

Perspectives on using chicken egg yolk antibodies in immunoassays for detection of mycotoxin exposure levels

Literature review

Zs. Molnár^{1*}
A. Tóth¹
K. Bodó²
T. Török²
B. Babarczi¹
L. Bodrogi¹
A. Török¹
Gy. Nagyéri^{1,2}
Zs. Szőke¹

1. Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem, Genetika és Biotechnológia Intézet, Állatbiotechnológia Tanszék, H-2100, Gödöllő, Szent-Györgyi Albert utca 4.

*e-mail: molnar.zsofia@uni-mate.hu

2. Soft Flow Kft., K+F Laboratórium, Pécs

Perspektívák a csirkeantitestek immunoassay-ben történő használatához a mikotoxinexpozíciós szintek kimutatására

Irodalmi összefoglaló

Molnár Zsófia^{1*}, Tóth Arnold¹, Bodó Kornélia², Török Tímea², Babarczi Bianka¹, Bodrogi Lilla¹, Török Alexandra¹, Nagyéri György^{1,2}, Szőke Zsuzsanna¹

ÖSSZEFOGLALÁS

A populációk természetes és antropogén eredetű behatások általi kitétsége egyre jelentősebb. A környezetterhelő anyagok, így a mikotoxinok is, felhalmozódhatnak az élő organizmusokban, fiziológiás és viselkedésre gyakorolt hatást kiváltva. A zearalenon (ZEA) mikotoxin, egy ösztrogén-szerű, endokrin diszruptor, a szennyezett takarmányok fogyasztásával deponálódhat. Hasonlóan az expozíciós források felismeréséhez, a ZEA akkumulációjának mérése közös érdekünk. A tanulmány elsősorban az alkalmazható csirke immunglobulin és immunoassay fejlesztéseket gyűjti össze; külön kiemelve a munkacsoport fókuszában levő ZEA detektáláshoz kapcsolódó lehetőségeket.

SUMMARY

The exposure of animal or even human populations in contact with natural and/or anthropogenic impacts is becoming more and more frequent and significant. These environmentally harmful substances, such as mycotoxins, are able to accumulate in living organisms and then trigger a number of physiological and/or behavioral effects. Because of their structure, mycotoxins even get into the nucleus, where they modificate different molecular pathways, also causing significant economic damage in the case of wildlife or domestic animals. The mycotoxin zearalenone (ZEA), today's relevant estrogen-like, endocrine disrupting agent, can be deposited by consuming contaminated cereals and feed. Similar to the identification of exposure sources, the detection and measurement of the accumulation of ZEA (and other similar mycotoxin agents) as soon as possible is (would be) in our common interest. One possibility of measurement is an immunoassay that specifically recognizes the agent, and the use of immunoglobulins as binding agents in the assay. However, the development of binding agents (especially mammalian, monoclonal antibodies) can be an expensive, long-lasting and complex process. As an alternative solution, polyclonal poultry antibody (IgY), which can be easily, cheaply and quickly produced from eggs, is increasingly used for the above purpose. The study primarily collects IgY and immunoassay developments applicable to mycotoxin measurement; highlighting the related possibilities of ZEA detection, which is in the focus of our group. IgY is an effective perspective, but at the same time, it can also present developers with many challenges, of which the most important are also demonstrated by the authors through the example of ZEA.

BAROMFI

Napjainkban a vadállomány, házi- és haszonállatok vagy akár az érintkező emberi populációk természetes vagy antropogén eredetű behatások általi kitettsége egyre jelentősebb [1]. A társadalmi evolúció gyorsulása, a természetes élőhelyek csökkenése, a megművelt, hasznosított területek növekedése, klímaváltozás és kapcsolódó természeti változások a behatások, vagy másnéven expozíciók újabb és újabb mintázatait generálják [2]. Az expozíciók rövid (pár nap), de akár hosszú távú folyamatos kitettséget is jelenthetnek, és legtöbbször az organizmusokra együttes-összetett módon hatnak. A behatások tér,- és időbeni „dinamikája” is folyamatosan változik; az élőlények új, eddig „nem jelentkezett” expozícióval, koncentrációs szintekkel találkozhatnak, vagy eddig nem érintett organizmusok is az adott expozíció alá kerülhetnek [3].

A környezetterhelő anyagok jelentős része képes átjutni a sejthártyán, a sejtbe, sejtmagba kerülhetnek és felhalmozódhatnak

A környezetterhelő anyagok jelentős része nagy stabilitású vegyület és szerkezetüket tekintve gyakran ún. szemipermeábilisak [4, 5]. Apoláris jellegüknek köszönhetően képesek átjutni a sejthártyán, a sejtbe, sejtmagba kerülhetnek és felhalmozódhatnak. Felhalmozódva módosíthatnak számos molekuláris folyamatot, jelátviteli utat, és/vagy a nukleinsav állományhoz kötődve, génextpressziós változást, expressziót vagy repressziót is kiválthatnak. A fiziológiás hatásukat tekintve sok esetben endokrin folyamatokat is befolyásolnak, és viselkedésmin-tázat-változásokat is előidézhetnek [6–8].

A mikotoxinok természetes eredetű, szerves, sok esetben a hormonrendszert zavarni képes környezetterhelő anyagok, egyes penészgombák másodlagos anyagcseretermékei [8]. A tápláléklánc minden szintjén történő megjelenésük, és az élő organizmusokban történő felhalmozódásuk századunk egyik legégetőbb problémáját jelenti, amelynek megoldására folyamatosan törekedni kell [9]. A klímaváltozás kedvez egyes termelő gombák elterjedésének, ami az érintett állati és humán populációk gyakoribb, akár betegségekben megnyilvánuló (multi)mikotoxikózisaihoz vezethet [10, 11]. Perzisztensek, és permeábilisek, ami a kialakuló mikotoxin-bioakkumuláció fő oka is egyben. A termelő penészgombák szaporodása és toxintermelése döntően függ a környezeti hőmérséklettől és a csapadék mennyiségétől, ezért napjainkban már valószínűsíthető akár egy lokális (mikro)környezet mikotoxinprofil/ eloszlás változása is [12]. A többszörös behatás, a szinte általánosan tapasztalható multimikotoxin-szennyezettség felveti az expozíciók-interakciók jelentőségének és vizsgálatának kérdését is. Több toxin együttes hatása nem mindig becsülhető előre az egyes toxinok önálló hatásai alapján, mivel azok egymást módosíthatják, szinergista vagy antagonistá módon hathatnak [8, 10, 11]. A behatások és ideális esetben a kiváltott hatások felismerése, detektálása és mérése esszenciális a szükséges cselekvési megoldások meghatározásához. A megelőzés és felismerés (mint „leghatékonyabb” cselekvés) fontos eleme lehet a ható mikotoxinszintek alkalmas, kellően érzékeny, gyors, egyszerű, költséghatékony és célzott monitorozása [13, 14].

Napjainkban a több száz ismert mikotoxin közül csak néhányat szabályoznak törvények

Napjainkban a több száz ismert mikotoxin közül csak néhány, ténylegesen releváns, gyakori, jelentős gazdasági és egészségügyi kockázatot képviselő mikotoxinok kaptak már publicitást, ill. kiváltott hatásai miatt váltak a törvény által szabályozottá [4, 13, 15]. Az expozítorok és így a mikotoxinok egy részének is a maximálisan elfogadható, és tolerálható szintjei (egy adott expozíciós forrásban, pl. gabonafélékben, élelmiszerekben vagy takarmányban) meghatározottak, törvényi szabályozás által (pl. a Bizottság 1881/2006/EK rendelete). Fontos azonban megemlíteni, hogy a törvényi határérték alatti szintek is elérhetnek a felhalmozódásukkal egy olyan küszöbértéket (threshold), amely a behatás(ok)nak kitett organizmusra akár komoly egészségügyi kockázatot jelent [4, 14, 16]. A törvényi szabályozás, bár országonként, régióként eltérő lehet, de általában kiterjed az aflatoxinok, a zearalenon (ZEA), a trichotecének (pl. a dezoxinivalenol, a T-2 és HT-2 toxinok) a fumonizinek, az Ochratoxin A, a citrinin vagy a patulin meghatározására [17].

