

Lokale Reaktionen bei Verwendung verschiedener Adjuvantien bei Legehennen

Peter Schmidt¹, Michael Erhard², Rüdiger Wanke¹, Andrea Hofmann² und Wolfgang Schmahl¹

¹Institut für Tierpathologie und ²Institut für Physiologie, Physiologische Chemie und Tierernährung der Ludwig-Maximilians-Universität, D-München

Zusammenfassung

Von einem tierschutzgerechten Adjuvans ist neben seiner immunstimulierenden Wirkung eine ausgezeichnete Gewebeverträglichkeit an der Injektionsstelle zu fordern. In der vorliegenden Studie wurden die lokalen Gewebereaktionen in der Pektoralismuskulatur des Huhnes nach intramuskulärer Injektion von Freund'schem kompletten Adjuvans (FCA), Muramyl-dipeptid (MDP) und Pam₃Cys-Ser-(Lys)₄ (PCSL) untersucht. Während nach Applikation von FCA in allen untersuchten Fällen das Auftreten einer hochgradigen granulomatösen und teilweise abszedierenden Myositis zu beobachten war, hatte die Verwendung von MDP und dem Lipopeptid PCSL lediglich geringgradige und vorübergehende entzündliche Veränderungen zur Folge. Aufgrund seiner ausgezeichneten immunstimulierenden Eigenschaften bei minimaler Gewebeerkrankung bietet sich das synthetische Lipopeptid PCSL als Alternative zum häufig verwendeten FCA an.

Summary: Local reactions after the application of several adjuvants in the chicken.

For an animal sparing adjuvant high immunostimulation potential combined with minimum tissue irritating qualities are to be demanded. In the present study local tissue reaction due to intramuscular injection of Freund's complete adjuvant (FCA), muramyl-dipeptide (MDP) and Pam₃Cys-Ser-(Lys)₄ (PCSL) into the pectoral muscle of hens was examined. After application of FCA in all cases there was a violent tissue reaction resulting in a pronounced granulomatous, in some cases absceding, inflammation. The use of MDP and of the synthetic lipopeptide PCSL provoked only a mild and transient tissue reaction. Therefore and because of its high immunostimulation potential, PCSL is a convenient alternative to FCA.

Keywords: chicken, adjuvants, lipopeptides, Freund's complete adjuvant, muramyl-dipeptide, myositis

1 Einleitung und Fragestellung

Aviäre Antikörper stellen für therapeutische und diagnostische Zwecke eine ideale Alternative zu polyklonalen Antikörpern von Säugetieren dar. Die Möglichkeit der schonenden Gewinnung großer Mengen von Antikörpern aus dem Hühnerei läßt diese Methode gerade unter dem Aspekt des Tiereschutzes in den Vordergrund rücken. Voraussetzung für eine effiziente Nutzung der einfach zugänglichen Antikörperquelle „Hühnerei“ ist eine optimale Immunisierung der Legehennen, wobei für die Erzielung ausreichend hoher Antikörpertiter der Einsatz geeigneter Adjuvantien notwendig ist. Von einem tierschutzgerechten Adjuvans ist neben seiner immunstimulierenden Wirkung eine ausgezeichnete Gewebeverträglichkeit an der Injektionsstelle zu fordern. Ziel der vorliegenden Studie war es, die lokalen Gewebereaktionen nach intramuskulärer Applikation verschiedener Adjuvantien in die Pektoralismuskulatur

von 4 Monate alten Weißen Leghorn Hennen (Lohmann Selected Leghorn) mit einem Körpergewicht von 800 bis 1200 g auf makroskopischer und lichtmikroskopischer Ebene zu untersuchen.

2 Versuchstiere, Material und Methoden

2.1 Adjuvantien

Als Adjuvantien wurden Komplettes Freund'sches Adjuvans (FCA; Difco, Detroit, USA), Inkomplettes Freund'sches Adjuvans (FIA; Difco, Detroit, USA), N-Acetylmuramyl-L-Alanyl-D-Isoglutamin (MDP; Sigma, St. Louis, USA) und das synthetische Lipopeptid Pam₃Cys-Ser-(Lys)₄ (PCSL; Prass et al., 1987) eingesetzt.

