

Produksi IgY Antivirus Avian Influenza H5N1 dan Prospek Pemanfaatannya dalam Pengebalan Pasif

(*PRODUCTION OF IgY ANTI AVIAN INFLUENZA VIRUS H5N1 AND THE POSSIBILITY OF ITS APPLICATION IN PASSIVE IMMUNISATION*)

I Wayan Teguh Wibawan¹, Sri Murtini¹, Retno Damajanti Soejoedono¹,
I Gusti Ngurah Kade Mahardika²

¹Bagian Mikrobiologi, Departemen Ilmu Penyakit Hewan dan Kesehatan Masyarakat Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertaian Bogor, Jl. Agatis, Dramaga, Bogor
Email: wibawan@yahoo.com. Telp. 0251-8629474. Fax. 0251-8629459

²Laboratorium Virologi; Lab Biomedik dan Biologi Molekuler Hewan, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Udayana

ABSTRACT

Immunoglobulin Y (IgY) in yolk has been shown in several studies to prevent both bacterial and viral infections. This research was conducted to find evidence that IgY specific against avian influenza virus (AIV) of H5N1 subtype can be produced in a large quantity in egg yolk. Laying hens were vaccinated with AI killed-vaccine (IPB-Shigeta). The IgY was purified using affinity chromatography technique, and anti-H5 activity was measured using a standard haemagglutination inhibition (HI) and agar gel immunodiffusion. The concentration of IgY was calculated, and the protein pattern was detected using polyacrilamid gel (AGID) electrophoresis (PAGE). Anti H5 antibody as high as 2⁷ – 2⁹ HI units was detected and produce a specific line of precipitation in AGID. The concentration of IgY was 7.89 mg/ml. Purified specific IgY consist of 6 main protein bands with molecular weights ranging from 35 to 225 kD. These proteins were sensitive to heat treatment (75°C for 30 minutes), to acid condition (pH2) as well as the pepsin and trypsin. These results indicated the possibility of using specific IgY for passive immunisation to prevent AIV infection or as immunotherapeutic applications for AI treatment in humans.

Key words: Passive immunisation, avian influenza virus of subtype H5N1, specific IgY Egg Yolk.

PENDAHULUAN

Telur ayam dan unggas lain dapat dimanfaatkan sebagai pabrik biologis untuk sarana pembuatan antibodi spesifik terhadap berbagai jenis antigen. Antibodi spesifik, sebagai respon vaksinasi yang ada di dalam darah ditransfer secara efektif ke dalam kuning telur, yang disiapkan untuk melindungi anak ayam pada hari-hari pertama setelah menetas. Zat kebal yang diperoleh anak ayam ini dikenal dengan antibodi maternal (Tizard 2004).

Ayam memiliki sistem pertahanan atau sistem imunitas yang cukup berkembang, sehingga sangat responsif terhadap antigen yang memaparnya. Carlander (2002) menyatakan, ayam memiliki sensitivitas tinggi terhadap protein asing, sehingga dengan jumlah sedikit dapat memberikan respon pembentukan antibodi. Keberadaan kelenjar *Harderian* di daerah nasotrakheal dan *Bursa Fabricius* memungkinkan unggas sangat responsive

terhadap berbagai protein asing dan ayam mampu menginduksi titer IgY yang tinggi dan bertahan lama pada telur (Coleman 2000, Gassmann *et al.*, 1990). Penggunaan telur ayam sebagai pabrik biologis sangat menjanjikan karena telur dapat dengan mudah diproduksi secara massal, relatif murah, dan mudah didapat. Antibodi spesifik yang ada di dalam kuning telur dapat diberikan dan disajikan dalam bentuk *nutritional food* atau antibodi IgY yang dapat dimurnikan dari kuning telur menggunakan metode yang sederhana dengan jumlah yang cukup banyak. Ayam biasanya bertelur 5 sampai 6 butir per minggu dan sebutir kuning telur yang mempunyai volume 15 ml, rata-rata mengandung 50 – 100 mg IgY, dengan kandungan antibodi spesifik 2% sampai 10% (Schade *et al.* 1996). IgY murni tersebut dapat diaplikasikan secara parenteral (suntikan) dalam pencegahan atau pengobatan melalui pengebalan pasif. Penggunaan telur dari sudut kesejahteraan hewan, sangat mendukung

konsep tersebut, karena produksi IgY dapat diperoleh dari telur tanpa harus menyakiti hewan.

