



# Aviäre vitelline Antikörper (Dotterantikörper) Ergebnisse zur Beeinflussung der Legeleistung von Hühnern nach Immunisierung mit Antigenen unterschiedlicher Art und Herkunft sowie zur Leistungsfähigkeit aviärer vitelliner Antikörper im Vergleich zu mammären Antikörpern

Rüdiger Schade, Wolf Bürger<sup>1</sup>, Torsten Schöneberg, Anne Schnie-  
ring, Christine Schwarzkopf<sup>2</sup>, Andreas Hlinak<sup>3</sup>, Hartmut Kobilke<sup>3</sup>

Institut für Pharmakologie und Toxikologie und <sup>1</sup>Institut für Mikrobiologie des Universitätsklinikums Charité der  
Humboldt-Universität, <sup>2</sup>Robert von Ostertag-Institut im Bundesgesundheitsamt Berlin, <sup>3</sup>Institut für Virologie und  
Geflügelkrankheiten der Veterinär-Medizinischen Fakultät der Freien Universität

## Zusammenfassung

*Der Einsatz aviärer vitelliner Antikörper („Dotterantikörper“) als Alternative zu mammären Antikörpern (Ak) im Sinne der drei R (refine, reduce, replace) stößt derzeit noch auf Vorbehalte, die größtenteils unbegründet sind. Die vorliegende Arbeit soll durch detaillierte Daten diese Zweifel ausräumen helfen. Ein wichtiges Prärequisit zur Anwendung vitelliner Ak ist eine effiziente Extraktionsmethode; in der Arbeit wird ein auf Ionenaustauscherbasis beruhendes Batchverfahren zur IgY-Extraktion vorgestellt, das bei guter Ausbeute und hoher Reinheit schnell und einfach durchzuführen ist. Darüberhinaus wird an zwei Beispielen (Serumproteine) demonstriert, daß mammäre Ak ohne Schwierigkeiten in bestehenden Testsystemen (ELISA) durch aviäre Ak substituierbar sind. Die Frage der Adjuvanswirkung wird anhand der Legeleistung der Hühner erörtert. Über Titerentwicklung nach Immunisierung von Hühnern wird Auskunft gegeben. In einer abschließenden Diskussion wird die Möglichkeit der Substitution mammärer Ak durch aviäre Ak bewertet.*

*Summary: Avian egg yolk antibodies. The egg laying capacity of hens following immunization with antigens of different kind and origin and the efficiency of egg yolk antibodies in comparison to mammalian antibodies.*

*Based on some differences in physico-chemical and biological activities between mammalian and avian antibodies, avian egg yolk antibodies are rather scarcely used in bio-medical research. These reservations are widespread but largely unjustified. In order to overcome such objections, detailed data concerning the practical use of egg yolk antibodies (IgY) are provided. An extraction method is presented based on ion exchange chromatography which yields 70–80 % of highly purified antibodies. This method is quick and simple to perform. Furthermore, the substitution of mammalian IgG by avian IgY is demonstrated in two different test systems for quantitation of serum proteins relevant for diagnostic and medical basic research, respectively. The influence of adjuvant on the egg laying capacity is discussed, and the development of antibody titers is demonstrated. It is concluded that convincing arguments for substituting mammalian antibodies by IgY are required.*

*Keywords: avian antibody (IgY), isolation, titer development, test validation*

## Einleitung

Sowohl polyklonale als auch monoklonale Antikörper (Ak) sind aus der modernen naturwissenschaftlich-medizinisch orientierten Forschung nicht mehr wegzudenken. Derartige Ak sind essentielle Bestandteile verschiedenster Testsysteme, die in unterschiedlichsten Bereichen Anwendung finden.

Die Ak werden in der Regel in Säugern (meist Kaninchen, aber auch kleinere Labornager bzw. größere Spezies wie Pferd, Schaf, Ziege) erzeugt. Dazu sind zwei Schritte erforderlich, die die Tiere mehr oder weniger stark belasten.

- Injektion des Antigens (Ag) als Grundvoraussetzung für die Erzeugung von Ak gegen dieses Ag im Rezipienten.
- Blutentnahme zur Gewinnung der Ak.

Beide Schritte verletzen die Integrität des betreffenden Tieres und erzeugen physischen und/oder emotionalen Streß.

Bedingt auch durch eine breite öffentliche Diskussion zu Fragen des Tierschutzes, besonders hinsichtlich eines ethisch vertretbaren Umganges mit Tieren in der bio-medizinischen Forschung, sucht man nach Alternativen, die die Belastung der Ak-„Produzenten“ wenigstens partiell reduzieren.

Spätestens seit der vielzitierten Arbeit von Klemperer im Jahre 1883 weiß man, daß im Dotter von Hühnereiern spezifische Ak offensichtlich in erstaunlich hohem Maße konzentriert sein müssen. Da damals die Immunologie noch in der Wiege lag, hat man für diese Erkenntnis während langer Zeit keine rechte Anwendung gesehen. Erst in den letzten Jahrzehnten, bedingt durch die stärkere Berücksichtigung tierschützerischer Belange, findet diese Methode zur Ak-Gewinnung stärkere Beachtung. Über verschiedene Aspekte dieses Verfahrens ist in dieser Zeitschrift und anderswo schon berichtet worden (Lösch et al., 1986, Gassmann und Hübscher, 1992, Schade et al., 1992). Unter anderem findet man mehrfach den Hinweis, daß Hühner im Vergleich zum Säuger weniger stark auf die Verwendung von Freund's komplettem Adjuvans (FCA) reagieren (Gassmann et al., 1990). Die Aussagen hierzu sind aber nicht einheitlich. Nach unseren Erfahrungen und bereits publizierten Ergebnissen von Lösch und Mitarbeitern (Sprick-Sanjose Messing, 1990) verursacht die i.m. Applikation von FCA auch bei Hühnern Gewebsreaktionen, was am Verhalten der Hühner nicht ohne weiteres erkennbar ist. Gegenwärtig sucht man nach Alternativen für das FCA, die bei gleicher Effizienz wenig oder keine Gewebsschädigungen verursachen. Ein Durchbruch ist bisher offensichtlich nicht erzielt worden, obwohl verschiedene neuartige Adjuvantien (relativ teuer) angeboten werden. Obwohl also durch die nichtinvasive Ak-Gewinnung bei Hühnern die physische und/oder emotionale Belastung tatsächlich reduziert ist, bleibt der Einsatz von FCA ein Problem.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich daher im Zusammenhang mit der Substituierung mammärer Ak durch aviäre Ak auch mit diesem Problem und stellt sich folgende Ziele:

1. Anhand der Legeleistung als einem Parameter, der Beeinträchtigungen des Wohlbefindens der

Tiere signalisieren kann, soll die diesbezügliche Wirkung von FCA untersucht werden. Gleichzeitig soll der Frage nachgegangen werden, ob auch die Art des Antigens die Legeleistung beeinflussen kann.

2. Erzeugung spezifischer Ak gegen das C-reactive protein (CRP, Mensch) bzw.  $\alpha_2$ -Akutphaseglobulin ( $\alpha_2$ -APG, Ratte).
3. Extraktion dieser Ak aus dem Eidotter mittels eines einfachen „Batch“-Verfahrens auf der Basis einer Mischbett-Chromatographie-Matrix (Bakerbond-ABx).
4. Erprobung der Ak in Testsystemen zur quantitativen Bestimmung der Serumproteine und Vergleich der Ergebnisse des „aviären“ mit denen des „mammären“ Systems.