2.2 Antigene

Folgende Antigene kamen zum Einsatz: das Protein Humanserumalbumin (HSA; Sigma, St. Louis, USA), das Hapten 1,2,2-Trimethylpropyl-para-

aminophenylphosphonat (MATP), gekoppelt an HSA (Schmidt et al., 1988), sowie die erregerspezifischen Antigene Lactovac® Muttertier-Vaccine (Hoechst, Unterschleißheim, Deutschland; bestehend aus inaktiviertem Rotavirus, inaktiviertem Coronavirus, inaktiviertem Parvovirus und inaktiviertem E. coli K99 Pilusantigen) und Kryptosporidien (aus Kälberkot isoliert und freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. R. Gothe, Institut für vergleichende Tropenmedizin und Parasitologie, LMU München).

2.3 Immunisierung der Legehennen und Probengewinnung

Immunisierung mit HSA:

Jeweils 7 Legehennen wurden mit 5 mg HSA/kg Körpergewicht (KGW) in 0,9%iger NaCl-Lösung (Gruppe I) bzw. mit 5 mg HSA/kg KGW in einer Emulsion mit FCA (0,5 ml FCA/kg KGW) (Gruppe II) oder mit 5 mg HSA/kg KGW in 0,9%iger NaCl-Lösung mit 300 µg MDP (Gruppe III) in

die Pektoralismuskulatur immunisiert (i.m.). Alle Tiere wurden am 42. Tag nach der Erstimmunisierung mit 2 mg HSA/kg KGW in 0,5 ml/kg KGW 0,9%iger NaCl-Lösung intravenös (*vena cutanea ulnaris*) reimmunisiert.

Von jeder Gruppe wurden Tiere am 7. (n=2), 49. (n=2) und 91. (n=3) Tag nach der ersten Immunisierung getötet (intravenöse Barbituratinjektion). Innerhalb einer Stunde nach der Euthanasie wurde die Muskulatur im Injektionsbereich entnommen, in gepuffertem Formalin (5%) immersionsfixiert und anschließend durch planparallele Schnitte bei einer Schichtdicke von 2–3 mm lamelliert. Nach routinemäßiger Einbettung in Paraffin wurden 3 µm dicke Schnitte mit Hämalun und Eosin (H&E) bzw. mit der Trichromfärbung nach Masson gefärbt. Gefrierschnitte wurden zur Darstellung von Lipiden mit Fettrot 7B gefärbt. Von ausgewählten Fällen wurden immunhistochemische Untersuchungen an Paraffinschnitten zur Darstellung IgG-, IgM- und IgA-synthetisierender Plasmazellen mittels der Avidin-Biotin-Complex (ABC)-Methode durchgeführt (Sprick-Sanjose Messing, 1990).

Immunisierung mit MATP-HSA:

6 Legehennen wurden mit 1 mg MATP-HSA/Tier i.m. immunisiert. Die Impfdosis (Antigen gemeinsam mit Adjuvans) betrug insgesamt 1,2 ml. Die Tiere der Gruppe IV (n=3) erhielten als Adjuvans 0,5 mg PCSL in 0,9%iger NaCl-Lösung, die Tiere der Gruppe V 0,6 ml FCA (n=2) und Tier VI 0,6 ml FIA. Alle Hühner wurden 4 und 8 Wochen nach der Erstimmunisierung nach der selben Methode reimmunisiert. Bei den Tieren der Gruppe V wurde dabei FCA durch FIA ersetzt. Die Probengewinnung für die morphologische Untersuchung (s.o.) erfolgte 42 Tage nach der letzten Immunisierung.

Immunisierung mit Lactovac® und mit Kryptosporidien:

Jeweils 8 Legehennen wurden mit 1 ml Lactovac® in Kombination mit 0,5 ml PCSL (0,5 mg) (Gruppe VII) oder mit 0,5 ml FCA (Gruppe VIII) bzw. mit 0,5 ml Kryptosporidiensuspension ($2,5 \times 10^6$) in Kombination mit 0,5 ml PCSL (0,5 mg) (Gruppe IX) oder mit 0,5 ml FCA (Gruppe X) i.m. immuni-

siert. Alle Hühner wurden 4 und 8 Wochen nach der Erstimmunisierung nach der selben Methode reimmunisiert. Die Injektionsstelle dieser Tiere wurde 12 Wochen nach der letzten Immunisierung makroskopisch beurteilt.

