



Die Gewinnung spezifischer, polyklonaler Antikörper aus dem Dotter von Hühnereiern als Alternative zur Immunisierung von Säugern – eine Übersicht

*Rüdiger Schade, Anne Schniering und Andreas Hlinak**

Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Medizinischen Fakultät (Charité) und *Institut für Virologie und Geflügelkrankheiten der Veterinär- Medizinischen Fakultät der Humboldt-Universität zu Berlin, PF 140, 0-1040 Berlin

Zusammenfassung

Die Gewinnung polyklonaler Antikörper (AK) aus dem Hühnerei ist eine Methode, die durchaus als Alternative zur traditionellen Gewinnung polyklonaler AK von Kleinsäu- gern gelten kann. Neben der nicht-invasiven AK-Gewinnung bietet die Methode den Vorteil, dass erheblich grössere Mengen an spezifischem AK gewinnbar sind als von einem Kaninchen in einem vergleichbaren Zeitraum. Die vorliegende Arbeit beschreibt diese Methode, wobei besonders Fragen der Immunisierung wie Art der Antigene, Immunisierungsschemata sowie Titerentwicklungen berücksichtigt werden. Darüber hinaus wird Auskunft gegeben über die Antigengruppen, gegen die bisher AK erzeugt wurden, über Methoden, in denen sie angewendet werden, sowie über unterschiedliche Einsatzgebiete. Ausserdem werden anhand von Literaturdaten Eigenschaften vitelliner AK von Vögeln (IgY) mit denen von Säugern (IgG) verglichen, um zu demonstrieren, dass IgY in gleicher Weise einsetzbar ist wie das IgG von Säugern.

Summary: Polyclonal avian antibodies extracted from egg yolk as an alternative to the production of antibodies in mammals – a review

Polyclonal avian antibodies (AB) extracted from chicken egg yolk can be considered as a real alternative to the traditional AB production in laboratory mammals. Besides the advantage of a non-invasive AB sampling, the amount of specific extractable AB is much higher in egg yolk than in rabbits in the same time period. This paper presents the methodology of IgY production and extraction particularly considering the mode of antigen injection, immunization schedule as well as titer development. The paper gives information about groups of antigens used for immunization so far, immunological methods applied and fields of IgY application. Furthermore, based on data from literature, IgY and IgG are compared with respect to properties important for immunological use.



Einleitung

Antikörper sind ein wesentlicher Bestandteil verschiedenster Nachweissysteme, die in der biologisch-medizinischen Forschung bzw. Routine für unterschiedlichste Fragestellungen eingesetzt werden. Die Erzeugung von polyklonalen Antikörpern (pAK) ist jedoch stets mit einer physischen oder emotionalen Belastung für das betreffende Tier verbunden, die sich aus der Immunisierung (Antigeninjektion) sowie der Blutabnahme (AK-Gewinnung) ergibt. Dies führte zur Suche nach Alternativen, die die Leiden und Belastungen von Tieren wenn nicht aufheben, so doch deutlich vermindern. Zumindest für den angesprochenen Bereich (pAK) ergibt sich eine Möglichkeit, die in den letzten Jahren zunehmend Beachtung findet.

Seit den Untersuchungen von Klemperer im Jahre 1883 (1) weiß man, daß im Dotter von Hühnereiern AK in beträchtlicher Menge akkumuliert sind. Obwohl dieses Faktum seit über hundert Jahren bekannt ist, wird es noch relativ selten ausgenutzt. Dabei bietet die Extraktion von AK aus dem Dotter von Hühnereiern verschiedene Vorzüge, über die in dieser Zeitschrift schon ausführlich berichtet wurde (2). Einer der Vorzüge ist die tatsächliche Reduzierung von belastenden Eingriffen, da die AK-Gewinnung unblutig erfolgt, eine Blutentnahme also entfällt. Die aus dem Dotter leicht zu extrahierenden, als IgY (Y = yolk = Dotter) bezeichneten AK lassen sich nach bisherigen Erkenntnissen in den meisten immunologischen Detektionssystemen einsetzen. Insofern scheint es unverständlich, daß diese Methode nicht weiter verbreitet ist.

In der vorliegenden Arbeit werden praktische Belange des Einsatzes vitelliner AK von Vögeln (IgY) berücksichtigt, wie z. B. Extraktionsmethoden, Immunisierungsprozeduren, Titerverläufe. Es wird informiert über bisher zur Immunisierung von Hühnern verwendete Antigene, Methoden, in denen IgY-AK eingesetzt wurden und werden; Eigenschaften von IgY werden mit denen von Säuger-IgG verglichen.

Dieser Beitrag soll die vorgestellte Alternativmethode transparent machen und potentielle Anwender zur Erprobung der Methode ermutigen.

