

Lipopeptide als nebenwirkungsfreie Adjuvantien zur Immunisierung von Legehennen

M.H. Erhard, A. Hofmann, M. Stangassinger, U. Lösch

Zusammenfassung

Anhand von verschiedenen Parametern wurde ein Vergleich zwischen dem Lipopeptid Pam₃Cys-Ser-(Lys)₄ (PCSL) und dem Freund'schen kompletten Adjuvans (FCA) zu deren adjuvanten und sonstigen Wirkung gezogen. Der Antikörpertiter war abhängig vom Antigen, so daß mit PCSL nur vereinzelt höhere Titer als mit FCA erzielt werden konnten. PCSL zeigte weder Effekte auf die Gesamt-IgG-Konzentrationen im Serum und Eidotter, noch Effekte auf die Korrelationen der spezifischen Antikörper zwischen Serum und Eidotter und rief keine klinischen oder pathologisch-anatomischen Reaktionen hervor. Dagegen wurde durch FCA die IgG-Konzentration in den Serumproben signifikant erhöht. Die höhere Quantität an Antikörpern wurde allerdings nicht in die Eidotter transferiert. FCA führte bei allen immunisierten Legehennen zu massiven pathologischen Veränderungen. PCSL stellt somit in einer Dosierung von 0,25mg bis 0,5mg pro Injektion und Legehenne eine gute Alternative zu FCA dar.

Summary

Lipopeptides as adjuvants for the immunization of laying hens without side effects

The adjuvant and corresponding effects of Pam₃Cys-Ser-(Lys)₄ (PCSL) and Freund's complete adjuvant (FCA) were investigated comparing different parameters. The antibody titer was dependent to the antigen, so only sometimes higher antibody titer could be reached with PCSL compared to FCA. PCSL showed no effects on IgG concentrations in serum and egg yolk, no effects on the correlation of specific antibodies in serum and egg yolk and no effects on clinical and pathological side reactions. IgG concentration was significantly higher in serum samples using FCA. Nevertheless, the higher quantity of antibodies in serum was not transferred into the egg yolk. FCA resulted in massive pathological irritations in all immunized hens. So PCSL seems to be a good alternative to FCA using a dosis of 0,25mg or 0,5mg per injection and hen.

1. Einleitung

In den letzten Jahren wurden Legehennen immer häufiger für die Herstellung von Antikörpern herangezogen. Dies beruht auf der einfachen und billigen Gewinnung der entsprechenden Antikörper über das Ei, in dem große Mengen an Immunglobulin G (100 bis 250mg pro Hühnerei) gefunden werden können (LÖSCH U. et al., 1986; ERHARD M.H., 1995a, 1995b). Da das Haushuhn seine maternalen Antikörper, die für das Küken als passiver Immunschutz in den ersten Lebensstagen dienen, über das Ei überträgt, kann zur Antikörpergewinnung auf die häufigen und für das Spendertier belastenden Blutentnahmen vollständig verzichtet werden.

Die Legehennen müssen zur Herstellung spezifischer Antikörper mit dem entsprechenden Antigen immunisiert werden. Um eine gute Immunantwort zu erreichen, werden neben dem Antigen analog zum Säuger zusätzlich immunstimulierende Substanzen, sogenannte Adjuvantien, verabreicht. Traditionell wird beim Säuger und Haushuhn das Freund'sche komplette Adjuvans (FCA) häufig verwendet, da insbesondere nach der Zweitimmunisierung hohe Antikörpertiter zu erwarten sind. Allerdings sind diese Effekte mit entsprechenden Nebenwirkungen beim Spendertier verbunden. GASSMANN M. et al. (1990) berichteten zwar, daß diese Nebenwirkungen nach Verabreichung von FCA beim Haushuhn nicht zu beobachten sind; andere Autoren konnten jedoch die gleichen Veränderung auch bei dieser Tierart finden (ERHARD M.H. et al., 1995b; WANKE R. et al., 1996).