Sampai saat ini, pemanfaatan Ig Y spesifik dalam telur ayam untuk pengobatan dan pencegahan penyakit masih terbatas pada skala laboratorium. Pada hewan, pemanfaatan IgY pernah dilaporkan oleh Kermani-Arab *et al.*, (2001)), yang menyatakan bahwa Ig Y spesifik terhadap penyakit Marek yang diaplikasi secara pasif mampu menahan infeksi virus Marek, demikian pula halnya dengan IgY untuk virus Rota dan virus distemper (Hatta *et al.*, 1993; Schmidt *et al.*, 1989). Dilaporkan pula bahwa penyakit kolibasilosis dan influenza pada unggas dapat dicegah dengan pemberian IgY spesifik secara pasif. Studi vaksinasi pasif dengan menggunakan IgY hasil purifikasi kuning telur yang diambil dari ayam yang telah divaksin dengan *whole cells* dari *S. mutans* pada percobaan secara *in vitro* maupun *in vivo* mampu mencegah kerusakan gigi manusia (Hatta *et al.*, 1997). IgY spesifik terhadap *S. mutans* GBP-B (*Glucan Binding Protein-B*) dapat menghambat akumulasi *S. mutans* pada biofilm gigi dan dapat memproteksi kerusakan gigi yang disebabkan oleh *S. mutans* (Smith *et al.*, 2001; Hatta *et al.*, 1997). Hasil studi yang dilakukan oleh Sugita-Konishi *et al.*, (1996) menunjukkan adanya fungsi imun IgY yang dihasilkan dari ayam yang telah divaksinasi dengan campuran bakteri patogenik dan formalin. IgY menghambat pertumbuhan *Pseudomonas aerogenosa*, produksi enterotoksin-A dari *Staphylococcus aureus* dan adhesi *Salmonella enteritidis* pada kultur sel intestinal manusia. Hasil yang sama ditunjukkan pula bahwa IgY dapat dimanfaatkan untuk mencegah penyakit pernapasan (Shin *et al.*, 2002). Hasil tersebut menunjukkan bahwa IgY spesifik untuk berbagai bakteri dapat digunakan untuk mencegah penyakit bakterial.

Pengobatan dan pengebalan pasif seperti pemberian IgY dalam pangan/pakan sangat tepat untuk penyakit-penyakit saluran cerna, dalam hal ini adalah diare yang disebabkan oleh *Enteropathogenic E. coli*/EPEC. Diharapkan IgY spesifik dapat menghambat terjadinya adhesi dan kolonisasi EPEC di permukaan mukosa usus halus dengan melibatkan beberapa komponen spesifik seperti intimin dan Tir (Finlay, 2002).

Avian influenza (AI) menyebabkan angka kematian yang tinggi pada ayam di Italia pada

tahun 1878. Namun, baru diketahui pada tahun 1955 bahwa penyebab *fowl plague* sebenarnya adalah virus AI yang memiliki komposisi gen yang serupa (hampir identik) dengan virus influenza manusia.

Virus AI adalah virus influenza tipe A, pada awalnya hanya menyerang unggas, dan berdasarkan atas patogenitasnya dibedakan menjadi 2 bentuk yaitu *Low Pathogenic Avian Influenza* (LPAI) dan *Highly Pathogenic Avian Influenza* (HPAI). Kasus serangan dan kematian pada manusia akibat serangan virus AI (H5N1) justru terjadi pada saat kasus kematian pada unggas sudah sangat menurun. Dari sini terlihat bahwa penularan AI pada manusia tidak selalu dapat dikaitkan dengan tingginya kasus AI pada ayam dan hingga saat ini mekanisme transmisi virus AI dari unggas ke manusia tidak diketahui dengan jelas.