Immunisierung/AK-Titerentwicklung

Die Immunisierung von Hühnern bereitet keine Probleme und wird in ähnlicher Weise wie bei Kaninchen vorgenommen. In der Regel wird das Antigen intramuskulär injiziert (Musculus pectoralis), meist vermischt mit

Freund's komplettem Adjuvans (FCA), aber auch i.v., i.p. sowie i.d. und s.c. (intravenös, intraperitoneal, intradermal, subcutan). Antigeninjektionen sind beschrieben worden. Aus der Literatur geht nicht hervor, daß die eine oder andere Injektionsart Vorteile gegenüber den anderen hat, es gibt eher den Hinweis auf keine größeren Unterschiede zwischen den verschiedenen Applikationsrouten (2). Belegt hingegen ist die günstige Wirkung von FCA im Vergleich zu anderen Adjuvantien (4). Zur Immunisierung werden sehr unterschiedliche Antigenmengen eingesetzt, von wenigen Mikrogramm bis zu mehreren Milligramm (siehe Abb. 1).

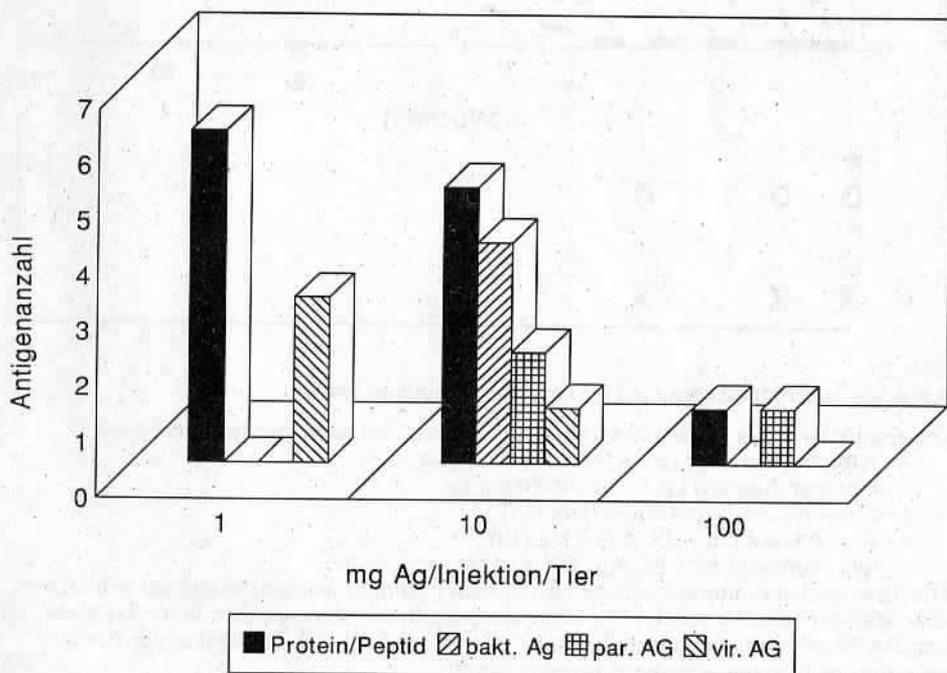


Abb. 1

Zur Immunisierung von Hühnern eingesetzte Antigenmengen

Dargestellt sind für vier verschiedene Antigenbereiche (Proteine bzw. Peptide, bakterielle Ag, von verschiedenen Parasiten stammende Ag, virale Ag) die zur Immunisierung eingesetzten Mengen (Ag/Injektion/Tier). Die Angaben in mg verstehen sich als Bereiche (bis 1 mg, 1-10 mg und 10-100 mg). Die 4. Achse gibt Auskunft über die Anzahl der entsprechenden Beispiele. Der Statistik liegt folgende Literatur zugrunde: 3, 5, 9, 12-15, 19, 22, 25, 27-36, .