Az állatok és az emberek egyaránt egyre fokozódó környezeti terhelésnek vannak kitéve

A zearalenon egy gyakori, ösztrogénhatású endokrin diszruptor mikotoxin

A zearalenon mérésére számos analitikai, ill. immunoassay-alapú eljárás érhető el

Az emlős (különösen a monoklonális) ellenanyagok fejlesztési és termelési költsége jelentős lehet

A ZEARELENON MIKOTOXIN ÉS ISMERT KIMUTATÁSI LEHETŐSÉGEI

A zearalenon (ZEA) egy gyakori, endokrin diszruptor mikotoxin. A ZEA ösztrogén-szerű jellegével, a szaporodásbiológiai, a fiziológiás folyamatokra és a viselkedésre gyakorolt káros hatásával szükségszerűen a kötelezően mérendő toxinok közé tartozik, így jelentősége vitathatatlan [18]. Az EU-ban, így hazánkban is a feldolgozatlan gabonafélékben a ZEA megengedett maximális értéke 100 ppb (parts per billion), kukoricában 200 ppb, ugyanakkor az emberi fogyasztásra szánt gabonában vagy késztermékben, terméktől függően 50–75 ppb [1881/2006/EK]. Az alacsonyabb szintek, valamint a felhalmozódás problémaköre a törvény által nincs szabályozva.

A kereskedelemben számos, ZEA (és más mikotoxin) mérésre alkalmas, kémiai-analitikai vagy akár immunoassay-alapú eljárás (mérési szolgáltatás vagy méréshez szükséges, Kit-jellegű termék) érhető el. Az immunoassay-eljárások általában jóval egyszerűbbek, gyorsabbak és költséghatékonyabbak, mint a „gold standardként” jelenleg elfogadott, „akkreditált” eredményt biztosító, ún. nagy hatékonyságú, analitikai eljárás folyadékkromatográfia (high-pressure liquid chromatography, HPLC); ugyanakkor hasonló érzékenységek és validáltak [19, 20]. A HPLC-mérés műszerezettség, szaktudást igényel, és az áteresztőképessége is limitált. Az immunoassay-alapú eljárások sok esetben akár közvetlen ott, ahol szükséges a felhasználás, így a mezőgazdasági területeken (termőföldön pl. a betakarításkor, termelőknél pl. termény tárolásakor, eladásakor, feldolgozóiparban, kereskedelemben stb.) szakképzetlen felhasználókkal, minimális vagy nulla laboratóriumi háttérrel, eszközökkel, mérőműszerek nélkül is alkalmazhatók. Az eredmények segíthetnek a terménnyel, termékkel kapcsolatos-szükséges döntések, beavatkozások elrendelésére és/vagy az ár, vagy akár az eladhatóság képzésében vagy kérdésében.

Ezek a módszerek általában ún. enzimhez kötött immunszorbens próba (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) kitek vagy laterális áramlású gyorsesztek (lateral flow device, LFD) [21–23]. Az említettek többsége azonban csak az érintett növényi vagy a származtatott mátrixok (termények, termékek, mint expozíciós források) mikotoxin-tartalmát képesek mérni. Az eljárások a törvényi szabályozásnak megfelelően működnek, a határértékek detektálása (pl. ZEA esetében az 50–200 ppb) megbízható, akár kvantitatív módon kivitelezhető. Az érzékenységek változó lehet, de a legtöbb esetben a diszkrét (határérték alatti jóval kisebb, pl. a ppt /parts per trillion/ nagyságrendű) dózisos már nem mindig mérhető.

Kevés rendelkezésre álló, piaci eljárás validált az akkumulálódott ZEA-szintek mérésére vérből vagy vizeletből, és gyakorlatilag nincs jelenleg piaci megoldás az állati szervekből (vagy akár humán testfolyadékokból) extrahált mikotoxinok, pl. a ZEA mérésére.

IMMUNOASSAY-ELJÁRÁSOK ÉS IMMUNGLOBULINKÖTŐ ÁGENSEK

Az ELISA vagy LFD eljárások legfontosabb komponense a mérendő vegyületet (pl. a ZEA-t) a mátrixban, megfelelő érzékenységekben, specifikusan felismerni képes, általában immunglobulin (Ig) fehérjekötő ágensek (ellenanyagok). Legtöbb esetben emlőseredetű (monoklonális és/vagy poliklonális egér, nyúl, kecske IgG vagy M) ellenanyagokat fejlesztenek és alkalmaznak mérési célokra. Az emlős (különösen a monoklonális) Ig-k fejlesztési és termelési költsége azonban nagyon nagy lehet, és sok esetben akár invazív eljárással megvalósuló, állatetikai szempontból vitatható folyamat. Elmondható, hogy a kívánt minőség elérése és fenntartása emlősel-lenanyagokkal igen költséges. Ezért, mint lehetséges alternatíva, egyre inkább előtérbe kerül a tojásból, könnyen, olcsón, nagy mennyiségben és akár hosszú ideig folyamatosan kinyerhető poliklonális madár- (legtöbb esetben baromfi) IgY) mérési eljárási célú alkalmazásra (1. ábra).

1. ÁBRA. TETRA-SL tojtyúk
IgY-termelés céljából

FIGURE 1. TETRA-SL chickens
housed for IgY production



**A tojásból kinyerhető
csirke-IgY előállítása
könnyebb, olcsóbb,
állatvédelmi
szempontból is
előnyösebb**

**Az IgG-hez hasonlítva
az IgY antigénkötő
specifitása közel
azonos, mégis jobban
felhasználható a
diagnosztikában**

Az IgY felhasználása egy igen széles skálájú spektrumon mozog, amelynek okai közé sorolható, hogy az antitestet a tojássárgájából ki lehet nyerni, ezáltal az állat kivéreztetése, elpusztítása nem szükséges [24], a technika kevésbé invazív [25]; a kinyerhető antitest mennyisége hasonló nagyságrendű, mint emlősök esetében [26] és a felnőtt csirkék által termelt IgY koncentrációja a szérumban elérheti akár az 5–7 mg/ml értéket [24]. Egy-egy tojó megközelítőleg 240–280 tojást rak éves szinten [27], míg egy tojás akár 100–150 mg IgY-t tartalmazhat [24]. Másik fontos előnye a madarak és az emlősök különbözősége a filogenetikai távolság és genetikai háttér tekintetében, amelyek révén immunválasz keletkezik olyan antigének és epitópok ellen is, amelyek emlősökben „már” nem immunogének [28]. Az evolúciós távolságnak köszönhetően az IgY több epitópot ismer(het) fel, ill. lehetőség nyílik olyan antitestek fejlesztésére, amelyek erősen konzervált emlősproteinek ellen hatnak [24]. Az IgY termeltethető baktériumok, gombák, növények és állati eredetű proteinek vagy szénhidrát komponensek, peptidek, lipid hormonok vagy vírusok ellen [29]. Fontos jellemzője még az IgY-nek, hogy felhasználása immunológiai-szerológiai tesztekben igen kedvező, mivel az IgG-vel ellentétben nem okoz interferenciát [24]. Az IgG-hez hasonlítva az IgY antigénkötő specifitása közel azonos, mégis néhány egyedi tulajdonságának révén jobban felhasználható a diagnosztikában. Az IgY nagy kötési erősségét a konzervált emlősproteinek ellen az evolúciós változásainak köszönheti [30]. Az IgY képes az emlőskomplement-aktiváció által létrejövő interferencia csökkentésére immunológiai assay-ben [24]. Az IgY humán esetben nem aktiválja a komplementrendszer, így az interferenciát csökkenti/elminálja [31]. A humán szérum rheumatoid faktort (RF) és humán anti-IgG antitestet (human anti-mouse antibody, HAMA) is tartalmazhat, amely tényezők szintén az immunológiai-assayben fellépő fals pozitív eredmények okozói lehetnek [32], ill. IgG használatával interferencia alakulhat ki közöttük [33]. IgY esetében nem jön létre interferencia [31] és alkalmazásával a fals pozitív eredmények is minimalizálhatók [34]. A táblázatban az IgG és IgY fontosabb tulajdonságait hangsúlyoztuk.