Berdasarkan data kasus dan kematian pada manusia, sangat jelas bahwa penyakit AI pada manusia bersifat probabalistik, yang mungkin berkaitan dengan dosis infeksi virus, waktu serangan, kepekaan induk semang, dan derajat keganasan virus. Maka dari itu di dalam penanggulangannya, pendekatan imunisasi pasif ini sangat menjanjikan karena hingga saat ini pengebalan secara aktif belum mungkin dilakukan karena vaksin AI untuk manusia masih belum tersedia. Di samping itu, penggunaan obat-obatan seperti Tamiflu memiliki banyak kelemahan, disamping menimbulkan resistensi juga hanya bekerja pada awal infeksi saja (hingga 48 jam post infeksi).

Dalam tulisan ini akan diuraikan produksi antibodi IgY spesifik terhadap virus AI H5N1 dalam telur, karakterisasinya dan daya netralisasinya terhadap tantangan virus HPAI H5N1 secara *in ovo*.

PENELITIAN

Vaksin Inaktif AI

Dalam penelitian ini digunakan vaksin AI mati homolog (Close 5.1 H5N1, PT IPB-Shigeta).

Produksi IgY anti H5N1 pada Telur

Produksi anti H5N1 dalam telur ayam dilakukan dengan menyuntik 1 ml suspensi vaksin (10^9 HA) secara intramuskular dan diulang 2 minggu setelah penyuntikan pertama terhadap 50 ekor ayam betina dewasa (tipe *large size hens*) siap bertelur (umur 20 minggu) yang

dipelihara dalam kandang baterai dan diberi makanan komersial standar. Jika titer antibodi tinggi dalam darah, maka telur yang dihasilkan dikoleksi dan disimpan hingga untuk penelitian selanjutnya (Soejoedono dan Wibawan, 2005).

Penentuan Titer IgY

Penentuan titer antibodi spesifik dalam telur dan serum darah dilakukan dengan teknik hambatan hemaglutinasi (HI). Keberadaan antibodi spesifik H5N1 dalam darah dan kuning telur dikonfirmasi dengan uji imunodifusi/*Agar Gel Precipitation Test* (AGPT) (Soejoedono dan Wibawan, 2005).

Purifikasi IgY dari Kuning Telur

Purifikasi IgY dari kuning telur dilakukan dengan *Promegas EGGstarct IgY purification system*. Telur dipecahkan, dan kuning telur dipisahkan dengan menggunakan *egg separator*. Pemisahan lemak telur dan pengendapan IgY dilakukan sesuai dengan prosedur pabrik (Soejoedono dan Wibawan, 2005).

Identifikasi Kemurnian IgY

Identifikasi kemurnian Ig Y ditentukan secara fatometris ($\bar{e}=280$ nm) dan analisis pita protein dengan *Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE) dan diwarnai dengan *Fast Coomassie® Stain*. Kandungan protein IgY ditentukan dengan *metode Lowry* yang umum dipakai.

Aktivitas Biologis IgY

Aktivitas biologis IgY diuji terhadap pengaruh pH, panas, dan enzim pencernaan seperti pepsin dan tripsin. Pengujian ini perlu dilakukan berkaitan dengan kemungkinan aplikasi secara *per oral* (Rawendra, 2005).

Pengaruh pH.

IgY diinkubasikan ke dalam larutan HCl pH 2 dan 4 selama 30 menit, kemudian dikembalikan ke pH normal (7-7,5) dan diuji aktivitasnya dengan uji netralisasi (Soejoedono dan Wibawan, 2005).

Pengaruh Panas

Pengujian ketahanan IgY terhadap panas, dilakukan dengan merebus telur pada berbagai tingkatan temperatur antara 75°C dan 100°C pada selang waktu 30 menit (Soejoedono dan Wibawan, 2005).

Pengaruh Enzim

Pengujian aktivitas IgY setelah pemberian enzim pepsin dan tripsin dilakukan dengan uji netralisasi (Soejoedono dan Wibawan, 2005).