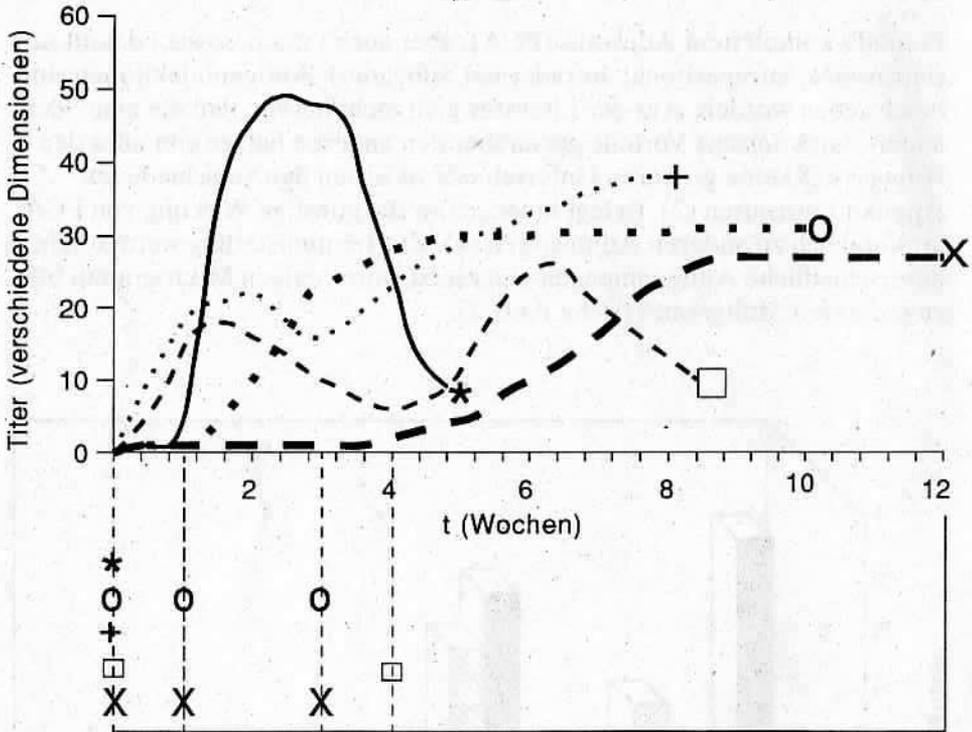


Abb. 2a
Antikörpertiterentwicklung in Hühnern nach Immunisierung

Dargestellt ist die IgY-Titerentwicklung in Hühnereiern nach Immunisierung mit
 + - Albumin (human) i.m. + FCA (3) 40 mg/kg
 - Albumin (human) i.p. (3) 40/20 mg/kg
 * - *Citrus tristeza* Virus i.m. 100 µg (25)
 o - *E. granulosa* i.m. + FCA je 1 mg (19)
 x - IgG (human) i.m. + FCA je 350 mg (27)

Die Titer sind mit unterschiedlichen Methoden bestimmt worden, so daß ein willkürlicher Maßstab gewählt wurde. Die Höhe der jeweiligen Titer ist daher nicht vergleichbar. Die Markierungen unterhalb der x-Achse bezeichnen die Zeitpunkte der Erstimmunisierung bzw. der jeweiligen Boosterungen.

Nach Literaturangaben läßt sich auch in Wachteln (*Coturnix coturnix japonica* Temminck et Schlegel) ein ausreichender AK-Titer auch mit nur wenigen Mikrogramm Antigen/Injektion erreichen. Diese Spezies wird von den Autoren für eine AK-Produktion empfohlen, wenn nur eine geringe Antigenmenge zur Immunisierung zur Verfügung steht (5).

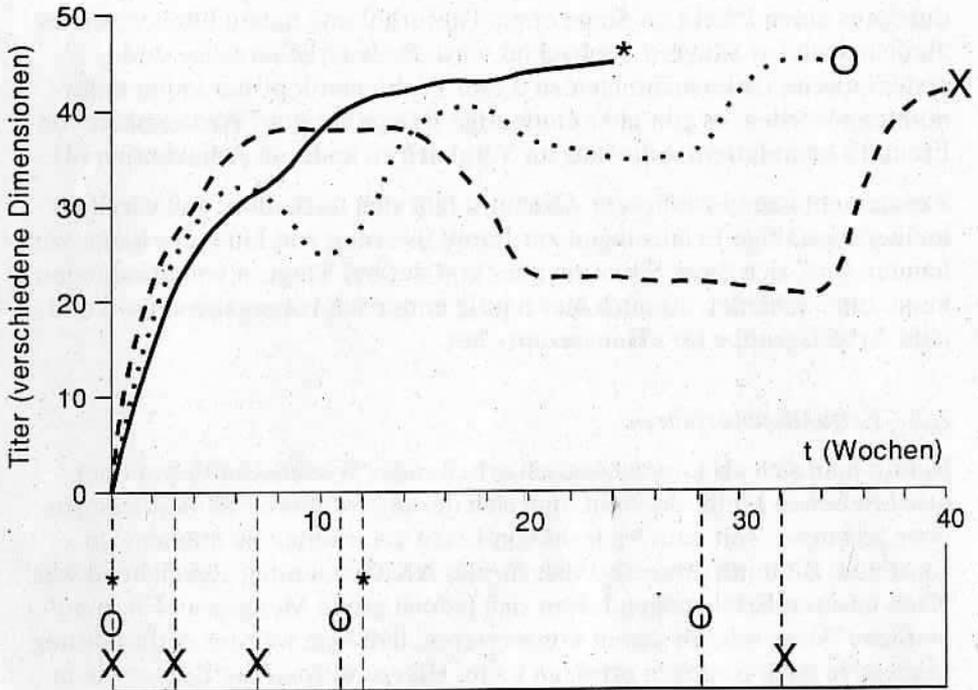


Abb. 2b

* - IgG (Ziege) i.m. + FCA 8 mg bzw. 3 x 3 mg (15)

o - *E. coli* i.m. + FCA je 0,3 ml Lösung (28)

x - Poliovirus i.m. + FCA (26)

Erläuterungen wie für 2a.

Ein wichtiges Problem in dem beschriebenen Zusammenhang ist die Frage nach der Ausprägung der AK-Titer. Hierzu scheint es unterschiedliche Erfahrungen zu geben. Dies betrifft sowohl die Titerhöhe in Abhängigkeit von der Zeit als auch die Wirksamkeit von Boosterungen (Mehrfachinjektionen).