3 Ergebnisse

3.1 Makroskopische Befunde

Die makroskopische Beurteilung der Pektoralismuskulatur ergab nach Applikation von Antigen in 0,9%iger Kochsalzlösung bzw. in Kombination mit MDP oder PCSL keine Auffälligkeiten (Gruppen I, III, IV, VII, IX).

Die ausgeprägtesten Veränderungen waren bei Verwendung von FCA zu beobachten. Am 7. Tag nach Injektion von HSA mit FCA (Gruppe II) fanden sich in der Muskulatur unregelmäßig gestaltete Aufhellungsherde. Ihre Anschnittflächen, deren Größe bis zu etwa 1 cm² aufwies, ließen bei leichter Druckanwendung den Austritt einer öligen Flüssigkeit erkennen. Auch noch 42 Tage nach Immunisierung mit FCA und FIA (Gruppe 5) und am 91. Tag nach einmaliger FCA-Applikation (Gruppe II) waren in der Brustmuskulatur einzelne, weißlich-gelbliche Herde nachweisbar, deren bis zu 1,5×0,5 cm große Anschnittflächen keine Muskelfaserstruktur mehr zeigten.

Ähnliche Herde fanden sich auch 42 Tage nach Applikation von MATP-HSA in Kombination mit FIA (Tier VI).

Bei Verabreichung von FCA zusammen mit den mikrobiellen Antigenen Lactovac® (Gruppe VIII) und Kryptosporidien (Gruppe X) entwickelten sich besonders ausgeprägte entzündliche

Veränderungen. Zum Untersuchungszeitpunkt 12 Wochen nach der letzten Applikation lagen bei allen behandelten Tieren in der Muskulatur miliare bis haselnußgroße Abszesse vor, bei deren Spaltung eine rahmige Flüssigkeit abließ (siehe Tabelle). Die mikrobiologische Untersuchung ausgewählter Abszesse erbrachte keine Hinweise für das Vorhandensein vermehrungsfähiger Keime.

3.2 Histologische Befunde

Nach Immunisierung mit HSA in 0,9%iger Kochsalzlösung (Gruppe I) und in Kombination mit MDP (Gruppe III) zeigten sich am 7. Tag nach der Injektion im *Interstitium* multiple kleinherdige, vorwiegend perivaskulär lokalisierte lymphohistiozytäre Infiltrate mit vereinzelt eingestreuten Plasmazellen (Abb. 1). Als Folge der mechanischen Irritation ließen sich in einzelnen Fällen zusätzlich ein hyalinscholliger Zerfall von Muskelfasern mit Muskelzellproliferationen und Hämosiderinspeicherung in Makrophagen sowie die Ausbildung eines länglichen Fibrosierungsherd nach Art eines in Vernarbung begriffenen Stichkanals beobachten (Abb. 2). In den Gewebeproben, die zu späteren Zeitpunkten untersucht wurden, konnten nach Immunisierung mit HSA in 0,9%iger NaCl keine oder nur einzelne kleinherdige interstitielle mononukleäre Zellinfiltrate festgestellt werden, während sich bei Verwendung von MDP bzw. nach Immunisierung mit MATP-HSA in Kombination mit PCSL nach 48 bzw. 42 Tagen multiple, interstitielle perivaskuläre lymphohistiozytäre Zellansammlungen fanden; plasmazelluläre Reaktionen waren zu diesem Zeitpunkt nicht mehr nachweisbar.