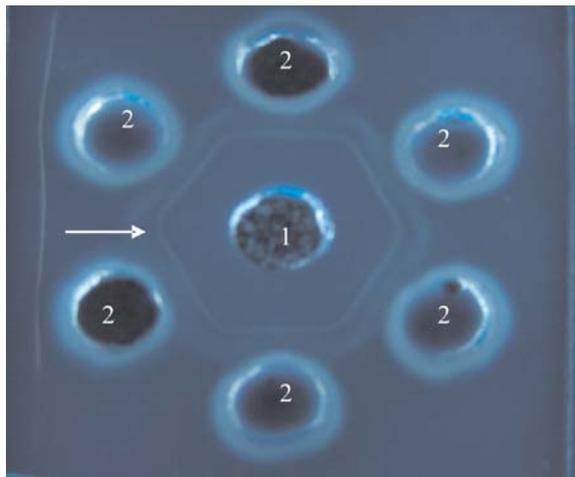
Uji Netralisasi *in Ovo*

Cara pemberian lewat suntikan, menghindarkan IgY dari efek panas, pH dan reaksi enzimatis dalam saluran pencernaan. Pengujian dilakukan secara *in vitro* menggunakan *Serum Neutralization Test* (SNT) dan pengukuran titer protektif, sedangkan secara *in vivo* dilakukan dengan menggunakan telur embrio tertunas (TET) (metode *in ovo*). IgY spesifik yang telah dimurnikan diencerkan hingga mencapai titer HI 2^4 dan suspensi virus diencerkan sampai konsentrasi titer 10^4 EID₅₀. Sejumlah 200ul IgY ditambahkan dengan 200ul suspensi virus (10^4 EID₅₀) dan diinkubasikan selama 30 menit pada suhu ruang. Masing-masing pengenceran selanjutnya diinokulasikan ke dalam 3 butir telur ayam berembrio. Sebagai pembanding digunakan 3 butir telur yang hanya diinokulasi 200ul suspensi virus AI H5N1 tanpa IgY dan 3 butir telur yang disuntik dengan 400ul larutan bufer (PBS). Telur diinkubasikan, pertumbuhan dan perkembangan embrio diamati setiap hari dan dicatat adanya kematian. Bila terjadi kematian telur diperiksa terhadap adanya pertumbuhan virus dengan uji aglutinasi cepat.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Produksi IgY

Ayam petelur berespon sangat baik terhadap antigen vaksin virus H5N1 yang disuntikkan. Pembentukan antibodi spesifik terhadap H5N1 dalam serum, telah dapat dideteksi dengan uji HI pada minggu pertama, dengan kisaran titer 2^2 - 2^4 setelah penyuntikan pertama. Pada saat ini, reaksi presipitasi antara IgY dalam serum dengan antigen virus AI H5N1 belum terbentuk dengan jelas pada uji imunodifusi. Titer antibodi H5N1 dalam serum meningkat dengan kisaran titer menjadi 2^7 - 2^9 setelah dilakukan penyuntikan kedua dan seterusnya (*booster*). Keberadaan antibodi spesifik terhadap antigen virus H5N1 dalam serum dan kuning dapat ditampilkan dalam uji presipitasi (AGPT) (Gambar 1). Reaksi spesifik ditandai dengan adanya garis presipitasi antara sumur antigen dan antibodi homolognya.



Gambar 1. Reaksi presipitasi antibodi spesifik terhadap antigen virus AI H5N1 dalam serum. 1. Antigen H5N1; 2 Serum Ayam percobaan. Garis presipitasi (tanda panah)