TÁBLÁZAT. IgG és IgY fontosabb paraméterei és összehasonlítása**TABLE.** Comparison and main parameters of IgG and IgY

Paraméterek	IgG	IgY
Fajok	Emlősök (néhány faj kivételével)	Madarak, hüllők, kétélűek és tüdőshalak
Antitest gyűjtése	Invazív	Nem-invazív
Koncentráció (mg/mL)	10–12 (szérum)	8–10 (szérum), 15–25 (tojássárgája)
Molekula súly (kDa)	Kb. 150	Kb. 180
Konstans domének száma	4	3
Kapocs (Hinge) régió	igen	Nem
Interferencia az emlős IgG-vel	igen	Nem
Fc-receptorkötés	igen	Nem
Komplement-kötés/ aktiváció	igen	Nem
Rheumatoid faktor kötés	igen	Nem
Protein A/G vagy L kötődés	igen	Nem
Alkalmazás	Szerológia, Diagnosztika, Vakcináció, Immunterápia, Kutatás és fejlesztés Gyakori immunoassay-komponens (pl. LFD, ELISA eljárásokban)	Szerológia, Diagnosztika, Vakcináció, Immunterápia, Kutatás és fejlesztés Ritka immunoassay-komponens (pl. LFD, ELISA eljárásokban)

A BAROMFI IMMUNRENDSZERE, IMMUNGLOBULINOK ÉS SAJÁTOS SÁGAIK

A madarak immunrendszere hasonló általános elveken működik, mint az emlősök immunrendszere, beleértve a felépítést és a funkcionalitást. Az antigénstimuláció olyan immunválaszt indít el, amely a cellularis elemek, mint a macrophagok, a B-lymphocyták és a T-lymphocyták közötti szoros együttműködést foglalja magában [35]. Egyszerűsítve a folyamatot, az antigén-prezentáló sejtek (pl. macrophagok és dendritikus sejtek) feldolgozzák az antigént, és azt a lymphocytáknak mutatják be. A B-lymphocyták, a humoralis immunitást közvetítő fő sejtek, az immunválasz során antitest termelő plazmasejtekévé, míg a cellularis immunitás szempontjából legfontosabb T-lymphocyták funkcionálisan változatos alpopulációk irányába differenciálódnak [36].

Az evolúció során a madaraknál vált szét az adaptív immunrendszerhez tartozó T- és B-lymphocyták keletkezési helye (a Fabricius-tömlő/*bursa Fabricii* megjelenésével), és alakultak ki olyan lymphoid sejthalmazok, amelyek az emlősök nyirokcsomóinak az elődeiként tarthatók számon. Említésre méltó még, hogy a madár B-sejtprekurzorok olyan őssejtekből származnak, amelyek a tojássárgaburokban és a csontvelőben találhatóak. Ezek a B-sejtprekurzorok a csontvelőből a Fabricius-tömlőbe kerülnek [36, 37], ahol a sejtek negatív szelekción esnek át. A negatív szelekciót követően a megmaradt, nem apoptizált B-sejtek a saját antigénnel nem, vagy csak nagyon gyengén reagálnak, így pozitív szelekció által proliferálódnak. A szelekciót követően ezek a sejtek a másodlagos immunszervekbe (pl. lép, bél-asszociált nyirokszövetek stb.) vándorolnak, ahol az antigénbehátás következtében antitest-szekretáló sejtekké válnak [35, 38].

Az adaptív immunrendszer humoralis részéhez kapcsolható antitestek vagy Ig-k olyan glikoproteinek, amelyek az összes állkapcsos gerincesnél megtalál-

Az evolúció során a madaraknál vált szét az adaptív immunrendszerhez tartozó T- és B-lymphocyták keletkezési helye

Az IgY legnagyobb mennyiségben a vérsérumban és a tojássárgájában van jelen

hatóak. Általános szerkezetükben erősen konzervatívnak tekinthetőek (4 peptid-lánc, amelyet 2 nehéz és 2 könnyű lánc alkot), de különbségek is fellelhetők [38]. A Ig-génátrendeződés folyamatait szabályozó enzimeket kódoló rekombináció-aktiváló géneknek (RAG) köszönhetően az adaptív immunreceptorok diverzitása a madarak esetén is jelentős. A madarak IgM, IgA és IgG (IgY) osztályba sorolható/izotípusú Ig-kal rendelkeznek [38, 39]. Hasonlóan az emlősökhöz, az IgM, IgA és IgY eloszlása a testnedvekben tükrözi a különböző szerepüket a szervezet integritásának fenntartása során. Az immunválasz kialakulásakor elsőként az IgM alakul ki. Pentamer szerkezete, és tulajdonságai tekintetében (antigén megkötése, komplementaktiváció, immunreguláció és -tolerancia) hasonló az emlős IgM-hez. A baromfi IgA-t elsősorban az epehólyagban és a bélben található lymphoid szövetek termelik, a legnagyobb szekretált koncentrációban is az epében, bélben és a tojásfehérjében található [38, 40–42]. Az IgY legnagyobb mennyiségben a vérsérumban és a tojássárgájában (oda transzlokálódva) van jelen [38]. Madarak esetében az IgY az IgG/IgE funkcionális megfelelője [38, 39, 43], azonban számos különbség fellelhető. Pl. összehasonlítva az IgG-vel az IgY a nehézlánc esetén a több konstans régió miatt hosszabb, így a molekula tömege is nagyobb [38]. Megfigyelhető még a nehézlánc alegységeinek az erőteljes glikoziláltsága, az alacsonyabb izoelektromos pont, és a sófüggő polarizáció is. Az IgY erősebben hidrofób, mint az IgG és szerkezeti tulajdonságai miatt ellenállóbb a fragmentációval és a degradációval szemben. Az IgY a hinge régió tekintetében hiányt szenved, így nem aktiválja a humán komplementrendszer és nem kötődik RF-hoz sem [38, 40, 44, 45]. Továbbá az IgG effektor funkcióival sem rendelkezik és nem targetálható/tisztítható bakteriális immunglobulinkötő receptorfehérjével, mint pl. a protein A-val, protein G-vel vagy protein L-lel [38, 46].

Összességében elmondhatjuk, hogy a baromfi IgY-ok előnyös szerkezeti és funkcionális tulajdonságainak, és általában a termeltetés nem-invazív, költségkímélő jellege és hosszú távon is folyamatában gazdaságos fenntarthatósága miatt egyre szélesebb körben használtak az orvosi biológia és agrárium területén [47, 48].

AZ IgY LEHETSÉGES FELHASZNÁLÁSI TERÜLETEI

Az IgY felhasználható
- passzív immunizálásra
- betegségek akut kezelésére
- konvencionális antibiotikumok kiváltására
- antibiotikum-rezisztencia kialakulásának csökkentésére

Az IgY fő alkalmazási csoportjai (a mérési eljárásokban, kötőagensként való felhasználása mellett) a következők: passzív immunizálás – betegségek akut gyors kezelése és a konvencionális antibiotikum kiváltása, antibiotikumrezisztencia kialakulásának csökkentése. Passzív immunizálás során egy másik élőlényvel, jelen esetben baromfival termeltetik a (pl. beteg) gazdaszervezetnek szükséges antitesteket, és azokat „azonnal”, még a saját immunválasz kialakulása előtt alkalmazzák. Néhány példa a teljesség igénye nélkül; IgY-kezelést alkalmaztak pl. a *Pseudomonas aeruginosa*, *Helicobacter pylori*; *Escherichia coli*; *Salmonella spp.*; rotavírus-fertőzés [30]; *Candida albicans* [49–51] ellen; *Staphylococcus aureus* fertőzés és toxikus sokk szindróma kezelésére; veszettségvírus-fertőzés megelőzésére; ill. a xenotranszplantáció esetében fellépő hiperakut rejekció megelőzésére [30]. Az IgY-kezelés hatékonynak bizonyult a Gumboro-betegség [52, 53] ellen; az *Eimeria spp.* által okozott madárcoccidiosis [54, 55] megelőzésében; a kutya parvovírus-2 [56] ellen; vagy garnélarákok esetében a „White spot” betegség vírusa ellen [57]. Ismert továbbá, hogy akut kezelésként IgY-terápiát alkalmaztak afrikai lóbetegség vírusa [58], vagy pl. a *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* által kiváltott paratuberkulózis ellen, amely baktérium a kérődző állatokra veszélyes [59]. Sikeres volt a szarvasmarha leukaemiavírusa [60], a ragadós száj- és körömfájás vírusának szerotipizálása [61], továbbá *Yersinia ruckeri* okozta vörösszáj-betegség kezelésében [62]. Szisztémásan méregközömbösítés céljából [63] kígyóméreg kezelésére is alkalmazták [64, 65]. Az anti-venom IgY nagyobb bioaktivitással rendelkezik, mint a pl. lovakkal termeltetett ellenméreg [66], ezáltal kivételes reagensek nyerhetőek [28].