Es gibt Hinweise in der Literatur auf einen zyklischen Verlauf der AK-Titerentwicklung, wonach der Titer innerhalb von ca. 7 Tagen ansteigt, ein Plateau erreicht, das für weitere 7-10 Tage gehalten wird, um danach wieder abzusinken (siehe Abb. 2a). Dieser Verlauf scheint durch die Art der verwendeten Adjuvantien, bzw. deren Anwendung überhaupt beeinflusst zu werden (4, 11). Die Meinungen zur Bedeutung von Boosterungen gehen etwas auseinander (2), die Abb. 2a/b belegen jedoch, daß Boosterungen



durchaus einen Effekt im Sinne einer Titererhöhung haben können, wie es ähnlich auch bei Säugern beobachtet wird. Bedauerlicherweise sind systematische Untersuchungen zu dieser Problematik bisher kaum unternommen worden, es gibt aber eindeutige Belege für gute Wirksamkeit von Freund's komplettem Adjuvans im Vergleich zu anderen Adjuvantien (4).

Zusammenfassend zu diesem Abschnitt läßt sich festhalten, daß verallgemeinerungsfähige Erfahrungen zur Immunisierung von Hühnern kaum vorhanden sind, sich diese Situation aber von der bei Säugern vorzufindenden kaum unterscheidet, als auch hier häufig empirisch vorgegangen wird und jede Arbeitsgruppe ihr «Hausrezept» hat.

IgY - Extraktionsverfahren

Befäßt man sich als immunologisch arbeitender Wissenschaftler mit der beschriebenen Methode, sieht man sich der ungewohnten Situation gegenüber, in kurzer Zeit eine Vielzahl von Eiern aufarbeiten zu müssen, wo sonst eine Blutentnahme als Basis für die AK-Gewinnung ausreichend war. Nach unseren Erfahrungen lassen sich jedoch große Mengen an Eiern auf einfache Weise schnell soweit konservieren, daß eine weitere Aufarbeitung sukzessive nach Belieben erfolgen kann. Hierzu werden die Dotter wie in der Literatur beschrieben vom Eiklar getrennt, gewaschen, in normale Haushaltsfolie eingeschlagen und in handelsüblichen Eiverpackungen (als Behälter) bei -20°C eingefroren. In gefrorenem Zustand lassen sich die Dotter beliebig verpacken und platzsparend aufbewahren. Für die IgY-Extraktion sind sehr unterschiedliche Verfahren beschrieben worden (für eine Zusammenstellung siehe 6). Die am häufigsten angewandte Methode ist die von Polson et al. (7, 8) beschriebene Prozedur, die auf einer Polyethylenglykolfällung basiert. Darüberhinaus sind weitere Präzipitationsmethoden (z.B. Eiweißfällung mittels Ammoniumsulfat) ebenso wie chromatographische Präparationen sowie Kombinationen dokumentiert worden.

Ein spezifisches Problem der Extraktion vitelliner AK ist die Abtrennung der reichlich vorhandenen Lipoproteide. Abb. 3 zeigt das Elutionsprofil eines Dotterhextraktes, chromatographiert an Sephacryl S 300 (Pharmacia). Es wird ersichtlich, daß ein nicht unbeträchtlicher Eiweißanteil aus Lipoproteiden besteht. Erfahrungen von Anwendern zufolge können Lipoproteide die Leistungsparameter von vitellinen AK maskieren. Dieser Besonderheit muß also bei der Präparation vitelliner AK Rechnung getragen werden.

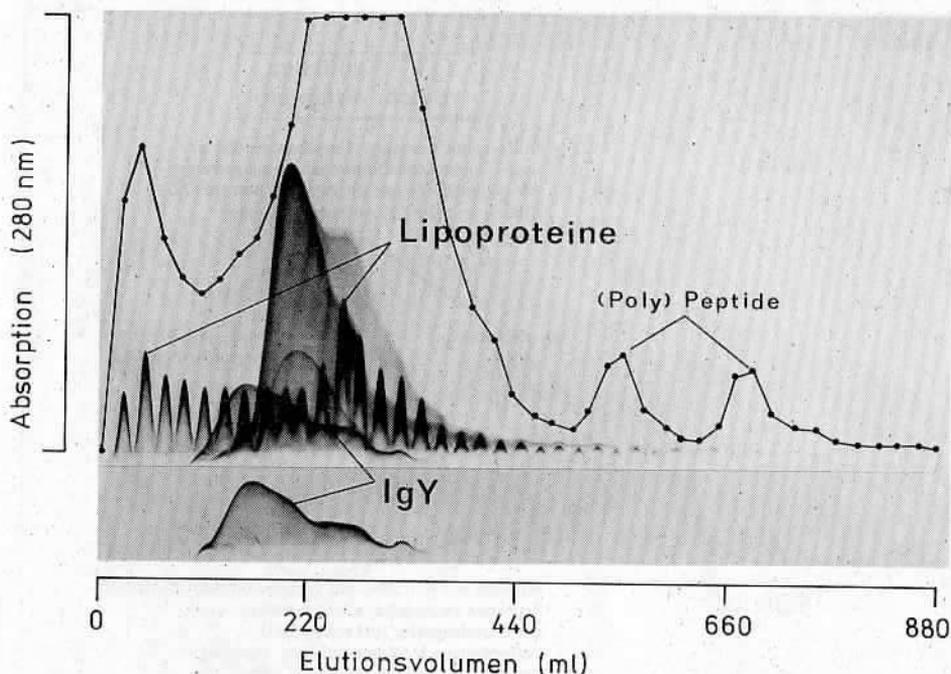


Abb. 3

Fused Rocket Immunelektrophorese eines mittels Gelfiltration (Sephacryl S-300, Pharmacia) fraktionierten rohen Dotterextraktes