Tabelle: Makroskopische Befunde nach Immunisierung mit Lactovac® bzw. Kryptosporidien unter Verwendung von FCA bzw. PCSL

	Lactovac®/ FCA	Lactovac®/ PCSL	Kryptosporidien/ FCA	Kryptosporidien/ PCSL
o.b.B.	0	8	0	8
Abszess +	0	0	1	0
Abszess ++	3	0	2	0
Abszess +++	5	0	5	0

+ = miliare Abszesse; ++ = bis zu erbsengroße Abszesse; +++ = bis zu haselnußgroße Abszesse

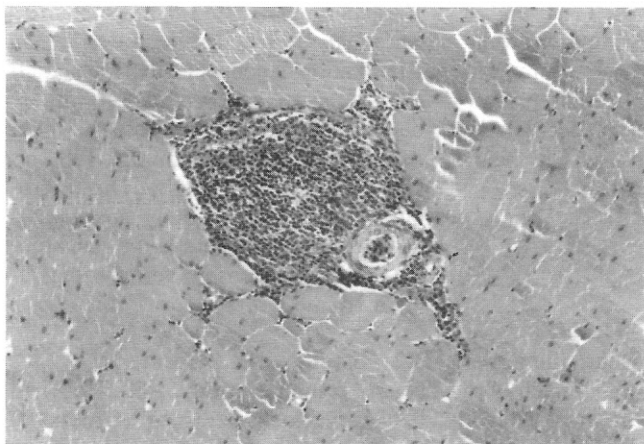


Abbildung 1: Pektoralismuskulatur, Huhn, 7 Tage nach einmaliger i.m. Applikation von HSA in 0,9 %iger NaCl. Interstitielles lympho-histiozytäres Infiltrat. H&E, Primärvergrößerung: $\times 50$.

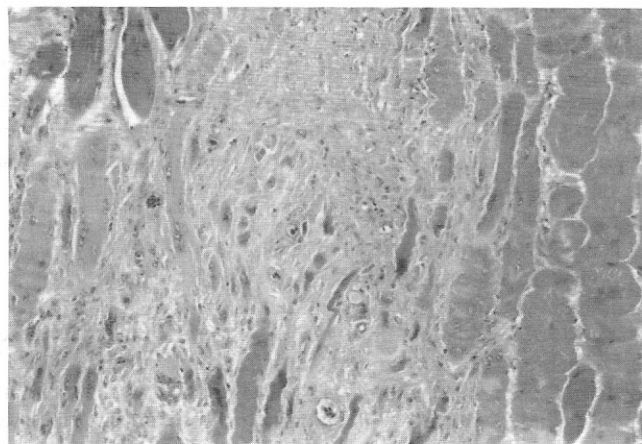


Abbildung 2: Pektoralismuskulatur, Huhn, 7 Tage nach einmaliger i.m. Applikation von HSA in 0,9 %iger NaCl. Herdförmige Fibrosierung im Stichkanal. H&E, Primärvergrößerung: $\times 50$.

Im Gegensatz dazu hatte die Immunisierung unter Verwendung von FCA hochgradige entzündliche Veränderungen an der Injektionsstelle zur Folge.

Am 7. Tag nach der Injektion von HSA mit FCA (Gruppe II) fanden sich in der Muskulatur unterschiedlich große, optisch leere Vakuolen, die sich in der Fettfärbung intensiv rot darstellten. Im Bereich dieser Vakuolen fanden sich ausgeprägte entzündliche Infiltrationen, überwiegend bestehend aus Histiocyten bzw. Epitheloidzellen und häufig siegelringartigen Makrophagen sowie Lymphozyten und Plasmazellen

(Abb. 3). In einzelnen Lokalisationen waren auch pseudoeosinophile Granulozyten zu beobachten. Das Bild wurde ergänzt durch den hyalinscholligen Untergang einzelner Muskelfasern und durch dichte perivaskuläre, betont lymphohistiozytäre Infiltrate. Im weiteren Verlauf (Gruppe II Tag 49 und 91, Gruppe V) entwickelte sich eine ausgedehnte chronisch fibrosierende granulomatöse Myositis. Die Lipidvakuolen waren vorwiegend von Epitheloidzellen, Lymphozyten und Plasmazellen umsäumt. Diese Epitheloidzellgranulome zeigten nicht selten eine

zentrale Nekrose mit Verkalkung, wobei sich häufig Riesenzellen vom Fremdkörpertyp darstellen ließen (Abb. 4). Das Granulationsgewebe war netzartig von faserreichem kollagenen Bindegewebe durchsetzt (Abb. 5). Immunhistochemisch ließen sich zahlreiche IgG-synthetisierende und einzelne IgM-produzierende Plasmazellen darstellen.