Napjainkban az antibiotikumrezisztens törzsek egyre nagyobb térnyerése hatalmas kihívást jelent. Egy lehetséges megoldás a probléma csökkentésére az anti-kórokozó (specifikus) IgY antibiotikus hatású, terápiás célú alkalmazása. Ismeretes, hogy pl. a *Mycobacterium tuberculosis* [67, 68] vagy *Edwardsiella tarda* ellen is fejlesztettek már IgY antitesteket. Sok esetben a mérési eljárás célból fejlesztett IgY antitestek is alkalmazhatók lennének a fenti célokra, azonban ilyen irányú felhasználás eddig kevés történt (pl. az *Escherichia coli* O157:H7 [69], *Listeria* spp. [70], *Campylobacter jejuni* [71]).

A 2. ábrán tojótyúkók immunizálása látható IgY (mint assaykomponens) fejlesztés céljából

2. ÁBRA. Tojótyúkók immunizálása (saját ábra)

FIGURE 2. Immunisation of chickens



MIKOTOXIN-ELLENES IgY-FEJLESZTÉSEK ÉS ALKALMAZÁSUK MÉRÉSI ELJÁRÁSOKBAN

Ismereteink szerint mostanáig kevés IgY-fejlesztés célzott mikotoxinokat. Sok esetben csak a fejlesztési folyamat dokumentált, az antitestek tényleges, alkalmazásokban történő felhasználását nem publikálták [71, 72].

Aflatoxinok: Már a 90-es évek elején fejlesztettek poliklonális IgY-t Aflatoxin B1 (AFB1) és M1 (AFM1) mikotoxinok ellen Leghorn tyúkokban (a szerzők szerint ez volt az első publikált anti-aflatoxin IgY-fejlesztés a világon) [73]. AFB1-BSA (szarvasmarha szérum albumin) vagy AFM1-BSA konjugátum/immunogén adjuvánssal történő im. oltásokkal immunizálták az állatokat. Az ellenanyagot a szérumból és tojásból is aspecifikusan tisztították, precipitálták majd indirekt kompetitív ELISA-eljárásban tesztelték azt az alkalmazott immunogének bevonásával. Az antitestek a legnagyobb affinitást a hapténnel (AFB1 vagy AFM1) szemben mutatták, azonban kereszt-reagáltak az egyéb aflatoxin mikotoxinokkal is. A szerzők az antitestek további felhasználásáról a publikációban nem számoltak be, esetleges targetmátrixban történő mikotoxin-kimutatást (pl. az AFM1 nyers tejben) nem igazolták. Pufferkörnyezetben az alkalmazott ELISA-eljárással és fejlesztett IgY antitestekkel 0,5–5 ng/ml (ppb) ZEA kimutatása volt lehetséges. A kutatók az anti-AFB1 IgY-fejlesztést és az antitestek további lehetséges felhasználását is leírták [74]. AFB1-BSA immunogénnel oltottak hosszú ideig,

Már a 90-es évek elején fejlesztettek poliklonális IgY-t Aflatoxin B1 és M1 mikotoxinok ellen

Anti-T-2 IgY-t fejlesztett egy munkacsoport, amit az általuk beállított indirekt kompetitív immunoassay-ben teszteltek

LFD-alapú immunoassay-eljárást fejlesztettek, amivel a kukorica fumonizin B1-tartalmát lehetett kimutatni

20 hétig, 15 napos emlékeztető oltásokkal fehér Leghorn tyúkokat, majd a tojásból az alaptisztítást követően nyert IgY-t további, immunaffinitáson alapuló tisztításnak, funkcionális „bekoncentrálásnak” vetették alá. Az ELISA-alapú funkcionális karakterizálást követően az IgY antitestet arany nanopartikulummal konjugálták és használták fel méréseikben nagy érzékenységű, (akár 5 pikogram aflatoxin/minta) fluoreszcens spektrális analízis alapú AFB1 detektálására. A fenti eljárás a munkacsoport kutatásainak a támogatását, és egy lehetséges bioszenzor fejlesztését szolgálta.

T-2 és HT-2 mikotoxin: Anti-T-2 IgY-t fejlesztett egy munkacsoport, amit az általuk beállított indirekt kompetitív immunoassay-ben teszteltek (de a fejlesztett IgY antitestek későbbi felhasználásról már nem tesznek említést). Különböző T-2-KLH (keyhole limpet hemocyanin) és HT-2-KLH konjugátumokat használtak immunitáshoz. A poliklonális anti-T-2 antitesteket szérumból és tojássárgájából teljes IgY frakcióként nyerték ki affinitáskromatográfia segítségével. Bizonyították, hogy a tojássárgájából kinyert IgY hasonlóan jól használható, mint a szérumból nyert IgY, így az invazív véreztetésre egyáltalán nincs szükség [19].

Fumonizinek: Egy munkacsoport [75] már egy specifikus, anti-T-2 mikotoxin IgY ellenanyagot (fejlesztést) és azt felhasználó, LFD-alapú immunoassay-eljárást fejlesztettek, amivel a kukorica fumonizin B1- (FB1) szennyezettségét lehetett kimutatni. FB1-KLH immunogénnel oltottak Fayoumi tyúkokat adjuvánszal im., majd a tojássárgájából standard technikával előállították, precipitálták az IgY-t. Az antitestek tesztelése közvetlen a felhasználás alapján történt, a fejlesztett LFD-eljárásban. Az antitestek konjugálták arany nanopartikulummal, amit a tesztcsíkon megvalósuló indirekt kompetitív eljárásban alkalmaztak. A tesztcsík FB1-BSA volt, a kontroll csík pedig egy anti-csirke másodlagos ellenanyag. Az eljárást nem csak pufferkörnyezetben, hanem mátrixon is alkalmazták, kukoricaextraktumban mind az FB1 és FB2 szennyezettségét ki tudták mutatni az LFD eljárásra általánosan jellemző assay-körülményekben, -paraméterek mellett (gyors, olcsó, érzékeny, on-site felhasználásban).

Egyéb mikotoxinok: A citrinin, egy kevésbé gyakori mikotoxin ellen is fejlesztettek már IgY ellenanyagot [76], amit indirekt kompetitív ELISA-eljárásban (spike-olt) növényi mátrixokon (búzaliszt, zab) is sikeresen alkalmaztak.