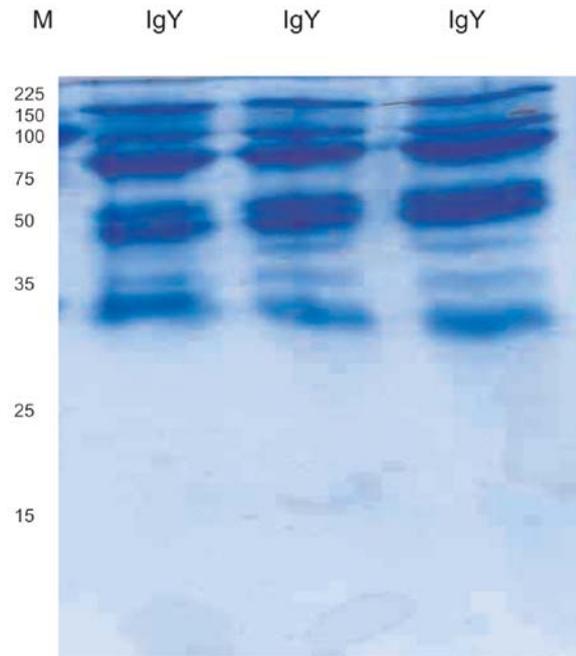
Reaksi presipitasi pada uji imundifusi ini menunjukkan konsentrasi IgY dalam serum dan kuning telur cukup tinggi, karena reaksi presipitasi terjadi bila titer IgY di atas 2⁷. Hasil ini juga menunjukkan bahwa IgY spesifik H5N1 dari serum darah dapat ditransfer ke dalam kuning telur secara efektif. Keberadaan antibodi spesifik terhadap virus AI pada kuning telur menunjukkan pula prospek yang sangat baik untuk memproduksi antibodi AI dalam telur ayam atau telur unggas lainnya. Peluang sangat terbuka lebar untuk memanfaatkan telur sebagai pabrik biologis dalam produksi bahan biologis penting lainnya.

Pemurnian IgY

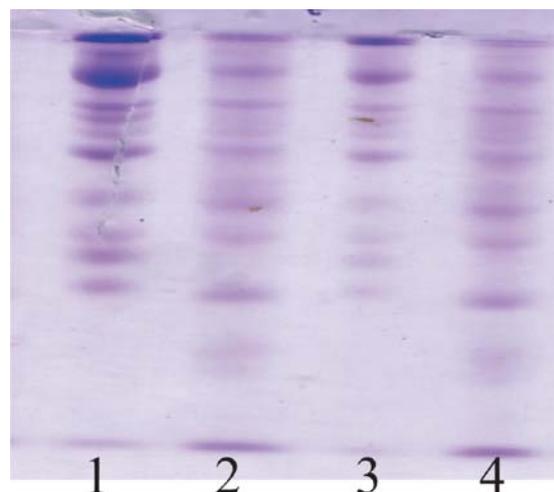
IgY dimurnikan dengan *Promegas EGGstarct IgY purification system*. IgY tersebut memiliki konsentrasi protein 7,89 mg/ml. Berdasarkan karakterisasi protein IgY dengan elektroforesis SDS-PAGE diketahui bahwa IgY terdiri dari sekurang-kurangnya enam jenis protein utama yang masing-masing berukuran 225 kD, 150 kD, 100kD, 75 kD, 57,5kD serta 35 kD (Gambar 2). Aktivitas spesifik IgY murni terhadap H5N1 diuji dengan menggunakan teknik HI test dan AGPT. Berdasarkan uji HI diperoleh titer titer adalah adalah 2⁷

Aktivitas Biologi IgY

Uji biologi IgY dilakukan dengan menguji kepekaan IgY terhadap suhu (pemanasan), pH dan ketahanan terhadap enzim pencernaan seperti pepsin dan tripsin. Berdasarkan



Gambar 2. Pita protein IgY anti AI H5N1 murni (3x ulangan preparasi) setelah proses purifikasi menggunakan affinitas khromatografi.



