rabies virus. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 15: 708-12.
- Yokoyama, H., R. C. Peralta, R. Diaz, S. Sendo and Y. Ikemori. 1992. Passive protective effect of chicken egg yolk immunoglobins against experimental enterotoxigenic *Escherichia coli* infection in neonatal piglets. *Infect. Immunol.* 60: 998-1007.
- Yokoyama, H., K. Umeda, R. C. Peralta, T. Hashi, F. C. J. Icatlo, M. Kuroki, Y. Ikemori and Y. Kodama. 1998. Oral passive immunization against experimental salmonellosis in mice using chicken egg yolk antibodies specific for *Salmonella enteritidis* and *S. typhimurium*. *Vaccine.* 1: 388-393.

Efficacy of egg yolk immunoglobulins (IgY) against *Escherichia coli* in pigs⁽¹⁾

Jenn-Fa Liou⁽²⁾⁽⁵⁾ Yu-Min Shue⁽²⁾ Jui-Jane Tailiu⁽²⁾
Chein Tai⁽⁴⁾ Su- Jyun Deng⁽²⁾ Lih-Ren Chen⁽²⁾⁽⁴⁾⁽⁵⁾
and Jen-Wen Shiau⁽³⁾⁽⁶⁾

Received: Nov. 29, 2011; Accepted: Feb. 4, 2012

Abstract

The objective of this study was to investigate the immunization response to *Escherichia coli* (*E. coli*) antigen of White Leghorn layers and the function of specific immunoglobulin in egg yolk (IgY). The antibody was raised by intramuscular immunization to White Leghorn with inactivated *E. coli* antigen from the commercial vaccine (k88 · k99 · 987P · F41 ; CM). Anti-*E. coli* IgY antibodies were isolated from egg yolk by using water dilution method and their *E. coli* inhibitory efficiency were determined. The specific IgY from White Leghorn layer immunized with CM antigen had a superior inhibitory effect on the growth of activated *E. coli*. at a concentration of 82.25µg/mL or more WSF (water soluble fraction) . In this study,the chicken egg-yolk antibodies can experimentally prevent diarrhea induced by ETEC in 21 days old weaned piglets.

Key words: IgY, *E. Coli*, Chicken, Piglet.

(1) Contribution No. 1727 from Livestock Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan.

(2) Physiology Division, Livestock Research Institute, COA-LRI, Tainan 712, Taiwan, R. O. C.

(3) Department of Animal Science, National Chiayi University, Chia-Yi 600, Taiwan, R. O. C.

(4) Southern Taiwan University, Tainan 710, Taiwan, Taiwan, R. O. C.

(5) Institute of Biotechnology, National Chung Kung University, Tainan 701, Taiwan, R. O. C.

(6) Corresponding author, E-mail: jwshiau@mail.tlri.gov.tw