ANTI-ZEA IgY-FEJLESZTÉSEK ÉS KAPCSOLÓDÓ ALKALMAZÁSOK

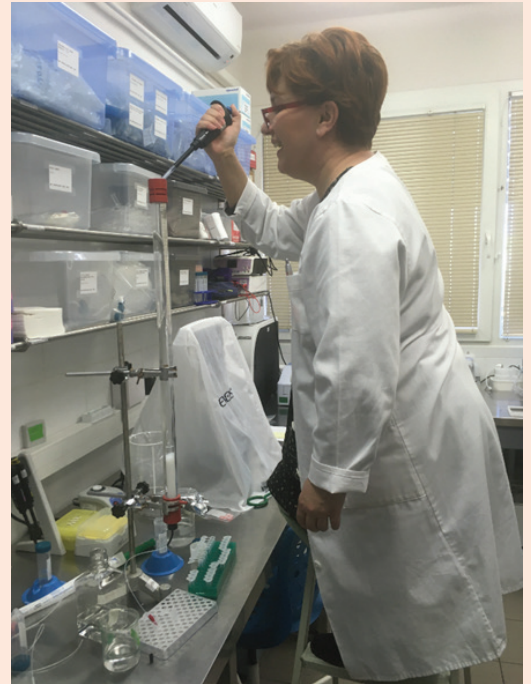
Habár a ZEA relevanciája vitathatatlan, ahogy azt fentebb részleteztük, kevés publikáció foglalkozik a ZEA detektáláshoz társuló IgY és az IgY-t kötő ágensként használó immunoassay fejlesztéssel [77–82]. Munkacsoportunk kutatásainak fókuszában a ZEA áll, azonban ezek az eredmények mostanáig még nem kerültek közlésre.

Egy munkacsoport felismerte [77], hogy a poliklonális IgY technológia előnyei, IgY alapú kötőágensek jól, valamint praktikusan alkalmazhatók a ZEA immunoassay alapú mérésére is. Csirkéket immunizáltak ZEA-BSA immunogénnel, majd az immunválasz során képződő, és a tojásba transzlokálódó IgY-t izolálták (polietilén-glikol precipitációval) majd alkalmazták egy általuk fejlesztett indirekt, kompetitív ELISA-eljárásban. Habár az eljárás érzékenységét gyengébbnek találták, mint egy monoklonális emlős anti-ZEA alkalmazással elérhető mérésben, mindenképpen alkalmasnak bizonyult az IgY előnyös sajátosságai figyelembevételével, ill. az eljárás további érzékenyítésének lehetőségével. Az assay növényi mátrixon (búza, kukorica) való alkalmazása is lehetséges.

Anti-ZEA IgY-fejlesztésekről, és az IgY-felhasználási lehetőségekről inkább különböző szabadalmakban olvashatunk (pl. CN103880952A patent). A szabadalmak részletezik többek között a ZEA-konjugátumok előállítását, tesztelését majd alkalmazását az oltásokban és a tesztrendszerekben, ill. az IgY tisztítását (3. ábra) és karakterizálását, ami alapja a tárgyat képező hasznosulásoknak.

3. ÁBRA. IgY-tisztítás oszlopkromatográfiával (saját ábra)

FIGURE 3. Column chromatography purification on IgY samples



A „KISMOLEKULA/HAPTÉN”-SPECIFIKUS (PL. ANTI-ZEA) IgY-FEJLESZTÉSEK ÁLTALÁNOS KIHÍVÁSAI

A szakirodalom és főleg a szerzők személyes tapasztalata szerint a kívánt/alkalmas minőségű IgY- (különösen a kismolekulák ellen fejlesztett) előállítás megkövetel számos (esetenként publikációban kevésbé hangsúlyozott vagy említett) szempont gondos mérlegelését, ill. járulékos technológiák alkalmazását. A fontosabbakat az következőkben összegezzük.

Az oltásokhoz szükséges immunogén elkészítése során hordozó fehérjét kell alkalmazni

Az oltásokhoz szükséges immunogén elkészítése során hordozó (kARRIER) fehérjét kell alkalmazni és a célmolekulához kapcsolni. A ZEA vagy más hasonló mikotoxin (vagy egyéb expozitor) a kis mérete (a ZEA 318.36 Da) miatt önmagában haptén, azaz immunválaszt nem indukál. A haptén-kARRIER konjugátummal (immunogén) való oltás során a keletkező tényleges hapténellenes antitestek szelekciónja és jellemzésére már komplex teszrendszer alkalmazása szükséges. A keletkezett ellenanyagok (mivel az IgY-fejlesztés során lényegében poliklonális ellenanyagkeverék keletkezik és kerül a tojássárgájából begyűjtésre, tisztításra) elméletileg a hapténrészt, vagy a hordozó részt (pl. BSA) vagy a hordozó-haptén kapcsolódási részt (pl. a konjugátumban esetlegesen alkalmazott linker) felismerők lehetnek. „Bazális” szinten az IgY-keverék tartalmazhat a fejlesztés szempontjából irreleváns, „ismeretlen” ellenanyagokat is (az oltott állatot az oltástól független behatások következtében), azonban az immunválasz felépülése során idővel remélhetőleg az immunizálás-kapcsolt keletkezett ellenanyagok kezdenek/fognak dominálni az oltásokat követően [77, 78, 80].

Célszerű megoldás, hogy a teszteléshez az immunogéntől eltérő haptén-kARRIER konjugátumot használunk (pl. KLH fehérjével), hiszen így kizárható (vagy csökkenthető) az immunogén-kARRIERével szembeni pozitívitas. A KLH egy kagyló- (*Megathura crenulata*) eredetű fehérje, eredete, szerkezete jelentősen eltér az emlős BSA-tól.

Fontos, hogy a teszteléshez használt konjugátumban a hordozó fehérjén a kapcsolódott haptén hasonló struktúrával rendelkezzen a konjugáció „eredményképp”, mint az immunogéne (hasonló konjugációs eljárás, azonos linkerek, azonos célzott haptén-molekularészlet választása), továbbá a konjugátumon levő haptén tartalmazzon szerkezetileg azonos részeket a natív targettel (az antitest ne

**Érdemes több,
különböző platformon
alapuló tesztrendszert
is alkalmazni**

csak a konjugált haptén felismerésére legyen alkalmas). A haptén karrierhez való kapcsolásának folyamata, a kémiai konjugálás módosít(hat)ja az elérhető majd felismerhető hapténepitókat, azaz a natív hapténtől már eltérő struktúrák (karrieren lévő linkelt haptén) felismerésére lesz „csak” képes a konjugátummal (jelen példában ZEA-BSA) fejlesztett ellenanyag (azaz az intakt ZEA-t már nem képes felismerni, nem lehet felhasználni egyszerűen a ráépülő fejlesztésekben). Ezért is szükséges a funkcionális tesztek során ún. gátlást is vizsgálni intakt target (ZEA) reagáltatással (amihez gyári, minőségében igazolt ZEA referenciaanyagot használunk). Már az antitestfejlesztés/tesztelés során szükséges igazolni, hogy a natív target (pl. ZEA) a mérendő mátrixból (pl. gabona és/vagy szövet vagy testfolyadék) detektálható, felismerhető legyen. Lehetőség szerint érdemes az ellenanyagot már a fejlesztési fázisban is releváns természetes (szennyezett) mintán és/vagy ún. ismert koncentrációban mesterségesen „szennyezett” ún. spike-olt mintán is tesztelni. Célszerű a tesztrendszer(ek) kiválasztása, tervezése során a későbbiekben felhasználni kívánt assay működésére is gondolni, a tesztrendszer hasonló legyen majd a mérési rendszerhez. Szerencsés, ha több, különböző platformon alapuló tesztrendszert is alkalmazhatunk (pl. ELISA- és immunoblot-alapú). A példa alapján egy Dot-blot technikában az elsődleges target (pl. a ZEA-KLH-konjugátum) nem immobilizált egy műanyag felszínre (egy nitrocellulóz membránban, a membrán pórusaiban helyezkedik el), a térszerkezete így kevésbé módosul, ami feltehetőleg jótékonyan hat az antitest hapténfelismerésére is.