Gambar 3. Degradasi protein IgY setelah berbagai perlakuan: setelah dicerna enzim pepsin pada pH 2 (1), setelah dicerna dengan enzim tripsin (2), perlakuan panas 75°C, 30 (3) menit dan 95°C (4).

pengamatan diketahui bahwa IgY tahan terhadap pemanasan 65°C selama 30 menit tetapi tidak tahan terhadap pemanasan 75°C selama 30 menit. Hal serupa dinyatakan pula oleh Hatta *et al.* (1993), bahwa IgY tahan terhadap pemanasan 60°-70°C dalam waktu 10 menit. Penurunan aktivitas IgY mulai terjadi

Tabel 1. Kemampuan netralisasi IgY spesifik anti virus AI H5N1 terhadap virus HPAI H5N1 secara in ovo. (agar data ini dicek kembali)

	Jumlah Telur	Respon		% kematian
		hidup	Mati	
Virus AI H5N1	3	0	3	100
IgY+ virus AI H5N1	3	3	0	0
Placebo	3	3	0	0

jika waktu pemanasan melebihi 15menit pada suhu 70°C (Shimizu *et al.*, 1988; 1992) dan IgY terdenaturasi bila dipanasi lebih dari 75°C (Chang *et al.*, 1999).

Perlakuan dengan pH 2 dan pepsin, IgY menunjukkan degradasi protein, tetapi tahan terhadap pH 4 namun tidak tahan terhadap aktivitas tripsin. Sebelum terdenaturasi IgY memiliki sekurangnya 6 protein utama (Gambar 2), namun setelah denaturasi terbentuk pita protein yang semakin banyak. Hal ini dapat ditunjukkan dengan pewarnaan *commasie blue* pada SDS-PAGE (Gambar 3).

Setelah IgY mendapat perlakuan panas, pH, dan enzimatik, IgY yang terdegradasi tidak mampu menunjukkan reaksi prisiptasi pada uji imunodifusi, meskipun demikian pada uji HI masih bisa terdeteksi titer IgY spesifik terhadap antigen virus AI H5N1 dengan penurunan titer 100 kali dari semula (data tidak ditampilkan). Hasil yang serupa dikemukakan juga oleh beberapa peneliti sebelumnya, yang menyatakan bahwa aktivitas IgY mulai menurun pada pH 3,5 atau di bawahnya dan kehilangan aktivitasnya pada pH 3 (Shimizu *et al.*, 1992; 1993, Lösch *et al.*, 1986, Hatta *et al.*, 1993, Lee *et al.*, 2002 b). Penurunan aktivitas IgY yang sangat tajam pada pH rendah ini mengindikasikan adanya perubahan atau kerusakan konformasi fraksi Fab dan *binding site* IgY. IgY relatif resisten terhadap tripsin tetapi sensitif terhadap pepsin, meskipun diketahui bahwa kepekaan IgY terhadap pepsin bersifat pH-dependent, artinya pepsin mampu bekerja sempurna bila pH reaksi ada di bawah 4,5. Aktivitas IgY hilang akibat tercerna pepsin, tetapi 39% aktivitasnya masih terdeteksi setelah diinkubasi dengan tripsin selama 8 jam (Shimizu *et al.*, 1988). Hatta *et al.*, (1993) selanjutnya menyatakan bahwa IgY tercerna sempurna pada pH 2, sedangkan pada pH 4 aktivitasnya masih terdeksi 91% dan 63% setelah inkubasi masing-masing 1 dan 4 jam. Proses perebusan atau pengolahan telur dengan

cara pemanasan akan menurunkan daya netralisasi IgY aktifnya dan lebih lanjut jika dikonsumsi sebagai pangan (*functional food*), IgY mengalami proses pencernaan enzim lambung (tripsin dan pepsin) pada suasana asam. Dalam penelitian ini, *assay in vivo* tidak dilakukan, namun data di atas memberikan indikasi bahwa pemanfaatan kuning telur sebagai *functional food* masih memerlukan perlakuan khusus (*coating*) untuk menghindari kerusakan akibat proses pemasakan, pH maupun reaksi enzimatik dalam saluran cerna.