Deshalb stellt sich aus Tierschutzgründen auch beim Haushuhn die Frage nach alternativen, nebenwirkungsfreien Adjuvantien, um die Belastung der Tiere durch die Immunisierung so gering wie möglich zu halten. In der vorliegenden Arbeit soll beim Haushuhn die adjuvante Wirkung des Lipopeptids Pam₃Cys-Ser-(Lys)₄ (PCSL) im Vergleich zu FCA dargestellt werden.

2. Einfluß der Adjuvantien auf die Gesamt-Immunglobulin G-Konzentrationen in Serum und Eidotter

Vor der Immunisierung mit Rota- und Coronaviren sowie Escherchia coli K99 Pilusantigenen und Kryptosporidien wurden bei 48 Legehennen (Weißes Leghorn, Lohmann, D-Dieburg) die durchschnittliche Immunglobulin G (IgG)-Konzentrationen in Serum (19,8mg/ml) und Eidotter (13,0mg/ml) ermittelt. Nach der Immunisierung blieben unter Verwendung von PCSL (Boehringer Mannheim Biochemica) die IgG-Konzentrationen sowohl im Serum (20,2mg/ml) als auch im Eidotter (13,7mg/ml) konstant. Mit der Applikation von FCA (Sigma, D-Deisenhofen) stieg der Serum-IgG-Wert auf durchschnittlich 26,6mg/ml an, während der Dotter-IgG-Wert (13,5mg/ml) sich nicht erhöhte (Abb. 1).

3. Optimierung der Dosierung des Lipopeptids PCSL

Jeweils drei Hühner wurden mit 1mg MATP₂₄-HSA (24 Moleküle 1,2,2-Trimethyl-propyl-para-amionphenylphosphonat gekoppelt an ein Molekül humanes Serumalbumin) pro Injektion und Huhn im Kombination mit 0,125mg, 0,25mg bzw. 0,5mg PCSL immunisiert. Eine weitere Gruppe erhielt die gleiche Antigenendosis unter Verwendung von FCA (1:2 in physiologischer Kochsalzlösung; 0,6ml pro Injektion und Huhn). Die beiden Boosterungen erfolgten in allen Gruppen im Abstand von vier Wochen nach der letzten Immunstimulation. FCA wurde bei den Boosterungen durch Freund'sches inkomplettes Adjuvans (FIA; Sigma, D-Deisenhofen) ersetzt.

Die optimale Dosierung für PCSL lag bei den MATP-spezifischen Antikörpertitern sowohl im Serum (10878 ELISA-Einheiten) als auch im Dotter (8603 ELISA-Einheiten) bei 0,25mg

pro Injektion und Huhn. Höhere maximale Seruntiterwerte (22087 ELISA-Einheiten) konnten unter Verwendung von FCA/FIA erzeugt werden. Allerdings lagen die Titer der FCA/FIA-Tiere im Dotter (maximal 2741 ELISA-Einheiten) unter den Werten von PCSL (Abb. 2).

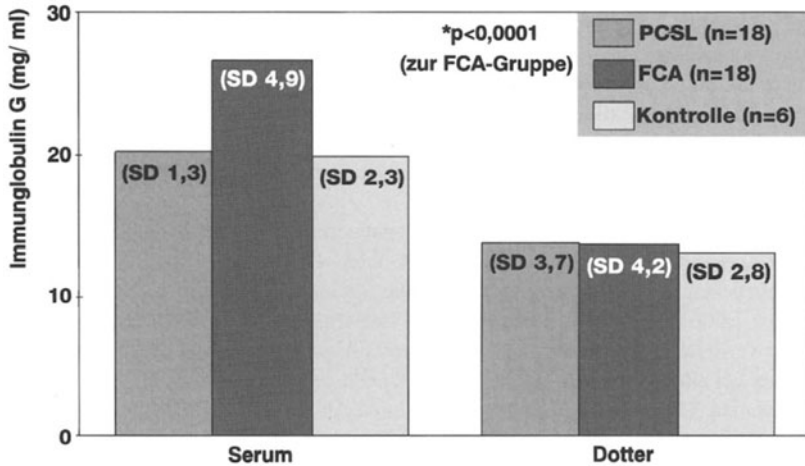


Abb. 1. Immunglobulin G-Konzentrationen in Serum und Eidotter von Legehennen nach der Immunisierung mit Rota- und Coronaviren sowie Escherichia coli K99 Pilusantigen