Ideális immunizálás esetén mindkét konjugátum (pl. ZEA-BSA és ZEA-KLH) fel van használva immunizálási és tesztelési célra (külön-külön csoportokban), majd teljes kereszttesztelést kell megvalósítani (pl. ZEA-BSA állatok és minták tesztelése ZEA-KLH alapú tesztrendszereken). Az ellenanyagok tisztítása különösen fontos. A funkcionalitás (pl. a ZEA felismerés) fokozható az általános kinyerési technikán (pl. polietilén-glikol precipitáció, vízhígításos tisztítás, vagy anionikus poliszacharid precipitáció [72, 80]) felül alkalmazott targetspecifikus, ún. immunaffinitás-technikák [83] alkalmazásával és/vagy az IgY-keverék tényleges IgY-tartalmának a koncentráálásával (pl. tiofiles abszorpció alkalmazása), valamint az egyéb fehérje és lipid szennyeződések eltávolításával. Felhasználás előtt (akár a tesztelésben, akár a későbbi felhasználásban) csökkenthetjük a nem hapténspecifikus antitestek funkcionalitását az ún. telítéssel, vagy depletálással. A folyamat során telítjük a karrier fehérje részre specifikus ellenanyagok kötőhelyeit a nagy feleslegben hozzáadott karrier fehérjékkel (pl. BSA vagy KLH), így a fenti ellenanyagok már „semlegesítésre kerültek” a tényleges felhasználás előtt.

MEGVITATÁS

Az IgY-technológia alkalmazása ígéretes lehet a környezetterhelő anyagok, így mikotoxinok, pl. a ZEA expozícióinak, de a már akkumulálódott koncentrációk immunoassay-alapú kellően gyakorlatias méréséhez, kimutatásához. A baromfi IgY-kötő ágensként való alkalmazása hatékony perspektíva, ugyanakkor (különösen kismolekulás targetek, mint pl. a mikotoxinok esetén) számos kihívás elé is állíthatja a fejlesztőket.

IRODALOM

1. Rossati A (2017) Global warming and its health impact. *Int J Occup Environ Med* 8:7–20 <https://doi.org/10.15171/ijoem.2017.963>
2. Giudice LC (2021) Environmental impact on reproductive health and risk mitigating strategies. *Curr Opin Obstet Gynecol* 33:343–349 <https://doi.org/10.1097/GCO.0000000000000722>
3. Thrasher JD, Crawley S (2009) The biocontaminants and complexity of damp indoor spaces: more than what meets the eyes. *Toxicol Ind Health* 9–10:583–615 <https://doi.org/10.1177/0748233709348386>
4. Guo W, Pan B, Sakkiah S, Yavas G, Ge W, Zou W, Tong W, Hong H (2019) Persistent organic pollutants in food: Contamination sources, health effects and detection methods. *Int J Environ Res Public Health* 16:4361 <https://doi.org/10.3390/ijerph16224361>
5. Luschkova D, Ludwig A, Traidl-Hoffmann C (2021) Klimakrise und deren Auswirkungen auf die menschliche Gesundheit [Climate crisis and its impact on human health]. *Dtsch Med Wochenschr* 146:1636–1641 German <https://doi.org/10.1055/a-1560-7520>
6. Brennan KM, Oh SY, Yiannikouris A, Graugnard DE, Karrow N (2017) A. Differential Gene Expression Analysis of Bovine Macrophages after Exposure to the Penicillium Mycotoxins Citrinin and/or Ochratoxin A. *Toxins (Basel)* 9:366 <https://doi.org/10.3390/toxins9110366>
7. Marchese S, Polo A, Ariano A, Velotto S, Costantini S, Severino L (2018) Aflatoxin B1 and M1: Biological Properties and Their Involvement in Cancer Development. *Toxins (Basel)* 10:214 <https://doi.org/10.3390/toxins10060214>
8. Pleadin J, Frece J, Markov K (2019) Mycotoxins in food and feed. *Adv Food Nutr Res* 89:297–345 <https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2019.02.007>
9. Zingales V, Taroncher M, Martino PA, Ruiz MJ, Caloni F (2022) Climate Change and Effects on Molds and Mycotoxins. *Toxins (Basel)* 14:445 <https://doi.org/10.3390/toxins14070445>
10. Owino V O, Cornelius C, Loechl C U (2018) Elucidating Adverse Nutritional Implications of Exposure to Endocrine-Disrupting Chemicals and Mycotoxins through Stable Isotope Techniques. *Nutrients* 10:401 <https://doi.org/10.3390/nu10040401>
11. Karsauliya K, Yahavi C, Pandey A, Bhatia M, Sonker A K, Pandey H, Sharma M, Singh SP (2022) Co-occurrence of mycotoxins: A review on bioanalytical methods for simultaneous analysis in human biological samples, mixture toxicity and risk assessment strategies. *Toxicol* 218:25–39 <https://doi.org/10.1016/j.toxicol.2022.08.016>
12. Bhatnagar D, Yu J, Ehrlich KC (2002) Toxins of filamentous fungi. *Chem Immunol* 81:167–206 <https://doi.org/10.1159/000058867> PMID: 12102001
13. Habschied K, Kanižai Šarić G, Krstanović V, Mastanjević K (2021) Mycotoxins-Biomonitoring and Human Exposure. *Toxins (Basel)* 13:113 <https://doi.org/10.3390/toxins13020113>
14. Szőke Z, Babarcsi B, Mézes M, Lakatos I, Poór M, Fliszár-Nyúl E, Oldal M, Czéh Á, Bodó K, Nagyéri G, Ferenczi S (2022) Analysis and Comparison of Rapid Methods for the Determination of Ochratoxin A Levels in Organs and Body Fluids Obtained from Exposed Mice. *Toxins (Basel)* 14:634 <https://doi.org/10.3390/toxins14090634>
15. El-Shahawi MS, Hamza A, Bashammakh AS, Al-Saggaf WT (2010) An overview on the accumulation, distribution, transformations, toxicity and analytical methods for the monitoring of persistent organic pollutants. *Talanta* 80:1587–1597 <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2009.09.055>
16. Guerre P (2016) Worldwide Mycotoxins Exposure in Pig and Poultry Feed Formulations. *Toxins (Basel)* 8:350 <https://doi.org/10.3390/toxins8120350>
17. Kostić AŽ, Milinčić DD, Petrović TS, Krnjaja VS, Stanojević SP, Barać MB, Tešić ŽL, Pešić MB (2019) Mycotoxins and Mycotoxin Producing Fungi in Pollen: Review. *Toxins (Basel)* 11:64 <https://doi.org/10.3390/toxins11020064>
18. Rai A, Das M, Tripathi A (2020) Occurrence and toxicity of a fusarium mycotoxin, zearalenone. *Crit Rev Food Sci Nutr* 60:27107–2729 <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1655388>
19. Kierek-Jaszczuk D, Marquardt RR, Abramson D (1997) Use of a Heterologous Solid-Phase Antigen in an Indirect Competitive Antibody-Capture Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for T-2 Mycotoxin. *J Food Prot* 60:3217–327 <https://doi.org/10.4315/0362-028X-60.3.321>
20. Hafez E, Abd El-Aziz NM, Darwish AMG, Shehata MG, Ibrahim AA, Elframawy AM, Badr AN (2021) Validation of New ELISA Technique for Detection of Aflatoxin B1 Contamination in Food Products versus HPLC and VICAM. *Toxins (Basel)* 13:747 <https://doi.org/10.3390/toxins13110747>
21. Wu S, Liu L, Duan N, Li Q, Zhou Y, Wang Z (2018) Aptamer-Based Lateral Flow Test Strip for Rapid Detection of Zearalenone in Corn Samples. *J Agric Food Chem* 66:1949–1954 <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b05326>
22. Zhou J, Liu Z, Yang Q, Qian W, Chen Y, Qi Y, Wang A (2021) Multiple fluorescence immunoassay for the simultaneous detection of Zearalenone and Ochratoxin A. *Anal Biochem* 628:114288 <https://doi.org/10.1016/j.ab.2021.114288>
23. Caglayan MO, Sahin S, Üstündağ Z (2022) Detection Strategies of Zearalenone for Food Safety: A Review. *Crit Rev Anal Chem* 52:294–313 <https://doi.org/10.1080/10408347.2020.1797468>
24. Munhoz LS, Vargas GD, Fischer G, Lima M, de Esteves PA, Hübner S de O (2014) Avian IgY antibodies: Characteristics and applications in immunodiagnostic. *Ciência Rural* 44:153–160 <https://doi.org/10.1590/S0103-84782014000100025>
25. Karlsson M, Kollberg H, Larsson A (2004) Chicken IgY: Utilizing the evolutionary advantage. *World Poultry Sci J* 60:341–348 <https://doi.org/10.1079/WPS200422>
26. Hau J, Hendriksen CFM (2005) Refinement of polyclonal antibody production by combining oral immunization of chickens with harvest of antibodies from the egg yolk. *ILAR J* 46:294–299 <https://doi.org/10.1093/ilar.46.3.294>
27. Sim JS, Sunwoo HH, Lee EN, Ovoglobulin Y (2000) Natural food antimicrobial systems. <https://doi.org/10.1201/9781420039368>
28. Spillner E, Braren I, Greunke K, Seismann H, Blank S, du Plessis D (2012) Avian IgY antibodies and their recombinant equivalents in research, diagnostics and therapy. *Biologicals* 40:313–322 <https://doi.org/10.1016/j.biologics.2012.05.003>
29. Shade KT, Anthony R (2013) Antibody Glycosylation and Inflammation. *Antibodies* 2:392–414. <https://doi.org/10.3390/antib2030392>
30. Kovacs-Nolan J, Mine Y (2011) Using egg IgY antibodies for health, diagnostic and other industrial applications. In *Improving the Safety and Quality of Eggs and Egg Products*. Elsevier 346–373 <https://doi.org/10.1533/9780857093929.3.346>
31. Larsson A, Mellstedt H (1992) Chicken antibodies: A tool to avoid interference by human anti-mouse antibodies in ELISA after in vivo treatment with murine monoclonal antibodies. *Hybridoma* 11:33–39 <https://doi.org/10.1089/hyb.1992.11.33>
32. Carlander D, Ståhlberg J, Larsson A (1999) Chicken Antibodies: A Clinical Chemistry Perspective. *Upsala J Med Sci* 104:179–189 <https://doi.org/10.3109/03009739909178961>