Nachfolgend sollen kurz die beiden Akutphaseproteine vorgestellt, und es soll auf ihre Bedeutung für bestimmte Fragestellungen in der biologisch-medizinischen Forschung bzw. klinischen Diagnostik eingegangen werden.

Unter den vielfältigen Serumproteinen der Vertebraten, einschließlich des Menschen, gibt es eine Gruppe von Proteinen, die als Akutphaseproteine (APP) bezeichnet werden. Diese Proteine fallen dadurch auf, daß sie in der Folge von chirurgischen Eingriffen, Infektionen sowie Gewebsuntergängen mit Konzentrationsänderungen reagieren. Je nach Richtung der Änderung spricht man von positiven bzw. negativen Akutphaseproteinen.

Zu den positiven APP des Menschen zählt das „C-reactive protein“ (CRP), das, ausgehend von Basalwerten um 1 mg/l, bis auf Werte von über 100 mg/l ansteigen kann (Groth und Kaden, 1985).

Ein vergleichbares Protein ist das  $\alpha_2$ -APG der Ratte (Schade und Bürger, 1979). Ähnlich wie beim CRP des Menschen sind die Basalwerte mit Immunpräzipitationsmethoden kaum nachweisbar, unter den oben beschriebenen Bedingungen kann das  $\alpha_2$ -APG aber um mehr als das Hundertfache ansteigen (von 0,1 mg/

ml bis auf 20 mg/ml, Göhler et al., 1986). Beiden Proteinen werden Funktionen im Zusammenhang mit der unspezifischen Abwehr zugesprochen. Quantitative Bestimmungen dieser APP sind bedeutungsvoll z.B. für das Monitoring entzündlicher Prozesse.

Üblicherweise werden APP-Konzentrationsänderungen mittels Enzymimmunoassay erfaßt (es gibt aber auch ein Ak-unabhängiges Testsystem zur CRP-Bestimmung: Bürger et al., 1987). Grundlage der kommerziellen EIAs sind mammäre Ak unterschiedlicher Spezies. Es erhebt sich die Frage, ob mammäre Ak in solchen Testsystemen ohne Probleme durch aviäre Ak substituierbar sind. Anhand der zwei Beispiele aus dem Bereich der APP (CRP-Mensch,  $\alpha_2$ -APG-Ratte) soll diese Frage nachfolgend beantwortet werden.

## Versuchstiere, Material und Methoden

### Versuchstiere

Die zur Antikörpergewinnung benötigten Hühner wurden in der landwirtschaftlichen Lehr- und Versuchsanstalt der Humboldt-Universität gehalten. Die Tiere entstammten der Hybridlegelinie „Medes White“ (Deersheim, 13. Inzuchtlinie). Die Haltung erfolgte unter SPF-Bedingungen in 2 Etagen-Käfigen (L-112/1) mit den Abmessungen 2 × 2 m in Gruppen- (5 Tiere) bzw. Einzelhaltung (Trennung durch großmaschiges Gitter). Die tierphysiologischen Haltungparameter entsprachen den EG-Normen. Diese Art der Hühnerhaltung ist unter dem Aspekt des Tierschutzes nicht optimal, ließ sich aber unter Einhaltung des SPF-Status zur Zeit der Versuchsanstellung nicht anders realisieren.

Für die Immunisierung der Hühner wurde eine Emulsion aus Freund's komplettem bzw. inkomplettem Adjuvans (Difco Laboratories, USA) und Antigenlösung (je 0,5 ml  $\alpha_2$ -APG, CRP, jeweils 50 µg/Tier) verwendet. Die Immunisierung erfolgte in den *musculus pectoralis*, Boo-

sterungen wurden in monatlichem Abstand vorgenommen (i.m.). Spezifische Ak konnten unblutig aus dem Eidotter extrahiert werden. Die Legeleistung der immunisierten Tiere wurde gruppenweise bzw. einzeln registriert.

Die Immunisierungen mit *Ascaris suum*- bzw. bakteriellen/viralen Antigenen erfolgte in ähnlicher Weise wie beschrieben. Auf Darstellung der immunologischen Testsysteme für die in diesem Zusammenhang gewonnenen Ak wird hier verzichtet; es wird nur die Legeleistung dieser Hühner dokumentiert.

Das zum Vergleich der beiden  $\alpha_2$ -APG ELISA's verwendete Ratten Serum stammt aus früheren Versuchen, ebenso wie die mütterlichen Antikörper (vom Kaninchen).

#### Proteinpräparationen

##### IgY-Präparation

Bakerbond ABx (Baker Chemikalien, BRD) ist eine Mischbett-Chromatographie Matrix, die zur schnellen Einschnitt-Reinigung beliebiger Säuger-Immunglobuline sowohl aus Ak-haltigen Zellkulturüberständen als auch aus Ascites oder aus Serum-/Plasmaproben entwickelt wurde.

Abx hat die Eigenschaft, bevorzugt Immunglobuline zu binden und zu anderen Komponenten wie Albumin, Transferrin, Proteasen etc. nur geringe oder keine Affinität zu zeigen. Deshalb können ungewöhnlich große Substanzmengen auf ABx-Chromatographiesäulen aufgetragen oder im Batchverfahren gereinigt werden.

##### IgY-Präparation mittels

###### „Batch“-verfahren

Zur Herstellung eines Dotterrohextraktes wird Dotter nach sorgfältigem Waschen homogenisiert, bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren und nach ca. 24 h wieder aufgetaut (bessere Separierung des wasserunlöslichen vom wasserlöslichen Anteil). Nach Abzentrifugieren des wasserunlöslichen Anteils wird das Zentrifugat weiterverwendet. Bakerbond ABx wird in MES Puffer pH 5,6 äquilibriert (MES

= Morpholinethansulfonsäure). Die so behandelte Matrix wird mit dem Zentrifugat vermischt und ca. 10 Min. geschüttelt (siehe Diagramm, Abbildung 1). Nach Waschen des beladenen Materials mit MES-Puffer wird das gebundene IgY mit Elutionspuffer (0,2 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7) abgelöst. Der Vorgang wird wiederholt. Die Eluate können umgepuffert und konzentriert werden. Die so gewonnenen Extrakte werden als Lyophilisat oder in tiefgefrorenem Zustand aufbewahrt. Das ABx-Material muß vor dem nächsten Gebrauch wieder in MES-Puffer äquilibriert werden.

##### IgY-Präparation mittels Säulenchromatographie

Bei diesem Verfahren wurde IgY säulenchromatographisch von anderen Proteinen getrennt. Wir verwendeten hierzu eine semipräparative HPLC-Säule von Baker (Baker 7272-00 wide-pore ABx,  $15\ \mu\text{m}$ ,  $110 \times 250\ \text{mm}$ ).

##### CRP-Präparation

C-reaktives Protein wurde aus Human Serum (CRP-Gehalt  $> 60\text{mg/l}$ ) mittels Affinitätschromatographie (Colaminphosphat-gebundene Sepharose 4B), wie bereits beschrieben.