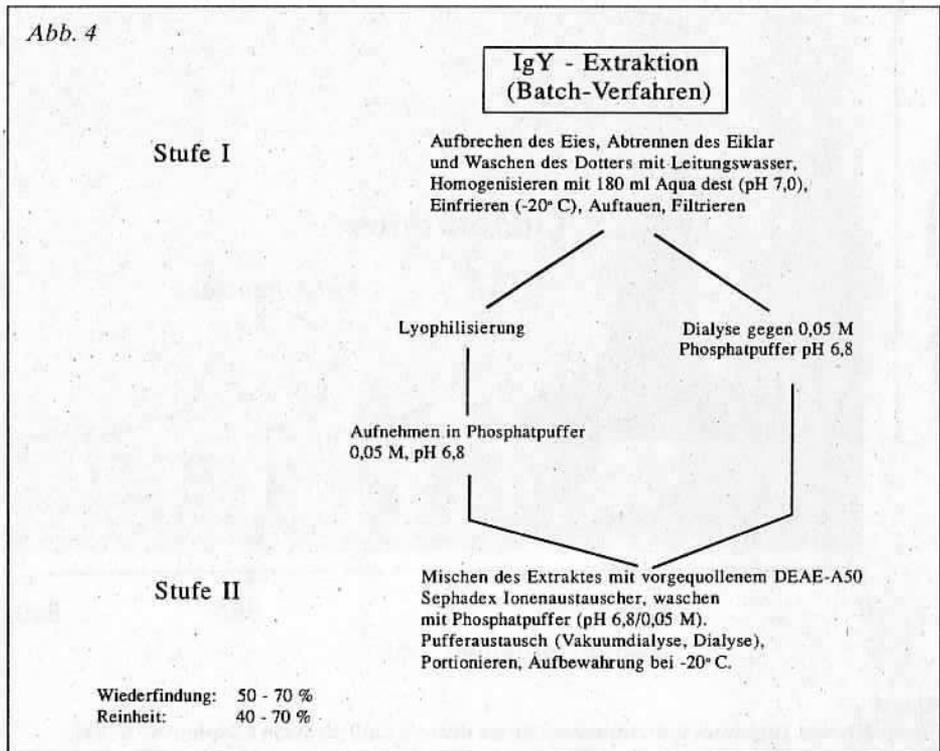
Oberer Teil: Monitoring des Extraktes mittels UV-Absorption (280 nm) bzw. mittels eines polyspezifischen Anti-Huhnserum AK

Unterer Teil: wie oben, aber es wurde ein monospezifisches Anti-IgY Antiserum verwendet.

Eine Alternativmethode sollte billigerweise im Vergleich zu bisher praktizierten Verfahren zumindest vergleichbare Leistungsparameter aufweisen und sollte ebenso einen vertretbaren Aufwand nicht übersteigen.

Wir erarbeiten derzeit eine Methode, die mit einem relativ geringen Aufwand an Material und Zeit auskommt. Das Extraktionsschema ist in Abb. 4 dargestellt. Die IgY-Extraktion beruht auf einer Ionenaustausch-Chromatographie im sogenannten Batch-Verfahren, was bedeutet, daß die Präparation nicht säulenchromatographisch, sondern im Becherglas erfolgt. Unter den in der Abb. 4 angegebenen Bedingungen wird IgY in einer wäßrigen Lösung an DEAE A-50 Ionenaustauscher (Pharmacia) gebunden, während

Abb. 4



ein Großteil anderer Proteine nicht gebunden wird. Durch Veränderung der Molarität kann IgY selektiv abgelöst werden. Auf diesem Wege wird eine Isolierung des IgY sowie gleichzeitig eine Konzentrierung erreicht. Nach Dialyse gegen einen entsprechenden Puffer kann der Extrakt portioniert und eingefroren werden. Eine Alternative (wenn möglich) ist die Lyophilisierung des Materials. Die Lyophilisierung des IgY-Extrakts kann auch schon bei Stufe 1 erfolgen, so daß sich weitere Extraktionsschritte später anschließen könnten.

Aus dem Gesagten wird deutlich, daß verschiedene IgY-Extraktionsprozeduren verfügbar sind, die sich in ihrer Leistungsfähigkeit sicherlich unterscheiden; dafür aber den Vorzug haben, daß sie sich an unterschiedlichste Laborbedingungen ebenso wie Anforderungen an Reinheit und Ausbeute anpassen lassen. Eine IgY-Präparation ist somit auch unter einfachsten Laborbedingungen möglich.



IgY-Extraktionsverfahren, die einen größeren Einsatz an Lösungsmitteln erforderlich machen (9), werden von uns aus Umweltschutzgründen nicht durchgeführt.