33. Carlander D, Kollberg H, Larsson A (2002) Retention of specific yolk IgY in the human oral cavity. *BioDrugs: Clinical Immunotherapeutics, Biopharmaceuticals and Gene Therapy* 16:433–437 <https://doi.org/10.2165/00063030-200216060-00004>
34. Xiao Y, Gao X (2010) Use of IgY antibodies and semiconductor nanocrystal detection in cancer biomarker quantitation. *Biomark Med* 4:227–239 <https://doi.org/10.2217/bmm.10.7>
35. Sharma JM (1991) Overview of the avian immune system. *Vet Immunol Immunopathol* 1:13–7 [https://doi.org/10.1016/0165-2427\(91\)90004-v](https://doi.org/10.1016/0165-2427(91)90004-v)
36. Rehman MS, Rehman SU, Yousaf W, Hassan FU, Ahmad W, Liu Q, Pan H (2021) The Potential of Toll-Like Receptors to Modulate Avian Immune System: Exploring the Effects of Genetic Variants and Phytonutrients. *Front Genet* 12:671235 <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.671235>
37. Sayegh CE, Rao MA, Ratcliffe MJH (1999) Avian B cell development: Lessons from transgenic models. *Vet Immunol Immunopathol* 72:31–37 [https://doi.org/10.1016/S0165-2427\(99\)00114-2](https://doi.org/10.1016/S0165-2427(99)00114-2)
38. Tizard I (2013) The avian antibody response. *Semin Avian Exot Pet Med* 11:2–14 <https://doi.org/10.1053/saep.2002.28216>
39. Sharma JM (1997) The structure and function of the avian immune system. *Acta Vet Hung* 45:229–238 PMID: 9276985
40. Foppoli JM, Wakeland EK, Benedict AA (1978) Structural and genetic studies on chicken 7S immunoglobulin allotypes. IV. The presence of an unexpected chicken immunoglobulin heavy chain allotype: subclass or pseudoallele? *J Immunol* 120:812–817 PMID: 75924
41. Foppoli JM, Benedict AA (1979) An allotypic marker on chicken immunoglobulin light chains. *J Immunol* 122:1681–1685 PMID: 109514
42. Mansikka A (1992) Chicken IgA H chains. Implications concerning the evolution of H chain genes. *J Immunol* 149:855–861 PMID: 1634774
43. Faith RE, Clem LW (1973) Passive cutaneous anaphylaxis in the chicken. Biological fractionation of the mediating antibody population. *Immunology* 25:151–164 PMID: 4737364; PMID: PMC1422842
44. Leslie GA, Benedict AA (1970) Structural and antigenic relationships between avian immunoglobulins. III. Antigenic relationships of the immunoglobulins of the chicken, pheasant, and Japanese quail. *J Immunol* 105:1215–1222 <https://doi.org/10.4049/jimm.105.5.1215>
45. Warr GW, Magor KE, Higgins DA (1995) IgY: Clues to the origins of modern antibodies. *Immunol Today* 16:392–398 [https://doi.org/10.1016/0167-5699\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/0167-5699(95)80008-5)
46. Higgins DA (1975) Physical and chemical properties of fowl immunoglobulins. *Vet Bull* 45:139–154
47. Lanzarini NM, Bentes GA, Volotão EM, Pinto MA (2018) Use of chicken immunoglobulin Y in general virology. *J Immunoassay Immunochem* 39:235–248 <https://doi.org/10.1080/15321819.2018.1500375>
48. Pereira EPV, van Tilburg MF, Florean EOPT, Guedes MIF (2019) Egg yolk antibodies (IgY) and their applications in human and veterinary health: A review. *Int Immunopharmacol* 73:293–303 <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2019.05.015>
49. Fujibayashi T, Nakamura M, Tominaga A, Satoh N, Kawarai T, Narisawa N, Shinozuka O, Watanabe H, Yamazaki T, Senpuku H (2009). Effects of IgY against *Candida albicans* and *Candida* spp. Adherence and Biofilm Formation. *Jpn J Infect Dis* 62:337–342
50. Ibrahim ESM, Rahman AKMS, Isoda R, Umeda K, Van Sa N, Kodama Y (2008) In vitro and in vivo effectiveness of egg yolk antibody against *Candida albicans* (anti-CA IgY). *Vaccine* 26:2073–2080 <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.02.046>
51. Wang XZ, Fan B, Liu L G, Hu XY, Li RY, Wei Y, Wan Z, Deng XL (2008) In vitro inhibition of oral *Candida albicans* by chicken egg yolk antibody (IgY). *Mycopathologia* 165:381–387 <https://doi.org/10.1007/s11046-008-9097-0>
52. Etteradossi N, Toquin D, Abbassi H, Rivallan G, Cotte JP, Guittet M (1997) Passive protection of specific pathogen free chicks against infectious bursal disease by in-ovo injection of semi-purified egg-yolk antiviral immunoglobulins. *Zentralblatt Fur Veterinarmedizin. Reihe B J Vet Med Series B* 44:371–383 <https://doi.org/10.1111/j.1439-0450.1997.tb00988.x>
53. Yousif AA, Mohammad WA, Khodeir MH, Zeid AZAA, el-Sanousi AA, Saber MS, Reda IM (2006) Oral administration of hyperimmune IgY: An immunoeological approach to curbing acute infectious bursal disease virus infection. *Egypt J Immunol* 13:85–94 PMID: 18689274
54. Lee SH, Lillehoj HS, Park DW, Jang SI, Morales A, García D, Lucio E, Larios R, Victoria G, Marrufo D, Lillehoj EP (2009a) Induction of passive immunity in broiler chickens against *Eimeria acervulina* by hyperimmune egg yolk immunoglobulin Y. *Poultry Sci* 88:562–566 <https://doi.org/10.3382/ps.2008-00340>
55. Lee SH, Lillehoj HS, Park DW, Jang SI, Morales A, García D, Lucio E, Larios R, Victoria G, Marrufo D, Lillehoj EP (2009b) Protective effect of hyperimmune egg yolk IgY antibodies against *Eimeria tenella* and *Eimeria maxima* infections. *Vet Parasitol* 163:123–126 <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.04.020>
56. Van Nguyen S, Umeda K, Yokoyama H, Tohya Y, Kodama Y (2006) Passive protection of dogs against clinical disease due to Canine parvovirus-2 by specific antibody from chicken egg yolk. *Can J Vet Res* 70:62–64 PMID: 16548334; PMID: PMC1325096
57. Lu Y, Liu J, Jin L, Li X, Zhen Y, Xue H, You J, Xu Y (2008) Passive protection of shrimp against white spot syndrome virus (WSSV) using specific antibody from egg yolk of chickens immunized with inactivated virus or a WSSV-DNA vaccine. *Fish Shellfish Immunol* 25:604–610 <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2008.08.010>
58. Du Plessis DH, Van Wyngaardt W, Romito M, Du Plessis M, Maree S (1999) The use of chicken IgY in a double antibody sandwich ELISA for detecting African horsesickness virus. *Onderstepoort J Vet Res* 66:25–28 PMID: 10396758
59. Shin SJ, Lee SS, Manning EJB, Collins MT (2009) Production of and applications for a polyclonal IgY diagnostic reagent specific for *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis*. *J Microbiol (Seoul, Korea)* 47:600–609 <https://doi.org/10.1007/s12275-009-0052-7>
60. Juliarena M, Gutierrez S, Ceriani C (2007) Chicken antibodies: A useful tool for antigen capture ELISA to detect bovine leukaemia virus without cross-reaction with other mammalian antibodies. *Vet Res Commun* 31:43–51 <https://doi.org/10.1007/s11259-006-3422-1>
61. Veerasami M, Singanallur NB, Thirumeni N, Rana SK, Shanmugham R, Ponselaran S, Muthukrishnan M, Villuppanoor SA (2008) Serotyping of foot-and-mouth disease virus by antigen capture-ELISA using monoclonal antibodies and chicken IgY. *New Microbiol* 31:549–554
62. Stevenson R, Flett D, Raymond BT (1993) Enteric redmouth (ERM) and other enterobacterial infections of fish. *Bacterial diseases of fish* 80–99
63. Pauly D, Dorner M, Zhang X, Hlinak A, Dorner B, Schade R (2009). Monitoring of laying capacity, immunoglobulin Y concentration, and antibody titer development in chickens immunized with ricin and botulinum toxins over a two-year period. *Poultry Sci* 88:281–290. <https://doi.org/10.3382/ps.2008-00323>
64. de Almeida CMC, da Silva CL, Couto HP, Escocard R de CM, da Rocha DG, Sentinelli L de P, Kipnis TL, da Silva WD (2008) Development of process to produce polyvalent IgY antibodies anti-African snake venom. *Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology* 52:293–301 <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2008.05.022>