Uji netralisasi Virus H5N1 dengan Menggunakan IgY yang Telah Dimurnikan yang Berkhasiat Anti virus AI H5N1

Uji netralisasi Virus H5N1 dengan menggunakan IgY asal kuning telur yang telah dimurnikan (titer HI 2⁴) mampu menetralsasi virus AI H5N1 (10⁴ EID 50). Pada telur yang diinokulasi virus AI H5N1 tanpa IgY, seluruh embrio pada telur mengalami kematian dalam selang waktu 24-48 jam setelah inokulasi, disertai tanda perdarahan yang hebat. Berbeda dengan itu, telur yang diinokulasi dengan virus AI H5N1 yang sebelumnya telah dinetralkan dengan IgY, seluruh embrio hidup dan berkembang secara sempurna, sama seperti pada kelompok telur yang disuntik larutan *buffer (placebo)*. Preinkubasi virus AI H5N1 menggunakan IgY spesifik terhadap virus AI H5N1 yang telah dimurnikan mampu menginaktifkan virus AI H5N1 sehingga tidak menyebabkan gangguan pertumbuhan dan perkembangan embrio. Hasil ini memberi indikasi bahwa IgY spesifik anti H5N1 dapat digunakan sebagai imunoterapi (imunisasi pasif) dalam usaha pencegahan atau mungkin pengobatan flu burung.

Hasil penelitian ini memberikan inspirasi tentang kemungkinan penggunaan IgY ini sebagai imunoprofilaksis untuk AI, yang bisa diaplikasikan secara *spray (aerosol)*, menggunakan prinsip "*Nasal Passive IGY*

Antibody Prophylaxis” untuk obat hewan dan manusia. Terobosan pemikiran tentang usaha peningkatan kekebalan permukaan (*local and mucosal defence*) melalui aplikasi serum kebal secara pasif belum banyak dipikirkan, khususnya yang berkaitan dengan penyakit flu burung. Cara ini sangat mungkin dilakukan pada ayam broiler yang dipanen dalam waktu relatif pendek (5 minggu), aplikasi *spray* dapat dilakukan pada umur minggu kedua dan ketiga untuk mensubstitusi maternal antibodi yang kemampuan proteksinya hanya bertahan hingga umur 10-14 hari (Hamal *et al.*, 2006).

SIMPULAN

Telur ayam dapat digunakan sebagai pabrik biologis untuk memproduksi IgY spesifik terhadap virus AI H5N1 dalam jumlah yang memadai. IgY dalam kuning telur memiliki kemampuan netralisasi terhadap virus AI H5N1 dan memiliki peluang yang cukup besar untuk dimanfaatkan sebagai imunoterapi dalam pencegahan dan pengobatan penderita flu burung.

SARAN

Perlu dilakukan penelitian secara spesifik tentang usaha mempertahankan dan melindungi daya khasiat IgY dalam telur terhadap perlakuan panas, asam lambung dan enzim-enzim pencernaan lainnya sehingga dapat diberikan sebagai *nutraceutical food* atau *functional food*.

Ucapan Terimakasih

Ucapan terimakasih disampaikan kepada Kementerian Riset dan Teknologi atas dukungan dana penelitian melalui Riset Unggulan Insentif tahun 2007-2008. Ucapan terimakasih disampaikan pula kepada Eri Hermawan, SE yang banyak membantu dalam menyiapkan bahan tulisan dan editing publikasi ini.

DAFTAR PUSTAKA

Carlander D. 2002. Avian IgY Antibody. In Vitro and In Vivo. Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from Faculty of Medicine 119. ACTA Universitatis Uppsala, Center Texas A & M University Kingsville.