Anwendung vitelliner Antikörper aus dem Hühnerei

Eine wesentliche Voraussetzung für uneingeschränkte Anwendung vitelliner AK ist der Nachweis zumindest gleichwertiger Leistungsparameter im Vergleich zu AK von Säugern. Den bisher vorliegenden Literaturdaten ist zu entnehmen, daß aviäre AK in allen üblichen immunologischen Nachweistechiken akzeptable Ergebnisse zeitigten. Das betrifft sowohl klassische Präzipitationstechniken (Immundiffusion, Elektroimmundiffusion) als auch kompliziertere Verfahren wie Immunhistochemie, Radioimmunassay oder Enzymimmunassay, wobei letztere die am häufigsten eingesetzte Technik zu sein scheint. Aviäre AK waren erfolgreich im Nachweis unterschiedlichster Antigene (Übersicht in 6) und wurden für eine Vielzahl diagnostischer, taxonomischer und weiterer Fragestellungen eingesetzt. Einschränkungen in der Einsetzbarkeit aviärer AK sind bisher bis auf die in Tab. 1 angegebenen nicht bekannt.

Im Unterschied zu mammären AK besitzen aviäre AK eine bemerkenswerte Hitze- und Säurestabilität (3), woraus sich spezielle Anwendungsgebiete ergeben. Löscher und Mitarbeiter konnten zeigen, daß aviäre, vitelline AK sich für eine orale Therapie bzw. Prophylaxe spezieller Erkrankungen von Nutztieren (z.B. Enteritiden des Schweines) eignen (10).

Aves und Mammalia unterlagen im Laufe der Phylogenese frühzeitig einer getrennten Entwicklung, so daß es nicht verwundern kann, daß die Immunsysteme der Vertreter beider Tierklassen jeweils ihre Besonderheiten aufweisen. Dies schlägt sich nicht zuletzt darin nieder, daß das Immunsystem der Hühner Antigene bzw. deren Epitope "anders" erkennt als das Immunsystem des Kaninchens z.B..

Es gibt Beispiele in der Literatur, die diesen Sachverhalt belegen (12, 13, 14). Danach reagierten Hühner mit AK-Bildung auf Stimulierung mit Antigenen, die im Kaninchen keine AK-Produktion bewirkten. Die Erzeugung spezifischer AK im Huhn könnte demnach auch eine wissenschaftliche Alternative sein, wenn die Verwendung von Säugern als AK-Produzenten nicht zum Erfolg führt. Auch für die Differenzierung von Säugerspezies sind AK vom Huhn aufgrund geringerer Kreuzreaktionen wesentlich besser



geeignet als AK von Säugern (15). Das gleiche Problem spielt auch bei immunhistochemischen Techniken eine Rolle, für die sich aviäre AK ebenfalls sehr gut eignen (16).

Die bereits angesprochenen unterschiedlichen Entwicklungsstufen des Säuger- bzw. Vogel-Immunsystems finden ihren Niederschlag auch in unterschiedlichen Ig-Isotypen. Der üblicherweise vom Kaninchen gewonnene spezifische AK ist dem IgG-Typ zuzurechnen, während der aus dem Dotter gewonnene AK nach Untersuchungen von Ambrosius eher dem IgA-Typ zuzurechnen ist (17). Hieraus ergeben sich die in der Tab. 1 aufgeführten Unterschiede sowie praktische Konsequenzen für die Enzymimmunoassaytechnik, da der aviäre AK nach unseren Erfahrungen optimal bei pH 8,0 an ELISA-Platten bindet, während für Säuger-AK ein pH von 9,5 empfohlen wird.

Tabelle 1

Vergleich der Eigenschaften bzw. Leistungsparameter von aviären (IgY) mit denen von mammären (IgG) Antikörpern

| Eigenschaften | IgG | IgY | Referenz |
|----------------------------------|---------------------------|--------------------------------------|----------|
| Fc/Komplement-Bind. | + | - | 3 |
| Protein A/G-Bind. | + | - | 18 |
| rel. Hitze- u. Säurestabilität | - | + | 3 |
| Menge an spez. AK (Basis-1Monat) | 16,6 mg | 298 mg | 19 |
| Titerentwicklung | vergleichbar (siehe Text) | | |
| Empfindlichkeit | vergleichbar | | |
| RIA | 19 pMol/l | 10 pMol/l | 20, 21 |
| EIA | 5 ng/ml | 5 ng/ml | 22, 23 |
| Ak-Quelle | Blut | Dotter | |
| Reaktion auf FCA | stark | schwach | 24 |
| Lagerung | | stabil nach mehr als 1 Jahr (-20o C) | |

Schlußbetrachtungen

Anhand der verfügbaren Literatur ist belegbar, daß polyklonale, aviäre, vitelline AK mit unbedeutenden Ausnahmen gleichrangig zu Säuger-AK einsetzbar sind. Das schließt auch das Vorhandensein kommerzieller Konjugate ein (FITC-, POD- markierte anti Huhn IgY Antikörper), die für Detektionssysteme wie EIA oder immunhistochemische Techniken notwendig



sind. Die Materialgewinnung läßt sich einfach und kostengünstig realisieren, wobei die einzelnen Anwender sicherlich unterschiedliche Erfahrungen haben und die jeweilige Laborausstattung die Entscheidung für das eine oder andere Extraktionsverfahren beeinflussen wird. Räumt man dem Tierschutzaspekt (dieser Aspekt wurde im Zusammenhang mit der beschriebenen Methode von Gassman und Hübscher in dieser Zeitschrift ausführlich und explizit dargelegt, so daß in dieser Arbeit nur kurz darauf eingegangen wird) bezogen auf die vorgestellte Alternativmethode eine hohe Priorität ein, gibt es kaum Gründe für eine Ablehnung dieser Methode. Insgesamt wäre zu wünschen, daß der Anwendung aviärer vitelliner AK eine breitere Akzeptanz beschieden würde als es tatsächlich der Fall ist.