### Ak-Extraktion aus dem Dotter von Hühnereiern

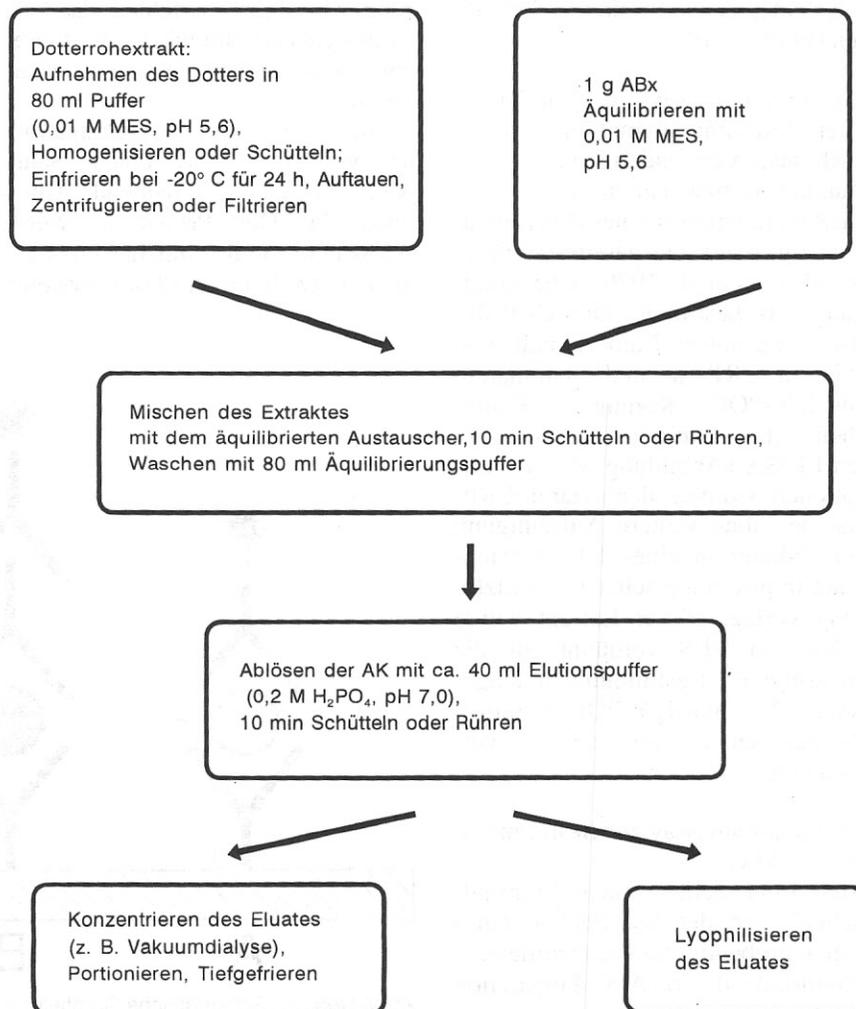


Abbildung 1: Extraktion der IgY-Antikörper aus dem Eidotter mittels Batchverfahren auf der Basis eines Mischbett-Ionenaustauschers. Diagramm der Präparationsschritte.

ben, mit einigen Modifikationen isoliert (Pontet et al., 1978).

**$\alpha_2$ -APG-Präparation**

Die  $\alpha_2$ -APG-Präparation erfolgte in Anlehnung an eine Vorschrift von Gauthier und Mouray (1976). Das für die Präparation des  $\alpha_2$ -APG notwendige Serum lag als tiefgefrorenes Material aus früheren Versuchen vor.

**Immunologische Assays**

**Präzipitationstechniken (Immunelektrophorese, Immundiffusion)**

Die Analyse sowohl der CRP- als auch der  $\alpha_2$ -APG-Präparation erfolgte mittels Immunelektrophorese sowie Doppeldiffusion nach Ouchterlony entsprechend üblichen Verfahren (Friemel, 1991).

Enzymimmunoassays zur quantitativen Bestimmung von humanem CRP unter Verwendung von Kaninchen- bzw. Huhn-Ak CRP wurde mittels eines Zweiseitenbindungsassay wie bereits beschrieben (Bürger et al., 1976, siehe Abbildung 2a) bestimmt. Die CRP-Bestimmung unter Einbeziehung von aviärem CRP-Ak und mammärem anti-IgY-POD Konjugat (Kaninchen) erfolgte mittels eines indirekten ELISA (Abbildung 2b). Modifikationen betrafen den aviären CRP-Ak, der ohne weitere Aufreinigung der Eidotter in einer 1:10 Verdünnung in physiologischer Kochsalzlösung vorlag. Dieser Extrakt wurde 1:200 mit PBS verdünnt für die quantitativen Bestimmungen eingesetzt. Das anti-IgY-POD-Konjugat (Sigma) setzten wir 1:20.000 verdünnt ein.

**Enzymimmunoassay zur Bestimmung von  $\alpha_2$ -APG**

Auf Grund seiner hohen Empfindlichkeit und der Möglichkeit eines hohen Probendurchsatzes wurde zum Monitoring der  $\alpha_2$ -APG-Präparation ein Zwei-Seiten-Bindungsassay (siehe Abbildung 2b) ähnlich wie für CRP aufgebaut (Porstmann et al., 1988).

Enzymimmunoassay zur quantitativen  $\alpha_2$ -APG-Bestimmung unter Verwendung von Kaninchen- bzw. Huhn-Ak

Das Testsystem wurde für jeden der beiden Ak getrennt in bezug auf die Beschichtungsantigenkonzentration sowie Primär- und peroxidasemarkierten Sekundär-Ak-Konzentration optimiert. Auf die Darstellung der Optimierungsuntersuchungen wird in diesem Rahmen verzichtet.

Zur  $\alpha_2$ -APG-Bestimmung wurde ein kompetitiver ELISA (CIEIA) aufgebaut, in dem fixes, an der Mikrotiterplatte gebundenes  $\alpha_2$ -APG mit löslichem  $\alpha_2$ -APG um die Bindungsstellen von zugefügtem mammärem bzw. aviärem Ak konkurrieren (siehe Abbildung 2c). Auf ausführliche Darstellung der Testdurchführung wird hier verzichtet, da diese weitestgehend üblichen Verfahren entspricht (siehe Porstmann et al. 1988).

Zur Analyse der IgY-Präparationen verwendeten wir einen „Sandwich“-ELISA entsprechend Abbildung 2a. Der Primär-Ak wurde selbst hergestellt (Anti-IgY), als Sekundär-Ak diente ein kommerzieller

POD-markierter Anti-IgY Ak. Die Durchführung des ELISA erfolgte ähnlich wie oben beschrieben.

**Ergebnisse**

**Legeleistung**

Wie aus den Abbildungen 3a–c hervorgeht, verhält sich die Legeleistung in Abhängigkeit von der Zeit sehr unterschiedlich.

Verschiedene Einflüsse sind erkennbar:

1. der Einfluß der Immunisierung,
2. der Einfluß durch das verwendete Antigen und
3. Einflüsse, die auf 1. und 2. nicht unmittelbar zurückzuführen sind.