65. Meenatchisundaram S, Parameswari G, Michael A, Ramalingam S (2008) Studies on pharmacological effects of Russell's viper and Saw-scaled viper venom and its neutralization by chicken egg yolk antibodies. *Int Immunopharmacol* 8:1067–1073 <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2008.03.017>
66. Thalley BS, Carroll SB (1990) Rattlesnake and scorpion antivenoms from the egg yolks of immunized hens. *Bio/Technology (Nature Publishing Company)* 8:934–938 <https://doi.org/10.1038/nbt1090-934>
67. Li H, Javid B (2018) Antibodies and tuberculosis: Finally coming of age? *Nature Reviews. Immunology* 18:591–596 <https://doi.org/10.1038/s41577-018-0028-0>
68. Watson A, Li H, Ma B, Weiss R, Bendayan D, Abramovitz L, Mor M, Pinko E, Bar-Oz M, Wang Z, Du F, Lu Y, Rybniker J, Huang H, Barkan D, Xiang Y, Javid B, Freund NT (2020) Human Antibodies Targeting a Transporter Mediate Protection Against Tuberculosis [Preprint]. *Infectious Diseases (except HIV/AIDS)*. <https://doi.org/10.1101/2020.05.17.20101451>
69. Sunwoo HH, Wang WW, Sim JS (2006) Detection of *Escherichia coli* O157:H7 using chicken immunoglobulin Y. *Immunol Lett* 106:191–193 <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2006.05.005>
70. Kim SH, Park MK, Kim JY, Chuong PD, Lee YS, Yoon BS, Hwang KK, Lim YK (2005) Development of a sandwich ELISA for the detection of *Listeria* spp. Using specific flagella antibodies. *J Vet Sci* 6:41–46
71. Hochel I, Viochna D, Skvor J, Musil M (2004) Development of an indirect competitive ELISA for detection of *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* O:23 in foods. *Folia Microbiol* 49:579–586 <https://doi.org/10.1007/BF02931537>
72. De Meulenaer B, Huyghebaert A (2001) Isolation and Purification of Chicken Egg Yolk Immunoglobulins: A Review. *Food Agr Immunol* 13:275–288 <https://doi.org/10.1080/09540100120094537>
73. Kuo-Hui Hsu, Fun S Chu (1992) Production and characterization of antibodies against aflatoxin in laying hens. *Food Agr Immunol* 4:89–91 <https://doi.org/10.1080/09540109209354756>
74. Abhijith KS, Thakur MS (2012) Application of green synthesis of gold nanoparticles for sensitive detection of aflatoxin B1 based on metal enhanced fluorescence. *Anal Methods* 4:4250
75. Tran TV, Do BN, Nguyen TPT, Tran TT, Tran SC, Nguyen BV, Nguyen CV, Le HQ (2019) Development of an IgY-based lateral flow immunoassay for detection of fumonisin B in maize. *F1000 Res* 8:1042 <https://doi.org/10.12688/f1000research.19643.2>
76. Duan ZH, Lin ZS, Yao HR, Gao YH, Zhang K, Zhao SQ, Zhu ZY (2009) Preparation of artificial antigen and egg yolk-derived immunoglobulin (IgY) of citrinin for enzyme-linked immunosorbent assay. *Biomed Environ Sci* 237–243 [https://doi.org/10.1016/S0895-3988\(09\)60051-9](https://doi.org/10.1016/S0895-3988(09)60051-9)
77. Pichler H, Krška R, Szekacs A, Grasserbauer M (1998) An enzyme-immunoassay for the detection of the mycotoxin zearalenone by use of yolk antibodies. *Fresenius' journal of analytical chemistry* 362: 176–177
78. Schade R, Terzolo HR (2006) IgY-technology: application and trends. *Personal Communication*
79. Cipolla A, Cordeviola J, Terzolo H, Combessies G, Bardón J, Ramón N, Martínez A, Medina D, Morsella C, Malena R (2001) *Campylobacter fetus* diagnosis: direct immunofluorescence comparing chicken IgY and rabbit IgG conjugates. *ALTEX* 18:165–170 PMID: 11565050
80. Pauly D, Chacana PA, Calzado EG, Brembs B, Schade R (2011) IgY technology: extraction of chicken antibodies from egg yolk by polyethylene glycol (PEG) precipitation. *J Vis Exp* 51:3084 <https://doi.org/10.3791/3084>
81. Gémes B, Takács E, Gádoros P, Barócsi A, Kocsányi L, Lenk S, Csákányi A, Kautny S, Domján L, Szarvas G, Adányi N, Nabok A, Mörtl M, Székács A (2021) Development of an Immunofluorescence Assay Module for Determination of the Mycotoxin Zearalenone in Water. *Toxins (Basel)* 13:182 <https://doi.org/10.3390/toxins13030182>
82. Karachaliou CE, Koukouvinos G, Goustouridis D, Raptis I, Kakabakos S, Livaniou E, Petrou P (2022) Recent Developments in the Field of Optical Immunosensors Focusing on a Label-Free, White Light Reflectance Spectroscopy-Based Immunosensing Platform. *Sensors (Basel)* 22:5114 <https://doi.org/10.3390/s22145114>
83. Kuronen I, Kokko H, Mononen I, Parviainen M (1997) Hen egg yolk antibodies purified by antigen affinity under highly alkaline conditions provide new tools for diagnostics. Human intact parathyrin as a model antigen. *European Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry: Journal of the Forum of European Clinical Chemistry Societies* 35:435–440 <https://doi.org/10.1515/cclm.1997.35.6.435>

Közlésre érck.: 2022. nov. 28.