Bei Verwendung von FIA in Kombination mit MATP-HSA (Tier VI) wurden ähnliche Lipidvakuolen wie bei FCA festgestellt (Abb. 6); daneben zeigten sich deutliche perivaskuläre

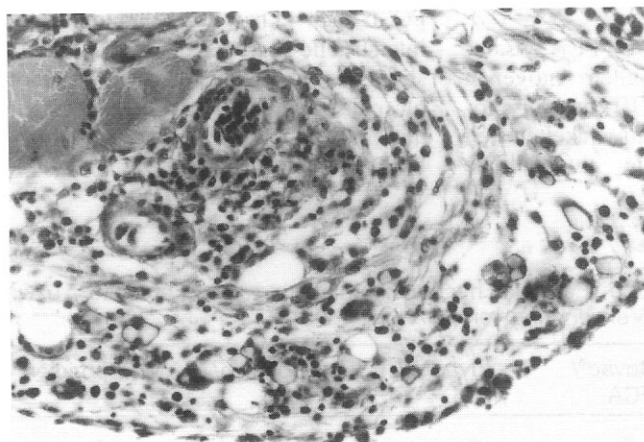


Abbildung 3: Pektoralismuskulatur, Huhn, 7 Tage nach einmaliger i.m. Applikation von HSA in Kombination mit FCA. Herdförmige Myositis unter Beteiligung von Lymphozyten, Plasmazellen und Makrophagen. H&E, Primärvergrößerung: $\times 100$.

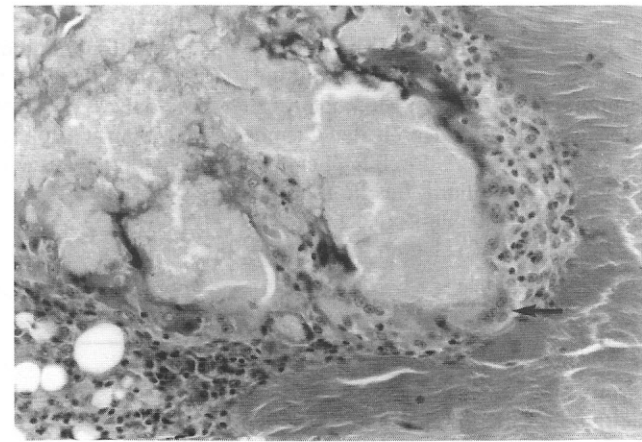


Abbildung 4: Pektoralismuskulatur, Huhn, nach i.m. Applikation von MATP-HSA in Kombination mit FCA und FIA (Gruppe V; 42 Tage nach letztmaliger Injektion) Epitheloidzellgranulom mit zentraler Nekrose und Verkalkung unter Beteiligung von Riesenzellen (Pfeil). H&E, Primärvergrößerung: $\times 100$.

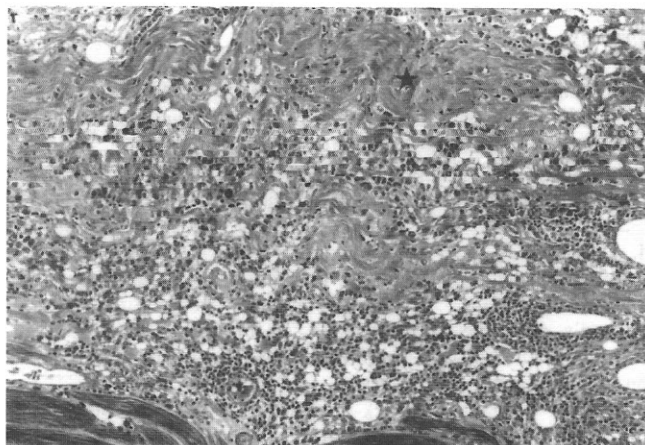


Abbildung 5: Pektoralismuskulatur, Huhn, 91 Tage nach einmaliger i.m. Applikation von HSA in Kombination mit FCA. Chronische granulomatöse Myositis mit Fibrosierung (Stern) im Injektionsbereich. Trichrom-Masson, Primärvergrößerung: $\times 50$.