Abschließend soll in mehreren Punkten zusammenfassend kurz auf die Vorzüge der Methode hingewiesen werden.

1. Hühner werden durch die unblutige AK-Gewinnung objektiv weniger durch eine Immunisierung belastet als vergleichsweise Kaninchen. Hinzu kommt, daß Hühner auf die Injektion von Adjuvantien (FCA) weniger empfindlich als Säuger reagieren.
2. In einem vergleichbaren Zeitraum übertrifft die Ausbeute an spezifischem aviären AK die von Kaninchen gewinnbare AK-Menge um ein Vielfaches.
3. Unter Berücksichtigung des Preis-Leistungsverhältnisses bzw. des verfolgten Zieles lassen sich IgY-AK mit relativ einfachen Mitteln gewinnen und sind somit einem breiten Anwenderkreis prinzipiell zugänglich.
4. Das Monitoring von AK-Titern gegen bestimmte aviäre Infektionen bzw. als Kontrolle einer Immunisierung ist auch über AK aus dem Ei möglich und würde auch hier zur Reduzierung von Eingriffen am Tier führen.
5. Schließlich kann der Einsatz von Hühnern zur Gewinnung spezifischer AK die ultima ratio sein in Fällen, in denen Kaninchen mit der Bildung spezifischer AK versagen.

Wir halten die Produktion spezifischer AK im Huhn für eine interessante und attraktive Alternativmethode, deren einziger Mangel eine bisher relativ geringe Akzeptanz ist. Eine detaillierte Information über dieses Verfahren einschließlich der Dokumentation von Anwendungsbeispielen sollte ermöglichen, diesem Mangel abzuweichen.



Danksagung

Für Unterstützung durch Literaturbereitstellung danken wir sehr der "Zentrale(n) Erfassungs- und Bewertungsstelle für Ersatz- und Ergänzungsmethoden zum Tierversuch" (ZEBET), Berlin.

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

Literatur

1. Klemperer, F. 1883. Ueber natürliche Immunität und ihre Verwerthung für die Immunisierungstherapie. *Ark. f. Exptl. Path. u. Pharmakol.* 31: 356-382
2. Gassmann, M. und Hübscher, U. 1992. Der Einsatz von polyklonalen Antikörpern aus dem Eigelb immunisierter Hühner. *ALTEX* 16: 5-12
3. Lösch, U., Schraner, I., Wanke, R. and Jürgens, L. 1986. The chicken egg, an antibody source. *J. Vet. Med.* B35: 609-619
4. Kellner, J. 1990. Einfluß verschiedener Adjuvantien auf die Antikörpersynthese nach der Immunisierung mit einem Hapten am Beispiel der Spezies Schaf, Kaninchen, Huhn und Maus. Inaugural Dissertation, Institut für Physiologie, Physiologische Chemie und Ernährungsphysiologie der Tierärztlichen Fakultät der Universität München.
5. Somowiyarjo, S., Sako, N. and Nonaka, F. 1990. Production of avian antibodies to three potyvirus in coturnix quail. *J. Virol. Methods* 28: 125-132
6. Schade, R., Pfister, C., Halatsch, R., 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
7. Polson, A., Coetzer, T., Kruger, J., von Maltzahn, E. and van der Merwa, K. J. 1985. Improvements in the isolation of IgY from the yolks of eggs laid by immunized hens. *Immunological Investigations* 14: 323-327
8. Polson, A., von Wechmar, M. B. and van Regenmortel, M. H. V. 1980. Isolation of viral IgY antibodies from yolks of immunized hens. *Immunol. Commun.* 9: 475-493
9. Bade, H. and Stegemann, H. 1984. Rapid method of extraction of antibodies from egg yolk. *J. Immunol. Methods* 72.: 421-426
10. Kühlmann, R., Wiedemann, V., Schmidt, P., Wanke, R., Linckh, E. und Lösch, U. 1988. Chicken egg antibodies for prophylaxis and therapie of infectious intestinal diseases. *J. Vet. Med.* B35: 610-616
11. Sprich-Sanjose Messing, A. 1990. Studien zur Adjuvanswirkung beim Haushuhn (*Gallus gallus*). Inaugural Dissertation. Universität München
12. Carroll, S. B. and Stollar, B. D. 1983. Antibodies to calf thymus RNA polymerase II from egg yolks of immunized hens. *J. Biol. Chem.* 258: 24-26
13. Song, C.-S., Yu, J.-H., Bai, D. H., Hester, P. Y. and Kim, K.-H. 1985. Antibodies to the alpha-subunit of insulin receptor from eggs of immunized hens. *J. Immunol.* 135: 3354-3359