In Abbildung 3a sind die Legeleistungen von einzeln gehaltenen Hühnern dokumentiert, die mit *Ascaris suum*-Extrakten (sekretorisch-exkretorische bzw. somatische Antigene) immunisiert wurden. Es ist deutlich zu erkennen, daß jeweils nach Immunisierung die Legeleistung beeinträchtigt wird, wobei allerdings die Tiere sehr individuell schwache bis starke Reaktionen zeigen. Huhn 1

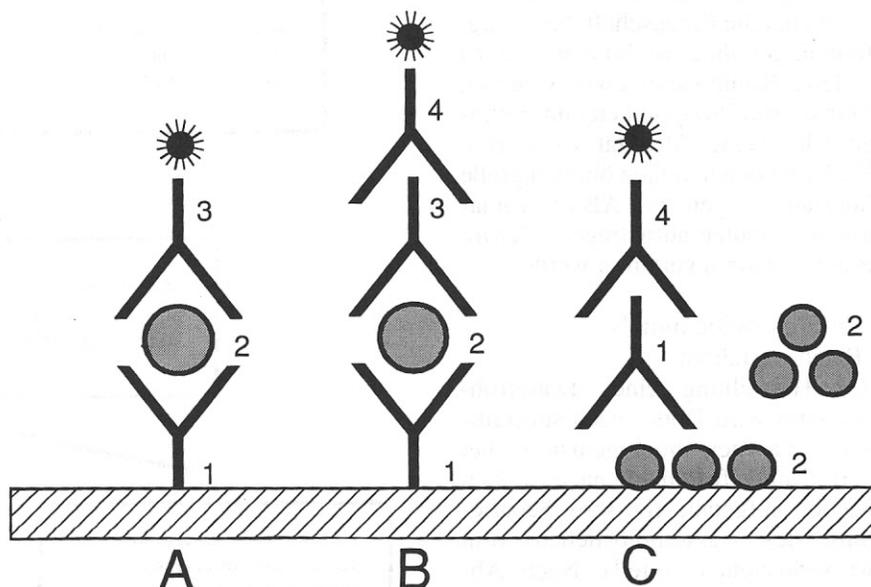
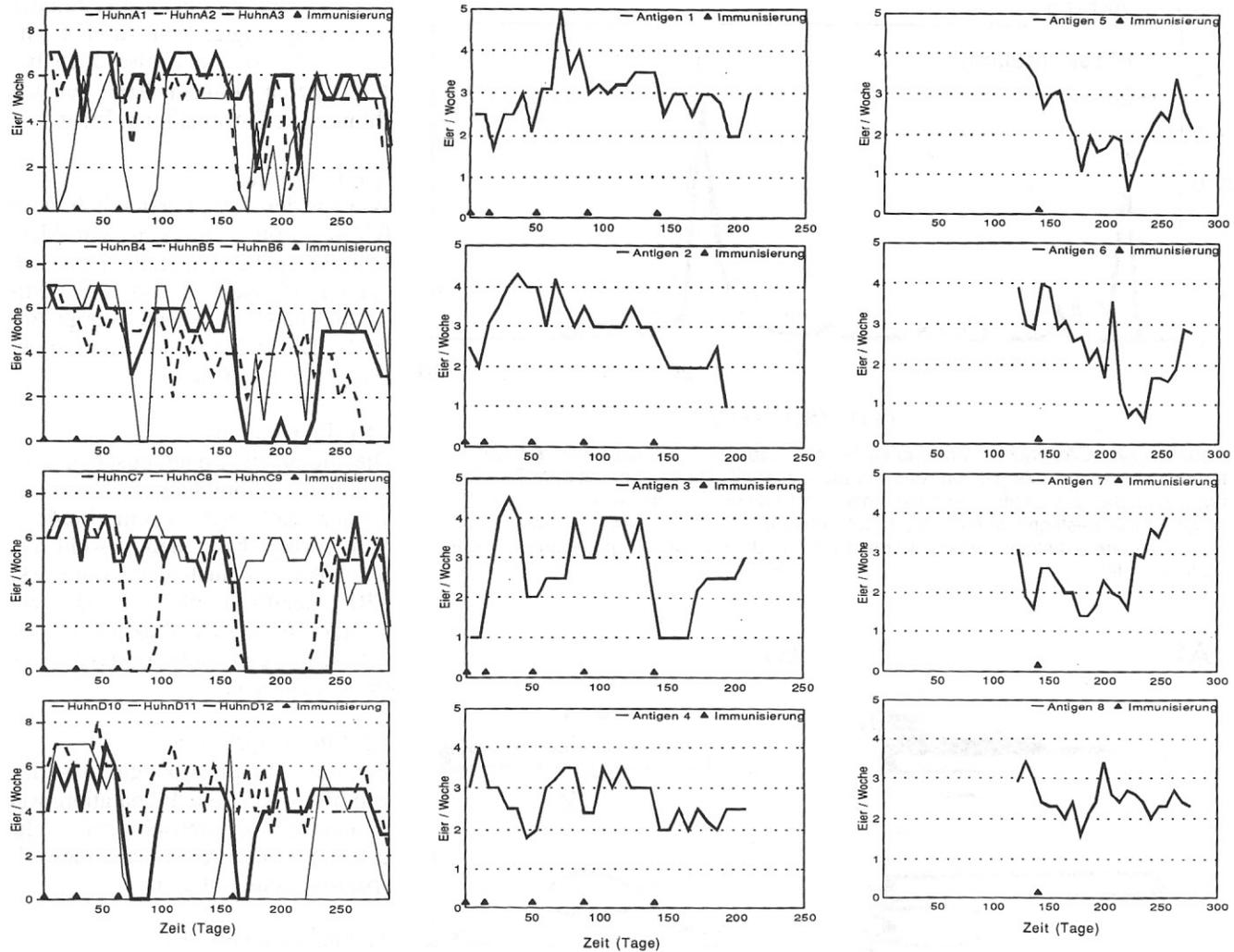


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Aufbaus der für die Proteinbestimmungen verwendeten Enzymimmunoassays. 1 = antigenspezifischer Ak, 2 = Antigen, 3 = antigenspezifischer Ak (von anderer Tierspezies), 4 = speziesspezifischer Ak, die Markierung am Ak bedeutet Markierung mit POD.



**Abbildung 3:** Legeleistung von mit verschiedenen Antigenen immunisierten Hühnern, die einzeln oder in Gruppen gehalten wurden.  
 3a = Legeleistung von jeweils 5 Tieren nach Immunisierung mit *Ascaris suum* Antigenen, Huhn 1–3 = somatisches Antigen (1,8 mg/Tier), Huhn 4–6 = somatisches Ag (0,18 mg/Tier), Huhn 7–9 = exkretorisch/sekretorisches Ag (0,08 mg/Tier), Huhn 10–12 = exkretorisch/sekretorisches Ag (0,2 mg/Tier),  
 3b = Legeleistung von jeweils 5 Tieren nach Immunisierung mit viralen bzw. bakteriellen Antigenen, Antigen 1 = bovines Leukosevirus (BLV, Vollvirus, gereinigt),

Antigen 2 = BLV (gp 51), Antigen 3 = *Bordetella bronchiseptica* (inaktive Vollkeimsuspension), Antigen 4 = *Bordetella bronchiseptica* (Harnstoffextrakt),  
 3c = Legeleistung von jeweils 5 Tieren nach Immunisierung mit Proteinen bzw. Peptiden, Antigen 5 = Cholecystokinin-BSA Konjugat, Antigen 6 = Tyrosyl-Cholecystokinin-BSA Konjugat, Antigen 7 = C-reaktives Protein, Antigen 8 = Kaninchen-IgG. Die Pfeile markieren die Immunisierung bzw. die Boosterungen. Das zeitliche Immunisierungsschema in Abbildung 3a ist unterschiedlich im Vergleich zu 3b und 3c.

z.B. reagierte stark auf die Erstimmunisierung, relativ schwach auf die 1. Boosterung und stark auf die 2. und 3. Boosterung, während Huhn 3 insgesamt wenig Reaktion zeigte bzw. eine rückläufige Legeleistung auch unabhängig vom Boosterungsdatum zu verzeichnen war. Eine ähnliche Variabilität ist auch für die anderen Hühner zu beobachten. Generell fällt auf, daß die stärksten