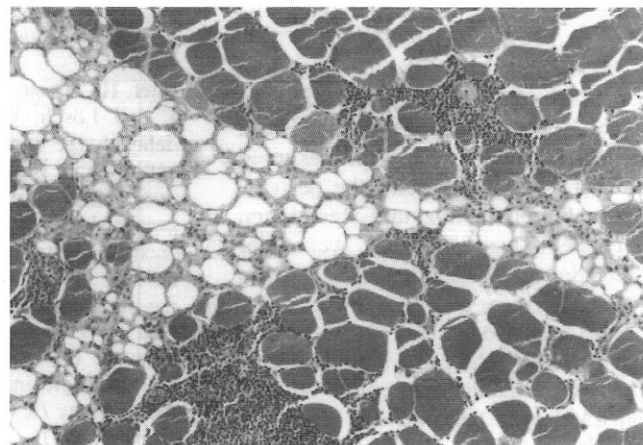


Abbildung 6: Pektoralismuskulatur, Huhn, nach i.m. Applikation von MATP-HSA in Kombination mit FIA (Tier VI; 42 Tage nach letztmaliger Injektion). Chronische interstitielle Myositis mit zahlreichen Lipidvakuolen im Injektionsbereich. H&E, Primärvergrößerung: $\times 50$.

lymphohistiozytäre Infiltrate. Der Grad der entzündlichen Reaktionen im Bereich der Lipidvakuolen, insbesondere die Ausbildung plasmazellulärer Differenzierungen, war allerdings weitaus geringer ausgeprägt.

4 Diskussion

Zur Erzielung ausreichend hoher Antikörpertiter ist beim Huhn wie bei anderen Tierspezies die Verwendung geeigneter Adjuvantien unvermeidbar. Unter Immunadjuvantien versteht man Substanzen, welche die antigenspezifische Immunantwort verstärken, wenn sie zusammen mit einem Antigen verabreicht werden. Ihre Wirksamkeit beruht einerseits auf der Fähigkeit, Antigene im Gewebe zurückzuhalten und kontinuierlich freizusetzen, andererseits auf spezifischen Bestandteilen, welche humorale und zelluläre Immunreaktionen stimulieren und das Monozyten-/Makrophagensystem aktivieren. Aufgrund dieser charakteristischen Eigenschaften sind lokale Entzündungsreaktionen am Ort der Applikation zu erwarten, die im Interesse der betroffenen Tiere auf ein Minimum reduziert werden sollten.

Wie die Immunisierung mit HSA in 0,9%iger NaCl-Lösung zeigt, sind geringgradige, injektionsbedingte Läsionen, wie lokale Blutungen und minimale Narbenbildung im Bereich des

Stichkanals nach intramuskulärer Applikation unvermeidbar. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, daß diese Reaktionen aber keine langanhaltenden Schäden hervorrufen.

Eine besonders gute immunstimulierende Wirkung ist seit langem von FCA bekannt und konnte auch beim Huhn in zahlreichen Untersuchungen dargestellt werden (French et al., 1970; Tam und Benedict, 1975; Fiedler et al., 1981; Löscher et al., 1982; Kühlmann-Rabens et al., 1987). Es vereint durch seinen Gehalt an Mineralöl und abgetöteten Mykobakterien die Fähigkeiten der Antigenretention am Applikationsort und der gleichzeitigen Stimulation von Immunzellen. Entscheidend für die Aufrechterhaltung langanhaltend hoher Antikörpertiter insbesondere in der zweiten Phase der humoralen Immunantwort ist offensichtlich die lokale Antikörperproduktion durch Plasmazellen am Ort der intramuskulären Applikation (French et al., 1970), wie durch den morphologischen Nachweis IgG-synthetisierender Plasmazellen gezeigt werden konnte. Das Vorliegen IgM-immunreaktiver Plasmazellen auch 3 Monate nach einmaliger Applikation von FCA ist als Hinweis für eine andauernde Antigenfreisetzung aus den lokalen Depots zu werten. Wie die vorliegenden Ergebnisse in Übereinstimmung mit French et al. (1970) zeigen, ist auch beim Huhn in Analogie zu anderen Spezies (Amyx, 1987; Bro-

dersen, 1989) nach intramuskulärer Applikation von FCA mit der Ausbildung einer hochgradigen chronischen granulomatösen und teilweise abszedierenden Myositis zu rechnen, auch wenn solche Reaktionen von einzelnen Untersuchern nicht gefunden werden konnten (Gassmann et al., 1990a, b). Unter dem Aspekt des Tierschutzes ist daher zu fordern, die Verwendung von FCA bei der Gewinnung von Hühnerantikörpern soweit als möglich einzuschränken und besser verträgliche Adjuvantien zu entwickeln.