- Chang HM, Ou-Yang RF, Chen YT, Chen CC. 1999. Productivity and some properties of immunoglobulin specific against *Streptococcus mutans* serotype C in chicken egg yolk (IgY). *J Agric Food Chem*, 47: 61-66.
- Coleman MA. 2000. Using Egg Antibodies to Treat Diseases. In: Egg Nutrition and Biotechnology. Sim JS, Nakai JS, Guenter W (Eds). Wallingford. UK. CABI Publish.
- Finlay B. 2002 *Enteropathogenic E. coli (EPEC) And Enterohemorrhagic E. coli (EHEC, E. coli O157:H7)* Dr. Brett Finlay's Laboratory <http://www.hhmi.org/grant/lectures/1999/index.htm>. [oktober 2002].
- Gassmann M, Thommes P, Weiser T, Hubscher U. 1990. Efficient production of chicken egg yolk Antibodies Against A conserved mammalian protein. *FASEB Journal* 4: 2528-2532
- Hatta H, Tsuda K, Akachi S, Kim M, Yamamoto T. 1993. Productivity And some properties of egg yolk Antibody (IgY) Against human rotavirus compared with rabbit IgG. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 57: 450-454
- Hatta H. *et al.*, 1993. Productivity and some properties of egg yolk antibody (IgY) against human rotavirus compared with rabbit IgG. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 57(3), 450-454.
- Hatta H, Tsuda K, Ozeki M, Kim M, Yamamoto T, Otake S, Hirasawa M, Katz J, Childers JNK, Michalek SM. 1997. Passive immunization Against dental plaque formation in humans: effect of A mouth rinse containing egg yolk Antibodies (IgY) specific to *Streptococcus mutans*. *Caries Res.* 31(4):268-74,
- Hamal KR, Burgess SC, Pevzner IY, Erf GF. 2006. Maternal Antibody Transfer from Dams to Their Egg Yolks, Egg Whites, and Chicks in Meat Lines of Chickens. *Poult Sci.* 85:1364-1372
- Kermani-Arab V, Moll T, Cho BR, Davis WC, Lu YS. 2001. Effects of Ig Y Antibody on The Development of Marek's. Disease. *Avian Dis* 20 : 32 – 41.
- Lee EN, Sunwoo HH, Menninen K, Sim JS, 2002a. *In vitro* studies of chicken egg yolk antibody (IgY) against *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Typhimurium. *Poult. Sci.* 81, 632-641.
- Lee KA *et al.*, 2002b. Acid stability of anti-*Helicobacter pylori* IgY in aqueous polyol solution. *J Biochem Mol Biol*, 35: 488-493.

- Schade R, Hlinak A. 1996. Egg yolk antibodies, state of the art and future prospects. *ALTEX*, 13(1), 5-9.
- Schade R, Henklein P, Hlinak A. 1997. Egg yolk Antibody: state of the Art And Advantageous use in the life sciences. In: *Animal Alternatives, Welfare And Ethics* (Zutphen, L. F. M., And Balls, M., eds) pp. 973–981, Amsterdam, Elsevier.
- Schmidt P, Hafner A, Reubel GH, Wanke R, Franke V, Losch U, Dahme E. 1989. Production of antibodies to canine distemper virus in chicken eggs for immunochemistry. *J Vet Med B* 36:661-668.
- Shin WR, Choi IS, Kim JM, Hur W, Yoo HS. 2002. Effective methods for the products of IgY using immunogens of *Bordetella bronchoseptica*, *Pasteurella multocida* and *Actinobacillus pleuropneumonia*. *J Vet Sci*, 3(1):47-57
- Shimizu M, Nakai S, Fitzsimmons RC. 1988. An-*E. coli* immunoglobulin Y isolated from egg yolk of immunized chickens as a potential food ingredient. *J Food Sci.*, 5, 1360–1366.
- Shimizu M. *et al.*, 1992. Molecular stability of chicken and rabbit immunoglobulins G. *Biosci Biotechnol Biochem*, 56, 270-274.
- Shimizu M, Nagashima H, Sano K, Hashimoto K. 1993. Comparative studies on molecular stability of immunoglobulin G from different species. *Comp Biochem Physiol* 106(2), 255-261.
- Shimizu M, Nagashima H, Hashimoto K, Suzuki T. 1994. Egg yolk antibody (IgY) stability in aqueous solution with high sugar concentrations. *J Food Sci*, 59(4), 763-772.
- Smith Daniel J, King WF, Godiska R. 2001. Passive Transfer of Immunoglobulin Y Antibody to *Streptococcus mutans*. *Exp Dental Caries Infect Immuni*, 69 C5 : 3135-3142.
- Soejoedono RD, Wibawan IWT. 2005. Pemanfaatan telur ayam sebagai pabrik biologis: Produksi IgY anti plaque dan diare dengan titik berat pada anti S. mutan dan Salmonella enteritidis. Laporan RUT XII.
- 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 bacteria. *Biosci Biotech, Biochem* 60(5):886-888.