Einbußen etwa zwischen dem 170. und 220. Tag zu beobachten waren. Vergleicht man hierzu die Legeleistung der in Gruppen gehaltenen Hühner, die mit viralen bzw. bakteriellen Antigenen immunisiert wurden, ergibt sich ein ähnliches Bild (Abbildung 3b). Für die Gruppe 4 ist der Einfluß der Immunisierung deutlich demonstrierbar. Die anderen Gruppen reagieren im Durchschnitt

auf die Immunisierung sehr unterschiedlich mit reduzierter, unveränderter oder sogar erhöhter Legeleistung (Gruppe 2). Generell ist zu konstatieren, daß die Profile der Legeleistung sich erheblich unterscheiden und nur bedingt gewisse Gemeinsamkeiten zu erkennen sind. So z.B. scheint die Legeleistung durch die eingesetzten viralen Antigene relativ schwächer beeinflusst zu wer-

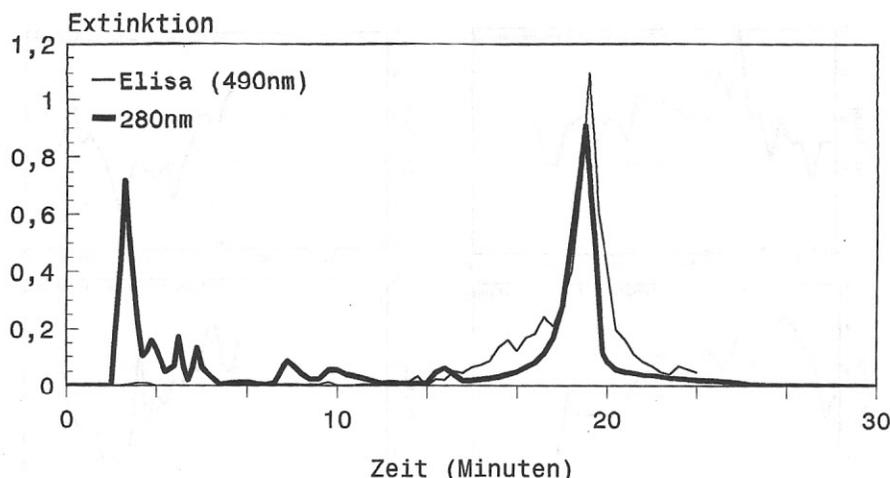


Abbildung 4: Säulenchromatographische IgY-Präparation auf der Basis des ABX-Ionenaustauschers. Verglichen wird das Elutionsprofil (Absorption) mit dem Extinktionsprofil, das sich ergibt, wenn die einzelnen Fraktionen mittels eines IgY-spezifischen ELISA bestimmt werden. Es ergibt sich eine sehr gute Übereinstimmung zwischen dem Extinktionsmaximum des ELISA und dem zweiten größeren Peak des Elutionsprofils.

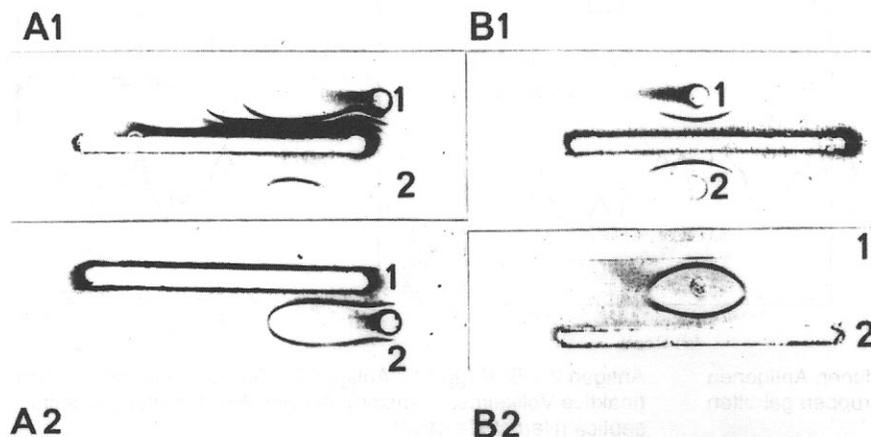


Abbildung 5: Spezifitätsuntersuchungen mittels Immunelektrophorese  
 A 1 – Rinne = polyspezifischer Anti-Rattenserum Ak, Loch 1 = Rattenserum, Loch 2 = α<sub>2</sub>-APG-Präparation,  
 A2 – Loch = α<sub>2</sub>-APG-Präparation, Rinne 1 = Kaninchen α<sub>2</sub>-APG-Ak, Rinne 2 = Huhn α<sub>2</sub>-APG-Ak.  
 B1 – Rinne = monospezifischer Anti-human CRP-Ak, Loch 1 = Serumstandard, Loch 2 = CRP-Präparation,  
 B2 – Loch = CRP-Präparation, Rinne 1 = Kaninchen CRP-Ak, Rinne 2 = Huhn CRP-Ak.

den, als durch die bakteriellen Antigene.

Die Legeleistung nach Immunisierung mit Cholecystinin-Octapeptid (CCK-8, Neuropeptid) bzw. Serumproteinen wurde erst kurz vor der 3. Boosterung registriert. Dennoch wird deutlich, daß auch diese Gruppen jeweils unterschiedlich auf die Immunisierung reagieren. Es ist wei-

ter deutlich erkennbar, daß das Profil der Legeleistung der Gruppen, die mit CCK-8 immunisiert wurden (Gr. 5/6) sehr ähnlich ist, sich aber andererseits von demjenigen der mit Serumproteinen immunisierten Gruppen (7/8) wesentlich unterscheidet. Unabhängig von der Art des verwendeten Antigens ergeben sich gewisse Gemeinsamkeiten insofern, als um

den 200. Tag ein mehr oder minder stark ausgeprägter Peak zu beobachten ist, der sich teilweise auch bei den anderen Gruppen bzw. bei den Hühnern in Einzelhaltung findet.

#### IgY-Präparation

Wie aus der Abb. 4 ersichtlich, wird IgY fast vollständig von dem ABX-Material gebunden und läßt sich durch Pufferwechsel als reine Fraktion ablösen. Die Ausbeute beträgt 70–80 %. Die Reinheit des Endproduktes beträgt ca. 90 %.

#### CRP-Präparation

Die immunoelektrophoretischen Darstellungen (Abbildung 5) lassen erkennen, daß CRP als reine Präparation vorlag, bzw. daß sowohl der mammäre als auch der aviäre Ak-CRP spezifisch erkennen. Die zusammenfließenden Präzipitate verdeutlichen, daß beide Ak das gleiche Protein anzeigen.

#### α<sub>2</sub>-APG-Präparation

Für diese Präparation gilt dasselbe wie für CRP. Die Präparation war immunoelektrophoretisch rein, die entsprechenden Ak erkennen jeweils spezifisch das Antigen.

#### Titerentwicklung CRP

In Abbildung 6 ist die Titerentwicklung des CRP-Ak dargestellt.

#### Quantitative CRP- bzw. α<sub>2</sub>-APG-Bestimmung

Mit dem direkten bzw. indirekten Zweiseiten-Bindungsassay konnte CRP in einem Bereich von < 1–ca. 100 mg/l erfaßt werden. Die Korrelation der quantitativen Untersuchung des CRP aus Patientenproben (n = 64), die parallel mittels mammärem bzw. aviärem CRP-Ak bestimmt worden waren, betrug  $r = 0,967$  bei einer Regressionsgeraden  $y = 0,952x + 2,055$  (Abbildung 7a). Die gefundenen Werte zeigen, daß der Eidotterantikörpertest in gleicher Weise für die Bestimmung des CRP im ELISA eingesetzt werden kann.