MDP ist als kleinste immunologisch aktive Struktur der mykobakteriellen Zellwand Bestandteil von FCA. Beim Säuger ist je nach Zusammensetzung des verwendeten Präparates eine Steigerung unterschiedlicher immunologischer Reaktionen durch MDP beschrieben worden (Parant, 1979; Parant und Chedid, 1984; Warren und Chedid, 1988). In der vorliegenden Studie, in der MDP in 0,9%iger NaCl-Lösung verabreicht wurde, konnte im Vergleich zur Gruppe I nur eine geringgradig verstärkte entzündliche Reaktion an der Injektionsstelle beobachtet werden. Offensichtlich kommt der nicht metabolisierbaren Mineralölkomponente im FCA eine entscheidende Bedeutung für die Auslösung der beobachteten langanhaltenden lokalen Entzündungserscheinungen zu, während den mykobakteriellen Bestandteilen in erster Linie eine Stimulation von T-

Helferfunktionen zuzuschreiben ist (Tam und Benedict, 1975).

So konnten auch bei Verwendung von FIA, das keine Mykobakterien enthält, noch mehrere Wochen nach der Injektion ähnliche Lipidvakuolen wie bei FCA sowie deutliche perivaskuläre lymphohistiozytäre Reaktionen festgestellt werden, auch wenn der Grad der entzündlichen Alterationen weitaus geringer ausgeprägt war.

Eine neue Generation von Adjuvantien stellen synthetische Abkömmlinge des N-terminalen Lipopeptids aus der Zellwand von *Escherichia coli* dar (Bessler und Jung, 1992). Die ausgezeichnete immunstimulierende Wirkung dieser Lipopeptide konnte nicht nur beim Säuger (Schlecht, 1993; Kleine et al., 1994), sondern auch beim Huhn (Kellner et al., 1992; Erhard et al., 1994; Hofmann et al., 1996) demonstriert werden. Bei Verwendung von PCSL waren in der vorliegenden Studie weder makroskopisch noch lichtmikroskopisch auffällige Veränderungen festzustellen, so daß sich diese neuen Adjuvantien auch beim Huhn als mögliche Alternative zu FCA anbieten. Es bleibt jedoch einzuschränken, daß die hier dargestellten Untersuchungen 6 bzw. 12 Wochen nach der Applikation von Antigen mit PCSL durchgeführt wurden, lokale entzündliche Reaktionen bei der Maus aber nur bis zum 28. Tag nach Injektion von Lipopeptiden nachzuweisen sind (Wiedemann et al., 1991). Weitere morphologische Untersuchungen am Huhn, die zu einem früheren Zeitpunkt stattfinden werden, sollen letztlich auch die Eignung der synthetischen Lipopeptide als tierschonende Adjuvantien beim Huhn endgültig abklären.