14. Goueli, S. A., Hanten, J., Davis, A. and Ahmed K. 1990. Polyclonal antibodies against rat liver cytosolic casein kinase II (CK-2) cross-react with CK-2 from other tissue and nuclear form (PK-N2) of the enzyme. *Biochem. Int.* 21: 685-694
15. Wallmann, J. und Staak, C. 1991. Isolierung spezifischer Antikörper aus Eiern immunisierter Hühner durch Ammoniumsulfat-Präzipitation. in press
16. Schmidt, P., Hafner, A., Reubel, G. H., Wanke, R., Franke, V., Lösch, U. und Dahme, E. 1989. Production of antibodies to canine distemper virus in chicken eggs for immunohistochemistry. *J. vet. med.* B36: 661-668
17. Ambrosius, H. and Luppä, H. 1987. *Immunhistochemie, Grundlagen und Techniken.* Akademie-Verlag, Berlin
18. Ankerström, B., Brodin, Th., Reis, K. and Börg, L. 1985. Protein G: A powerful tool for binding and detection of monoclonal and polyclonal antibodies. *J. Immunol.* 135: 2589-2592
19. Gottstein, B. and Hemmeler, E. 1985. Egg yolk immunoglobulin Y as an alternative antibody in the serology of echinococcosis. *Z. Parasitenk.* 71: 273-276
20. Schade, R., Oelßner, W., Göhler, K., Ott, T., Pfister, C., Henklein, P., Furkert, F. J., Ruppich, Ch., Fekete, M., Penke, B. and Jojart, I. 1988. Characterization of anti-CCK-8 antibodies raised in hens and rabbits by means of several in vitro and in vivo animal models. *Biogenic Amines* 5: 535-550
21. Vieira, J. G., Oliveira, M. A., Maciel, R. M. Mesquita, C. H. and Russo, E. M. 1986. Development of an homologous radioimmunoassay for the synthetic amino terminal (1-34) fragment of human parathyroid hormone using egg yolk-obtained antibodies. *J. Immunoassay* 7: 57-72
22. Porstmann, T., Lukowsky, A., Müller, G. M., Volk, H. D., Porstmann, B., Nugel, E., Schade, R., Schmechta, H. and Kopetz, B. 1986. Isolation, quantitation and some physico-chemical and biological properties of a pregnancy-associated glycoprotein (PAG) in the rat. in: *Pregnancy Proteins in animals* (ed. J. Hau), Walter de Gruyter, Berlin-New York, pp. 389-413
23. Meisel, H. 1990. Enzyme-immunoassay ELISA using IGY antibody against lactoferrin. *Milchwissenschaft* 45: 510-512
24. Gassmann, M., Weiser, T., Thömmes, P. und Hübscher, U. 1990. Das Hühnerei als Lieferant polyklonaler Antikörper. *Schweiz. Arch. Tierheilk.* 132: 289-29426.
25. 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
26. Graewskaja, 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
27. Hiepe, F.; Schwarz, G. und Hiepe, Th. 1988. Untersuchungen zur Antikörpergewinnung aus dem Eigelb immunisierter Hühner. *Mh. Vet.-Med.* 43: 680-682
28. Kühlmann, R., Wiedemann, V., Schmidt, P., Wanke, R., Linckh, E. and Lösch, U. 1988. Chicken egg antibodies for prophylaxis and therapie of infectious intestinal diseases. *J. Vet. Med.* B35: 610-616



29. Yolken, R. H., Leister, F., Wee, S.-B., Miskuff, R. and Vonderfecht, S. 1988. Antibodies to rotaviruses in chickens eggs: a potential source of antiviral immunoglobulins suitable for human consumption. *Pediatrics* 81: 291-295
30. Hassl, A., Aspöck, H. and Flamm, H. 1987. Comparative studies on the purity and specificity of yolk immunoglobulin Y isolated from eggs laid by hens immunized with toxoplasma-gondii antigen. *Zentralbl. Bakteriolog. Mikrobiol. Hyg. Ser. A* 267: 247-253
31. Gassmann, M., Thömmes, P., Weiser, T. and Hübscher, U. 1990. Efficient production of chicken egg yolk antibodies against a conserved mammalian protein, *FASEB Journal* 4: 2528-2532
32. Vieira, J. G. H., Oliveira, M. A. D., Russo, E. M. K., Maciel, R. M. B. and Pereira, A. B. 1984. Egg yolks as a source of antibodies for human parathyroid hormone (hPTH) radioimmunoassay. *J. Immunoassay* 5: 121-129
33. Fertel, R., Yetiv, J. Z., Coleman, M. A., Schwarz, R. D., Greenwald, J. E. and Bianchine, J. R. 1981. Formation of antibodies to prostaglandins in the yolk of chicken eggs. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 102: 1028-1033
34. Altschuh, D., Hennache, G. and van Regenmortel, M. H. V. 1984. Determination of IgG and IgM levels in serum by rocket immunoelectrophoresis using yolk antibodies from immunized chickens. *J. Immunol. Methods* 69: 1-
35. Burdsall, H. H., Banik, M. and Cook, M. E. 1990. Serological differentiation of three species of armillaria and lentinulaedodes by ELISA using immunized chickens as a source of antibodies. *Mycologia* 82: 415-423
36. Ricke, S. C., Schaefer, D. M., Cook, M. and Kang, K. H. 1988: Differentiation of ruminal bacterial species by enzyme-linked immunosorbent assay using egg yolk antibodies from immunized chicken hens. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 596-599