Die quantitative Bestimmung von Ratten α<sub>2</sub>-APG ergab, ähnlich wie für CRP, für beide Antikörper einen

nahezu identischen, linearen Detektionsbereich von 9,5–600 µg/ml (13,1–827 nmol/ml, Abbildung 7b). Bei einer normalen Serumkonzentration von 0,05–0,2 mg/ml können mit beiden Testsystemen Basalwerte sicher erfaßt werden. Es ergaben sich Intraassayvariabilitäten (n = 15) von 8,25 % (Kaninchenantikörper) bzw. 3,91 % (Huhnantikörper). Die Abbildung 7b zeigt eine sehr gute Korrelation der ermittelten  $\alpha_2$ -APG-Konzentrationen in beiden Testsystemen ( $r = 0,991$  bei  $n = 36$ ).

### Diskussion

Da auf die IgY-Extraktion mittels ABx-Ionenaustauscher schon an anderer Stelle eingegangen wurde, soll hier auf eine ausführliche Wertung verzichtet werden. Resümierend bleibt festzuhalten, daß unter den verschiedenen Möglichkeiten zur IgY-Extraktion das beschriebene Verfahren nur wenige Präparations-schritte und damit wenig Zeit benötigt. Es ist an unterschiedlichste Laborbedingungen adaptierbar (Batchverfahren bis Säulenchromatographie) und gewährleistet auch unter einfachsten Bedingungen eine gute Ausbeute (70–80 %) bei hoher Reinheit des Produktes (80–90 %). Darüberhinaus ist die Matrix mehrfach einsetzbar. Im Unterschied zu anderen Verfahren (Bade und Stegemann, 1984) kommt die Methode ohne Lösungsmittel aus und bedient so auch Aspekte des Umweltschutzes.

Titerentwicklungen sind für aviäre Ak von verschiedenen Autoren beschrieben worden (z.B. Bar-Joseph und Malkinson, 1980, Gottstein und Hemmler, 1985, Lösch et al., 1986, Hiepe et al., 1987, Kühlmann et al., 1988, Grajewskaja et al., 1988). Es scheint keine grundsätzlichen Unterschiede zu Titerentwicklungen beim Säuger zu geben. Dies deckt sich mit unseren bisherigen Erfahrungen. Unsere Ergebnisse belegen, daß über einen Zeitraum von ca. zwei Monaten der Ak-Titer steigt und dann im wesentlichen auf einem Plateau verbleibt, das durch weitere Immunisie-

## Entwicklung des CRP-Antikörper Titers

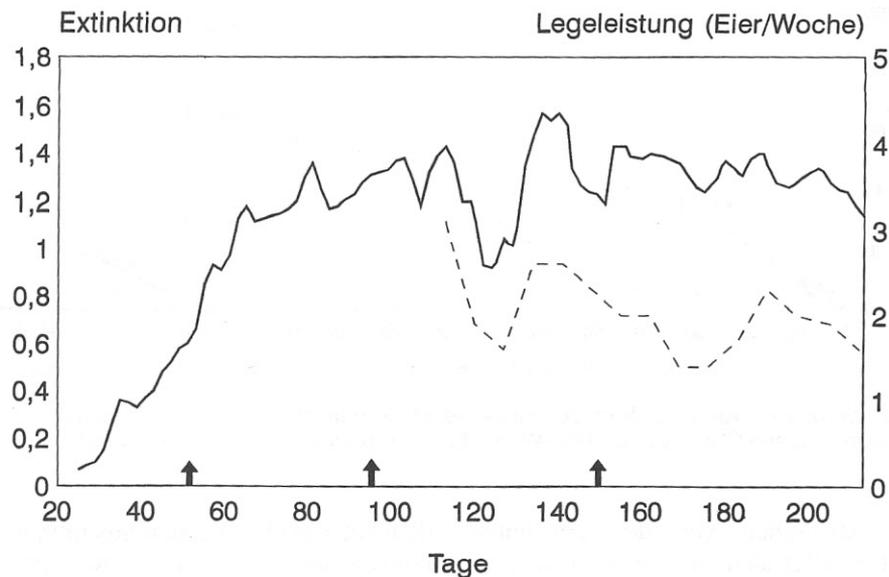


Abbildung 6: Titerentwicklung des aviären CRP-Antikörpers. Die Pfeile markieren die Zeitpunkte der Immunisierung bzw. der Boosterungen. Gleichzeitig ist für einen bestimmten Zeitraum die Legeleistung der betreffenden Gruppe angegeben.

runge nicht mehr entscheidend beeinflusst wird. Es wurden, abhängig vom verwendeten Antigen, Titer von bis zu 1:100.000 erreicht. Allerdings beeinflusst die Immunisierungsart die Titerentwicklung nicht unerheblich (Staak und Schwarzkopf, persönliche Mitteilung), die in der Literatur hierzu dokumentierten Befunde sind widersprüchlich. Bezüglich von Serumproteinen haben wir zu Säugern vergleichbare Ak-Titer erzielt. Interessant in diesem Zusammenhang ist, daß Titerentwicklung und Legeleistung partiell kongruent sind (Abbildung 6).

Die Arbeit hatte sich eingangs das Ziel gestellt, zu untersuchen, ob die Wirkung des FCA in irgendeiner Weise an der Legeleistung erkennbar ist. Nach Analyse der vorliegenden Daten läßt sich diese Frage nicht mit ja oder nein klar beantworten. Es ist vielmehr so, daß das Profil der Legeleistung von verschiedenen Einflußgrößen bestimmt zu werden scheint, was auch zu erwarten wäre. Wir erkennen deutlich, daß Extrakte von *Ascaris suum* offensichtlich eine eigene Wirkung haben, die zu wochen-

langen Ausfällen führen kann. Es wäre nicht unwahrscheinlich, daß in diesen Extrakten Stoffe enthalten sind, die diese Effekte bewirken. Im Unterschied hierzu scheinen die Serumproteine CRP und  $\alpha_2$ -APG kaum eine eigene Wirkung zu haben. Es ist weiterhin erkennbar, daß die individuelle Variabilität der Hühner außerordentlich groß ist, so daß zwar zweifelsfrei ein Einfluß der Antigenapplikation nachzuweisen ist, aber schwer differenziert werden kann zwischen dem Einfluß der Manipulation selbst und dem Einfluß von FCA. Die Beobachtung, daß die Tiere hinsichtlich ihrer Legeleistung gelegentlich auf die Anwendung von FCA nicht oder nur schwach reagieren, unterstreicht dieses Problem. Zur Klärung dieser Fragen wären Kontrollgruppen erforderlich, die ohne Adjuvans immunisiert werden bzw. nur eine FCA-Injektion erhalten. Im Rahmen des von uns bearbeiteten Projektes war die Mitführung dieser Kontrollen nicht möglich. Untersuchungen zu dieser Problematik laufen gegenwärtig am Robert von Ostertag-Institut.