Literatur

- Amyx, H. L. (1987). Control of animal pain and distress in antibody production and infectious studies. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 191, 1287–1289.
- Bessler, W. G. und Jung, G. (1992). Synthetic lipopeptides as novel adjuvants. *Res. Immunol.* 143, 548–553.
- Broderson, J. R. (1989). A retrospective review of lesions associated with the use of Freund's adjuvant. *Lab. Anim. Sci.* 39, 400–405.
- Erhard, M. H., Kellner, J., Bessler, W. G. und Lösch, U. (1994). Ein Lipopeptid als Adjuvans zur Immunisierung von Hühnern. *Biochemica-Information* 94, 13–14.
- Fiedler, H., Scheu, M., Kühlmann-Rabens, I. und Lösch, U. (1981). Kinetics of delayed-type hypersensitivity (DTH) reactions and Ig levels in FCA-injected dysgammaglobulinemic B 12 chickens. *Immunobiol.* 158, 293–302.
- French, V. I., Stark, J. M. und White, R. G. (1970). The influence of adjuvants on the immunological response of the chicken: II. Effects of Freund's complete adjuvant on later antibody production after a single injection of immunogen. *Immunology* 18, 645–655.
- Gassmann, M. P., Thoemmes, P., Weiser, T. und Hübscher, U. (1990a). Efficient production of chicken egg yolk antibodies against a conserved mammalian protein. *FASEB J.* 4, 2528–2532.
- Gassmann, M., Weiser, T., Thoemmes, P. und Hübscher, U. (1990b). Das Hühnerei als Lieferant polyklonaler Antikörper. *Schweiz. Arch. Tierheilk.* 132, 289–294.
- Hofmann, A., Erhard, M., Schmidt, P., Bessler, W., Stangassinger, M. und Lösch, U. (1996). Lipopeptide als Adjuvantien bei der Immunisierung von Legehennen. *Altex* (diese Ausgabe).
- Kellner, J., Erhard, M., Schranner, I. und Lösch, U. (1992). The influence of various adjuvants on antibody synthesis following immunization with an hapten. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 373, 51–55.
- Kleine, B., Rapp, W., Wiesmüller, K.-H., Edinger, M., Beck, W., Metzger, J., Ataulkhanov, R., Jung, G. und Bessler, W. G. (1994). Lipopeptide-polyethylene conjugates as mitogens and adjuvants. *Immunobiol.* 190, 53–66.
- Kühlmann-Rabens, I., Wanke, R., Storandt, F., Altmann, U., Lösch, U. und Merckenschlager, M. (1987). Attempts to localize the defect of dysgammaglobulinemia of UM-B19 chickens by studying the effects of immunomodulating substances on immunoglobulin and antibody production. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 14, 123–143.
- Lösch, U., Wanke, R. und Kühlmann, I. (1982). FCA induces a switch from IgM to IgA antibodies in IgG-deficient chickens of the UM B19-line. *Abstracts of the Special FEBS Meeting, Athen*, p. 215.
- Parant, M. (1979). Biologic properties of a new synthetic adjuvant, muramyl dipeptide (MDP). *Springer Semin. Immunopathol.* 2, 101–118.
- Parant, M. und Chedid, L. (1984). Stimulation of non-specific resistance to infections by synthetic immunoregulatory agents. *Infection* 12, 230–234.
- Prass, W., Ringsdorf, H., Bessler, W., Wiesmüller, K. H. und Jung, G. (1987). Lipopeptides of the N-terminus of *Escherichia coli* lipoprotein: synthesis, mitogenicity and properties in monolayer experiments. *Biochim. Biophys. Acta* 900, 116–128.
- Schlecht, S. (1993). Lipopeptide als natürliche Adjuvantien für Impfstoffe aus Gram-negativen Bakterien. *Naturwissenschaften* 80, 9–17.
- Schmidt, P., Kühlmann, R. und Lösch, U. (1988). A competitive inhibition enzyme immunoassay for detection and quantification of organophosphorus compounds. *Z. Naturforsch.* 43c, 167–172.
- Sprick-Sanjose Messing, A. (1990). *Studien zur Adjuvanswirkung beim Haushuhn (Gallus Gallus)*. München: Diss. med.vet.
- Tam, L. Q. und Benedict, A. A. (1975). Elevated 7S immunoglobulin and acute phase proteins in adjuvant injected chickens. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 150, 340–346.
- Warren, H. S. und Chedid, L. (1988). Future prospects for vaccine adjuvants. *CRC Critical Rev. Immunol.* 8, 83–101.
- Wiedemann, F., Link, R., Pumpe, K., Jacobshagen, U., Schaefer, H. E., Wiesmüller, K.-H., Hummel, R.-P., Jung, G., Bessler, W. und Böltz, T. (1991). Histopathological studies on the local reactions induced by complete Freund's adjuvant (CFA), bacterial lipopolysaccharide (LPS), and synthetic lipopeptide (P₃C) conjugates. *J. Pathol.* 164, 265–271.

Korrespondenzadresse

PD Dr. Dr. habil. Peter Schmidt
Institut für Tierpathologie,
Lehrstuhl für Allgemeine
Pathologie und Neuropathologie
Veterinärstr. 13
D-80539 München