Während der Immunisierungsperiode wurden insgesamt bei jeweils 8 Legehennen pro Gruppe 18 Blutproben gewonnen. Die Kontrollwerte beschränken sich auf 6 Blutproben

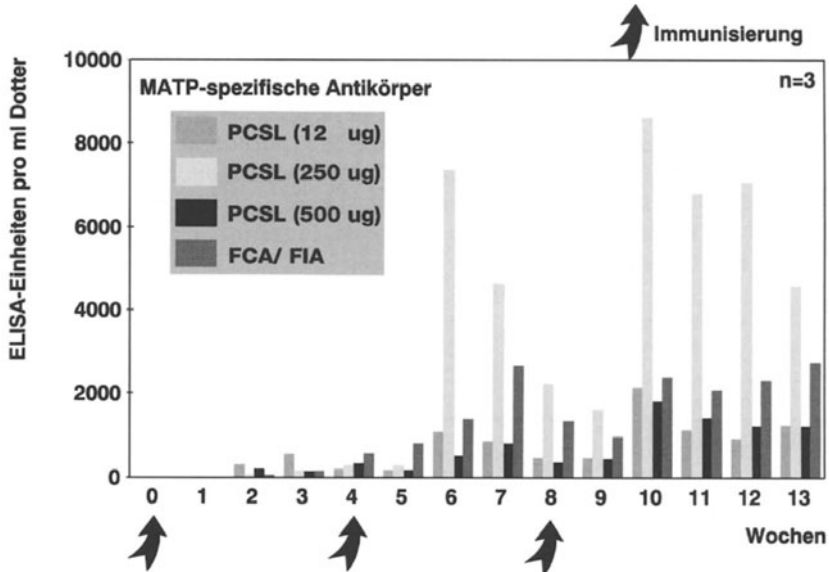


Abb. 2. MTP-spezifische Antikörpertiter im Eidotter nach der Immunisierung mit MTP₂₄HSA unter Verwendung verschiedener Dosierungen von PCSL bzw. nach Applikation von FCA/FIA

4. Vergleich der Antikörpertiter bei Verwendung von PCSL und FCA

Parallel zu den Optimierungsversuchen bezüglich der Dosierung von PCSL wurden jeweils 8 Legehennen mit Rotaviren, Coronaviren und Escherichia coli K99 Pilusantigen (1ml Lactovac®, Hoechst Veterinär GmbH, D-Unterschleißheim) sowie weitere 8 Legehennen pro Gruppe mit Kryptosporidien ($2,5 \times 10^9/0,5\text{ml}$) immunisiert (ERHARD M.H., 1995a). Als Adjuvans wurde PCSL in einer Dosierung von 0,5mg auf 0,5ml physiologische Kochsalzlösung bzw. 0,5ml FCA pro Injektion und Legehennen verwendet. Die Boosterungen erfolgten 4 bzw. 12 Wochen nach der Erstimmunisierung. Der spezifische Antikörpergehalt in den Serum- und Dotterproben wurde mit spezifischen ELISA-Systemen bestimmt (ERHARD M.H., 1995a; MITTERMEIER P., 1995).