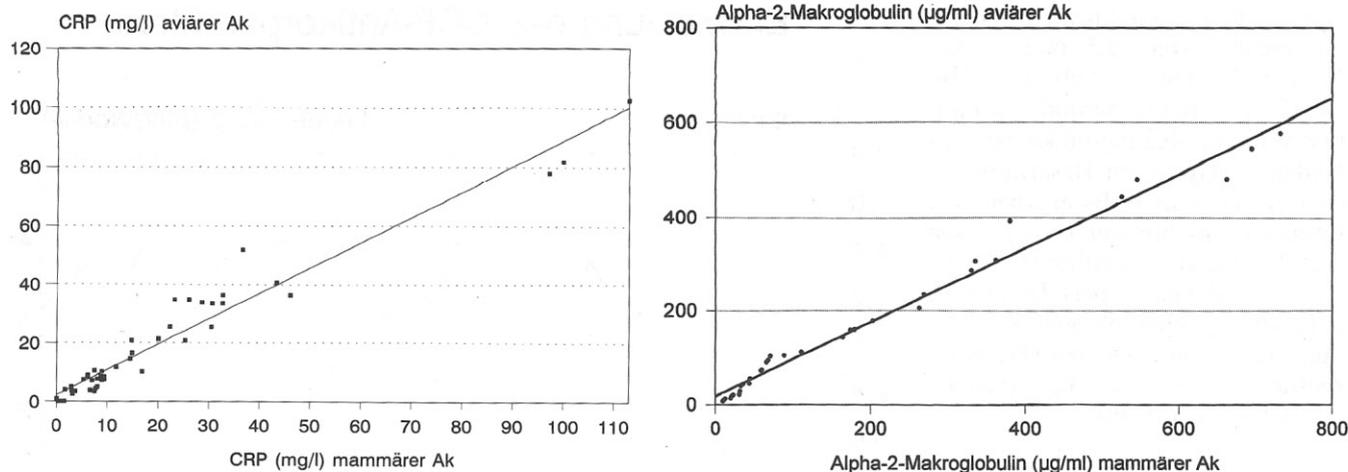


Abbildung 7: Kreuzvergleich der mit aviärem bzw. mammärem Ak ermittelten CRP- bzw.  $\alpha_2$ -APG-Werte. Für CRP gilt  $y =$

$0,952x + 2,055$  mit  $r = 0,967$ , für  $\alpha_2$ -APG gilt  $y = 0,97x + 17,91$  mit  $r = 0,991$ .

Abgesehen von den erwähnten Einflußgrößen scheinen auch „systemimmanente“ Effekte eine Rolle zu spielen, da sonst kaum die, unabhängig vom eingesetzten Antigen, gefundenen Gemeinsamkeiten in den jeweiligen Legeprofilen zu erklären wären.

Obwohl die in Abbildung 3 dokumentierten Beobachtungen aufgrund fehlender Kontrollen mit Zurückhaltung bewertet werden müssen, erhebt sich dennoch die Frage, ob die Beurteilung der Legeleistung ein geeigneter Parameter zur Abschätzung der Belastung ist, der ein Huhn im Zusammenhang mit der Ak-Erzeugung unterworfen wird. Aus der Sicht des Tierschutzes scheint die Suche nach Adjuvantien, die bei gleicher Effizienz nicht die Gewebseffekte des FCA aufweisen, sinnvoller als die Suche nach Parametern, die eine Bewertung des Wohlbefindens der Tiere erlauben. Da das FCA sich bisher als das für die Erzeugung hoher Titer am besten geeignete Adjuvans erwiesen hat (Erhard et al., 1991), wird dieses Problem nicht einfach zu lösen sein. Alternative Adjuvantien sind bereits im Angebot, haben allerdings den Nachteil, daß sie relativ teuer sind bei bestenfalls gleicher Wirksamkeit im Vergleich zu FCA. Nach dem Stand der Dinge scheint die Suche nach dem „idealen“ Adjuvans sinnvoll. Mit

dem wachsenden Verständnis immunologischer Zusammenhänge ergeben sich möglicherweise erfolgversprechende Strategien zur Adjuvantentwicklung.

Wenn der Einsatz aviärer vitelliner Ak als Alternativmethode empfohlen werden soll, muß billigerweise nachgewiesen sein, daß aviäre Ak mammäre Ak ohne Einschränkung auch tatsächlich ersetzen können. In der Literatur finden sich zunehmend Hinweise auf die erfolgreiche Anwendung aviärer Ak, jedoch fehlen unseres Wissens direkte Vergleiche zwischen aviären und mammären Ak in einem System. Da der EIA das für aviäre Ak am häufigsten verwendete Nachweissystem ist (Schade et al., 1991), haben wir zum Vergleich der beiden Ak Typen diesen Test ebenfalls gewählt, darüberhinaus werden beide Tests routinemäßig zur Proteinbestimmung eingesetzt. Die Erzeugung der Ak gegen CRP und  $\alpha_2$ -APG bereitete keinerlei Schwierigkeiten, was sich mit den Erfahrungen anderer Gruppen deckt. Gleiches gilt für den Einsatz dieser Ak in den beschriebenen Testsystemen. Der Vergleich beider Ak bezüglich der quantitativen Proteinbestimmung ergab für beide Proteine eine sehr gute Korrelation. Somit lassen sich für die ausgewählten Beispiele mammäre Ak ohne Einschränkung durch aviäre Ak substituieren. Damit wäre zumin-

dest für den großen Bereich der Serumproteine der Einsatz aviärer Ak in größerem Umfang denkbar. Auf die Vorteile bezüglich der Ausbeute an derartigen Ak ist schon mehrfach verwiesen worden (Lösch et al., 1986, Gassmann et al., 1990, Schade et al., 1992, Gassmann und Hübscher, 1992). Auch die Sekundär-Ak, die zur Komplettierung der Testsysteme benötigt werden, sind über verschiedene Anbieter erhältlich, so daß von dieser Seite kein Grund besteht, aviäre Ak nicht einzusetzen.

Zusammenfassend läßt sich festhalten:

Anhand der Legeleistung lassen sich verschiedene Einflüsse ablesen, von denen einer die Immunisierung selbst ist. Der Einfluß des Adjuvans ist nicht klar abtrennbar. Das Profil der Legeleistung wird nicht unwesentlich von der Art des eingesetzten Antigens mitbestimmt. Letztlich ist vorstellbar und wahrscheinlich, daß die Legeleistung als ein möglicher Parameter des Wohlbefindens des Tieres multifaktoriell determiniert ist und zur Beurteilung der Adjuvantwirkung nur bedingt geeignet scheint.

Zur Extraktion von Ak aus dem Eidotter existieren verschiedenste Methoden. In dieser Arbeit wird ein Verfahren auf Ionenaustauscherbasis beschrieben, das sehr einfach zu

handhaben ist, in sehr kurzer Zeit ein Ergebnis liefert und dabei eine gute Ausbeute bei hoher Reinheit gewährleistet.

Die Gewinnung aviärer Ak gegen Serumproteine bereitet keine Schwierigkeiten. Derart immunisierte Hühner reagieren mit guten bis sehr guten Titern ähnlich wie Säuger.

Die gegen CRP (Mensch) und  $\alpha_2$ -APG erzeugten Ak ließen sich unproblematisch als Substituenten in entsprechenden Assays einsetzen und ergaben im Vergleich zu den mit mammären Ak durchgeführten Bestimmungen identische Resultate.

Wir denken, daß die vorgestellten Ergebnisse zwar exemplarischen Charakter haben, aber für andere Anwendungsbereiche ähnliche Untersuchungen notwendig sind. Als grundsätzliches Problem bleibt nach

wie vor der Einsatz von Adjuvantien. Es wäre eine Strategie vorstellbar, die nach Adjuvantien mit im Vergleich zu FCA gleicher Effizienz, jedoch ohne Gewebseffekte sucht. Ansätze in dieser Richtung existieren bereits.

#### Danksagung

Für Unterstützung hinsichtlich Literaturdokumentation danken wir der „Zentrale(n) Erfassungs- und Bewertungsstelle für Ersatz- und Ergänzungsmethoden zum Tierversuch“ (ZEBET) Berlin.

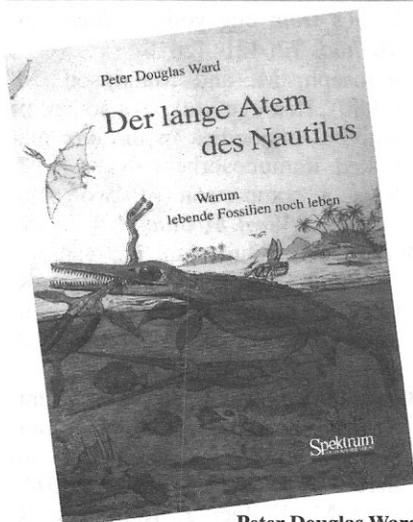
Das diesem Bericht zugrunde liegende Vorhaben wurde mit Mitteln des Bundesministeriums für Forschung und Technologie (0310124A) gefördert.

#### Literatur

- Bade, H. und Stegemann, H. (1984). Rapid method of extraction of antibodies from egg yolk. *J. Immunol. Methods* 72, 421–426
- Bar-Joseph, M. and Malkinson, M. (1980). Hen egg yolk as a source of antiviral antibodies in the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): a comparison of two plant viruses. *J. Virol. Methods* 1, 179–183
- Bürger, W., Schmechta, H., Tambor, A., Porstmann, T. und von Baehr, R. (1986). Aufbau eines Enzymimmunoassays für C-reaktives Protein. *Z. Klin. Med.* 41, 385–387
- Bürger, W., Ritter, E. und von Baehr, R. (1987). Ein schneller quantitativer Test für C-reaktives Protein im Serum. *Z. Klin. Med.* 42, 1999–2001
- Erhard, M., Kellner, J., Kühmann, R. und Lösch, U. (1991). Influence of various adjuvants on the synthesis of



# Über Leben und Überleben



**Peter Douglas Ward**  
**Der lange Atem des Nautilus**  
1993, 200 Seiten  
DM 44,- / öS 343,- / sfr 45,30  
ISBN 3-86025-087-6

Das Buch von Peter Ward ist eine faszinierende Weltreise zur wissenschaftlichen Erforschung unserer Vergangenheit und führt uns zu einigen der bemerkenswertesten Lebewesen der Erde, nämlich jenen Organismen, die seit Charles Darwin als lebende Fossilien bezeichnet werden. Der angesehenere amerikanische Paläontologe führt seine Leser von den Lebensräumen der Nautili auf Neukaledonien über die Fundstellen fossiler Pfeilschwanzkrebse in Deutschland und Illinois bis zu den Komoren im Indischen Ozean, der Heimat der Quastenflosser. Das Überleben ohne oder mit nur geringen Veränderungen über Zeiträume von Millionen von Jahren macht diese Methusalems zu einem Brennpunkt in der aktuellen Wissenschaftsdiskussion über die Ursachen jener Katastrophen, die als große Aussterbephase bekannt sind.

**Spektrum**  
AKADEMISCHER VERLAG

Vangerowstraße 20 · 69115 Heidelberg



- specific antibodies of chicken, sheep and rabbit following immunization with a hapten. *J. Vet. Med. A* 38, 21–27
- Friemel, H. (1991). *Immunologische Arbeitsmethoden*. Jena: Gustav Fischer Verlag.
- Gauthier, F. und Mouray, H. (1976). Rat  $\alpha_2$ -acute-phase macroglobulin. *Biochem. J* 159, 661–665
- Gassmann, M., Weiser, T., Tömmes, P. und Hübscher, U. (1990). Das Hühnerei als Lieferant polyklonaler Antikörper. *Schweiz. Arch. Tierheilk.* 132, 289–294
- Gassmann, M. und Hübscher, U. (1992). Polyklonale Antikörper aus dem Hühnerei. *ALTEX* 9 (16), 5–12
- Göhler, K., Schade, R., Hirschelmann, R., Martin, A. und Weidhase, R. (1986). Modulation of alpha-2-acute phase globulin serum concentration in turpentine- and immune complex-challenged rats by dexamethasone and adrenaline: Evidence for a synergistic mode of action. *Biomed. Biochim. Acta* 45, 661–672
- Gottstein, B. und Hemmler, E. (1985). Egg yolk immunoglobulin Y as an alternative antibody in the serology of echinococcosis. *Z. Parasitenk.* 71, 273–276
- Grajewskaja, N. A., Kusow, J. J. und Donets, M. A. (1988). Eigelb immuner Hühner als Quelle für die Gewinnung von Immunglobulinen für die Diagnostik von Virusinfektionen. *Mh. Vet.-Med.* 43, 677–680
- Groth, J. und Kaden, J. (1985). Das C-reaktive Protein – biologische und klinisch-diagnostische Bedeutung. *Z. Klin. Med.* 40, 1557–1562
- Hiepe, F., Schwarz, G. und Hiepe, Th. (1988). Untersuchungen zur Antikörpergewinnung aus dem Eigelb immunisierter Hühner. *Mh. Vet.-Med.* 43, 680–682
- Klemperer, F. (1893). Über natürliche Immunität und ihre Verwerthung für die Immunisierungstherapie. *Ark. Exptl. Path. Pharmakol.* 31, 356–382
- Kühlmann, R., Wiedemann, V., Schmidt, P., Wanke, R., Linckh, E. und Lösch, U. (1988). Chicken egg antibodies for prophylaxis and therapy of infectious intestinal diseases. *J. Vet. Med.* B35, 610–616
- Lösch, U., Schraner, I., Wanke, R. und Jürgens, L. (1986). The chicken egg, an antibody source. *J. Vet. Med.* 33, 609–619
- Pontet, M., Engler, R. und Jayle, M.F. (1977). One step preparation of both human C-reactive protein and CIt. *FEBS Letters* 88, 172–175
- Schade, R. und Bürger, W. (1979). Identification and characterization of serum proteins of the laboratory rat (*Rattus norvegicus*) by crossed immunoelectrophoresis. *Acta biol. med. germ.* 38, 653–664
- Schade, R., Schniering, A. und Hlinak, A. (1992). Die Gewinnung spezifischer, polyklonaler Antikörper aus dem Dotter von Hühnereiern als Alternative zur Immunisierung von Säugern – eine Übersicht. *ALTEX* 9 (17), 43–56
- Schade, R. und Hlinak, A. (1993). Die Extraktion spezifischer Antikörper aus dem Dotter von Hühnereiern – eine attraktive und unblutige Alternative zur Gewinnung spezifischer Antikörper in Säugern. *Mh. Vet.-Med.* 48, 91–98
- Schade, R., Pfister, C., Halatsch, R. und Henklein, P. (1991). Polyclonal IgY antibodies from chicken egg yolk – an alternative to the production of mammalian IgG type antibodies in rabbits. *ATLA* 19, 403–419
- Sprick-Sanjose Messing, A. (1990). Studien zur Adjuvanswirkung beim Haushuhn (*Gallus gallus*). *Inaugural Dissertation*, Universität München.

## Korrespondenzadresse

Rüdiger Schade  
Institut für Pharmakologie und  
Toxikologie des  
Universitätsklinikums Charité  
Schumannstr. 20/21  
D-10117 Berlin