In allen Gruppen konnten unabhängig vom verwendeten Adjuvans hohe Titer gegen die verschiedenen Antigene erzeugt werden. Die ELISA-Titer wurden direkt über die Extinktionen bei einer vorgegebenen Vorverdünnung bestimmt. Die Serumverdünnungen lagen in Bereichen von 1:50.000 bis 1:200.000. Mit Ausnahme von Coronavirusantigenen waren bei allen Antigenen die Extinktionswerte bei Verwendung von FCA höher als bei PCSL. Hohe spezifische Antikörpertiter konnten bei allen Antigenen in allen Gruppen erst eine Woche nach der ersten Boosterung gefunden werden. Die zweite Boosterung wurde nach Absinken der Titer acht Wochen nach der ersten durchgeführt. Die Titer entsprachen in der Regel den Werten nach der ersten Boosterung bzw. konnten häufig bei Verwendung von FCA die Werte nach der 1. Boosterung nicht mehr erreichen.

5. Einfluß von PCSL und FCA auf die Korrelationen zwischen Serum- und Dotterantikörpern

Da die Transportzeit für die transovarielle Passage von IgG aus dem Plasma in den Eidotter 5 bis 6 Tage beträgt (PATERSON R. et al., 1962), wurden die Serumproben mit den Dotterproben eine Woche später verglichen. Hinsichtlich der Korrelation zwischen den spezifischen Serum- und Dotterantikörpern konnten keine signifikanten adjuvansabhängigen Unterschiede gefunden werden (Tabelle 1). Die durchschnittliche Korrelation lag bei 0,83 (PCSL) bzw. 0,77 (FCA). Allerdings konnte teilweise bei Verwendung von FCA, wie bereits unter Punkt 3 am Beispiel von MATP gezeigt wurde, im Vergleich zu den Serumwerten ein deutlich niedrigerer Antikörpertiter im Dotter gefunden werden.

Tabelle 1. Adjuvansabhängige Korrelationen (r) der spezifischen Antikörperkonzentrationen zwischen Serum und Eidotter nach der Immunisierung mit verschiedenen Antigenen

Antigene	PCSL	FCA
Rotavirus (n=8)	0,76	0,92
Coronavirus (n=8)	0,86	0,81
E. coli K99 (n=8)	0,76	0,75
Kryptosporidien (n=8)	0,92	0,92
MATP (n=9 bzw. n=3)	0,86	0,44
<i>Mittelwert</i>	<i>0,83 (SD 0,07)</i>	<i>0,77 (SD 0,20)</i>

6. Untersuchung der Nebenwirkungen von PCSL und FCA

Alle immunisierten Legehennen wurden während des Immunisierungszeitraums routinemäßig im wöchentlichen Abstand einer klinischen Untersuchung unterzogen und nach Versuchsende auf makroskopische pathologisch-anatomische sowie teilweise feingewebliche (MATP-HSA immunisierte Hühner) chronische Veränderungen im Bereich der Injektionsstelle überprüft.

Auffällige klinische Symptome konnten bei keinem Tier während des Immunisierungszeitraums festgestellt werden. Die Legeleistung der FCA-Tiere ging kurzfristig zurück (ERHARD M.H. et al., siehe Posterbeitrag in diesem Buch). Außerdem zeigte keines der mit PCSL stimulierten Tiere makroskopische Veränderungen an der Injektionsstelle. Mikroskopisch konnte eine Aktivierung des lymphatischen Gewebes diagnostiziert werden. Dagegen zeigten alle mit FCA/FIA behandelten Tiere hochgradige Veränderungen, die bereits makroskopisch deutlich sichtbar waren. Durch die feingewebliche Untersuchungen konnten die Befunde als diffuse entzündliche Infiltrationen, granulomatöse Myositiden, abszedierende Entzündungsreaktionen mit zentraler Nekrose und randständigen Bindegewebszubildungen präzisiert werden.

7. Diskussion

Für die Immunisierung von Legehennen gelten die gleichen Grundlagen wie beim Säuger. Insbesondere bei schwach immunogenen Antigenen wird zusätzlich zum Antigen ein Adjuvans benötigt. Analog zu anderen Arbeitsgruppen konnte auch von uns eine gute adjuvante Wirkung von FCA beim Haushuhn gefunden werden, wobei die Aussage von GASSMANN M. et al. (1990), die Injektion von FCA beim Huhn führe zu keinerlei entzündlichen Lokalreaktionen, nicht bestätigt werden konnte. Die pathologisch-anatomischen Untersuchungen ergaben fast ausnahmslos hochgradige pathologische Veränderungen bis hin zu haselnußgroßen eitrigen Abszessen. Mit dem Lipopeptid PCSL wurden die maximalen Titer der FCA-Gruppen nur teilweise erreicht. Bei Titerwerten von ca. 1:50.000 kann allerdings eine geringgradige Einbuße leicht hingenommen werden, zumal die Applikation von PCSL bei keinem Huhn zu Nebenwirkungen führte.

Im aviären System kann das Ei als Antikörperquelle herangezogen werden. Für die praktische Anwendung sind deshalb Fragestellungen wie die Gesamtmenge der Immunglobuline im Ei, deren spezifischer Anteil bzw. deren Verteilung sowie der Einfluß einer Immunisierung auf die Korrelationen der Antikörperkonzentrationen in Serum und Dotter von entscheidender Bedeutung. Im Rahmen dieser Studie konnte gezeigt werden, daß während eines Immunisierungsintervalls die Gesamt-IgG-Konzentration im Serum und Eidotter bei Verwendung von PCSL gleich bleibt. Die mit FCA erzielte Erhöhung dürfte neben anderen Wirkungsmechanismen mit den pathologischen Veränderungen in Zusammenhang gebracht werden. Allerdings scheint der rezeptorvermittelte IgG-Transportmechanismus von Plasma in den Eidotter hinsichtlich der Kapazität begrenzt zu sein. Dies könnte als Erklärung für die unterschiedlichen Titer in Serum und Eidotter herangezogen werden, die insbesondere bei Verwendung von FCA auftraten.

Somit kann abschließend festgestellt werden, daß mit dem Lipopeptid PCSL eine gute, nebenwirkungsfreie Alternative zu FCA zur Verfügung steht.

Dieses Vorhaben wurde mit Unterstützung des Bundesministeriums für Bildung und Forschung (BMBF) durchgeführt.

Literatur

- ERHARD M.H., Dotterantikörper als Alternative zu Serumantikörpern, in: SCHÖFFL H., SPIELMANN H., TRITTHART H.A. (Hrsg.), Ersatz- und Ergänzungsmethoden zu Tierversuchen, Band III, Forschung ohne Tierversuche 1995, Wien New York: Springer-Verlag, 314-319, 1995a
- ERHARD M.H., Polyklonale und monoklonale Antikörper in der Diagnostik, Therapie und Prophylaxe: Ein Beitrag zur Herstellung, Charakterisierung und Anwendung, Habilitationsschrift (Vet.med.), München, 1995b
- GASSMANN M., WEISER T., TOMMES P., HÜBSCHER U., Das Hühnerei als Lieferant polyklonaler Antikörper, Schweiz. Arch. Tierheilk., 132, 289-294, 1990
- LÖSCH U., SCHRANNER I., WANKE R., JÜRGENS L., The chicken egg, an antibody source, J. Vet. Med. B, 33, 609-619, 1986
- MITTERMEIER P., Das Lipopeptid Pam₃Cys-Ser-(Lys)₄ - eine Alternative zu Freund'schem komplettem Adjuvans bei der Immunisierung von Legehennen zur Gewinnung von Dotterantikörpern, Vet.med. Diss., München, 1995
- PATTERSON R., YOUNGER J.S., WEIGLE W.O., DIXON F.J., Antibody production and transfer to egg yolk in chickens, J. Immunol., 89, 272-278, 1962
- WANKE R., SCHMIDT P., ERHARD M.H., SPRICK-SANJOSE MESSING A., STANGASSINGER M., SCHMAHL W., HERMANN W., Freund'sches komplettes Adjuvans beim Huhn; effiziente Immunstimulation bei gravierender lokaler inflammatorischer Reaktion, J. Vet. Med. A, 1996, in Druck