©Österr. Ges. f. Tropenmedizin u. Parasitologie, download unter www.biologiezentrum.at

Mitt. Österr. Ges. Tropenmed. Parasitol. 8 (1986) 135–140

Abteilung für Med. Parasitologie (Leiter: Univ.-Prof. Dr. H. Aspöck)
des Hygiene-Instituts (Vorstand: Univ.-Prof. Dr. H. Flamm) der Universität Wien

Untersuchungen über den Nachweis von IgY-Antikörpern gegen Toxoplasma gondii in Eiern experimentell immunisierter Hühner

A. Haßl, H. Aspöck

Einleitung

Die zur Herstellung verschiedener Serotests (wie z. B. Präzipitationsreaktionen, Methoden zum Nachweis zirkulierender Antigene) benötigten spezifischen Antikörper können, alternativ zur üblichen Herstellungsweise aus Hyperimmunseren, auch aus Eiern immunisierter Hennen gewonnen werden. Die Isolierung der IgY-Antikörper aus den Eidottern kann dabei die Arbeit bei der Testdurchführung erheblich erleichtern (GOTTSTEIN und HEMMELER 1985). Diesen Vorteil wollten wir für den Aufbau eines Nachweisverfahrens für zirkulierendes Toxoplasma-Antigen nutzen. Die Präparation spezifischer, gegen *Toxoplasma gondii* gerichteter IgY-Antikörper sollte die Möglichkeiten und die Grenzen der Verwendung dieser Antikörperklasse in der Toxoplasmose-Serologie aufzeigen. Wir bestimmten daher die Quantität und die Qualität aus Eidottern isolierter, gegen Toxoplasma gerichteter IgY-Antikörper und verglichen Eigenschaften dieser Antikörper mit jenen von spezifischen IgG-Antikörpern aus Kaninchenseren.

Material und Methoden

Drei, ca. 12 Wochen alte Hennen (Stamm: Derco-braun), gegen Marek-Lähme geimpft, wurden auf Einstreu gehalten und mit Pelletfutter (Tagger 21–3) und Wasser ad libitum ernährt. Nach Beginn der Eilegeperiode wurden die Serumantikörpertiter der Hennen gegen *Toxoplasma gondii* mittels eines IHA (Cellognost Toxoplasmosis, Behring, Marburg, BRD) ermittelt, der Titerverlauf wurde in gleicher Weise während der ganzen Versuchsperiode verfolgt. Die Hennen wurden mit je 1 mg wasserlöslichen Toxoplasma-Antigen (gewonnen durch Ultraschallzerstörung von Trophozoiten des BK-Stammes), verstärkt durch Freundsches Adjuvants, intramuskulär immunisiert (Tag 0), die Antikörperantwort wurde durch Boosterungen am 9. und 29. Tag p.i. verstärkt.

Die Eier der Hennen wurden vom 16. bis zum 56. Tag p.i. ein Mal täglich aufgesammelt, gewogen und anschließend bei 4°C gelagert. In Gruppen von je 3 bis 8 Stück zusammengefaßt wurden die Eier nach der Methode von POLSON et al. (1980) verarbeitet. Die mit Polyäthylenglykol (MW 6000) präzipitierten IgY-Antikörper wurden in PBS (0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,2; 5 ml Puffer/Eidotter) resuspendiert; den Antikörpertiter der Lösung bestimmten wir mittels IHA. Dann wurden die einzelnen Antikörperlösungen gemischt und anschließend wurde der Eiweißgehalt dieses Pools mittels einer Proteinbestimmung (Bio-Rad, Wien) bestimmt.

©Österr. Ges. f. Tropenmedizin u. Parasitologie, download unter www.biologiezentrum.at

Zwei ml der Proteinlösung wurden einer Gelfiltration mit Sephacryl S-300 unterzogen (Säulendimension: 60 × 1,6 cm, Flüssige Phase: PBS, Durchfluß: 10 ml/cm²/h, Extinktionsablesung bei 280 nm). Es wurden Fraktionen von Proteinen gleichen Molekulargewichts gesammelt, auf das Ausgangsvolumen eingeengt, und auf ihren Gehalt an spezifischen Antikörpern im IHA gestestet.

Zwei konventionell gehaltene Kaninchen ohne Serumantikörper gegen *Toxoplasma gondii* (getestet im IHA) wurden nach dem gleichen Schema wie die Hennen immunisiert. Am 40. Tag p.i. wurden ihnen kardial je 15 ml Blut abgenommen. Nach dem Mischen der Seren wurde im IHA der Antikörpertiter bestimmt (1:64 000).

In einer Geldiffusion nach Ouchterlony (1% Agarosegel) wurden Antiserum und IgY-Lösung gegen lösliches Toxoplasma-Antigen (Stamm: BK, ultraschallzerstörte Trophozoiten, Proteingehalt: 5 mg/ml) getestet. Nach 48 Stunden Inkubationszeit bei 20° C und nach dem Waschen des Gels in PBS wurden die Banden mit Coomassie Blue (Serva, Heidelberg, BRD) gefärbt.

Ergebnisse

Vom 17. Tag p.i. bis zum 56. Tag p.i. wurden 96 Eier mit einem durchschnittlichem Gewicht von 65 g gesammelt. Aus ihnen konnte 478 ml IgY-Antikörperlösung produziert werden, die 47 mg Protein per ml enthielt und deren Antikörpertiter im IHA eine Verdünnungsstufe von 1:16 000 erreichte. Details zum Versuchsverlauf sind aus Abb. 1 zu entnehmen.

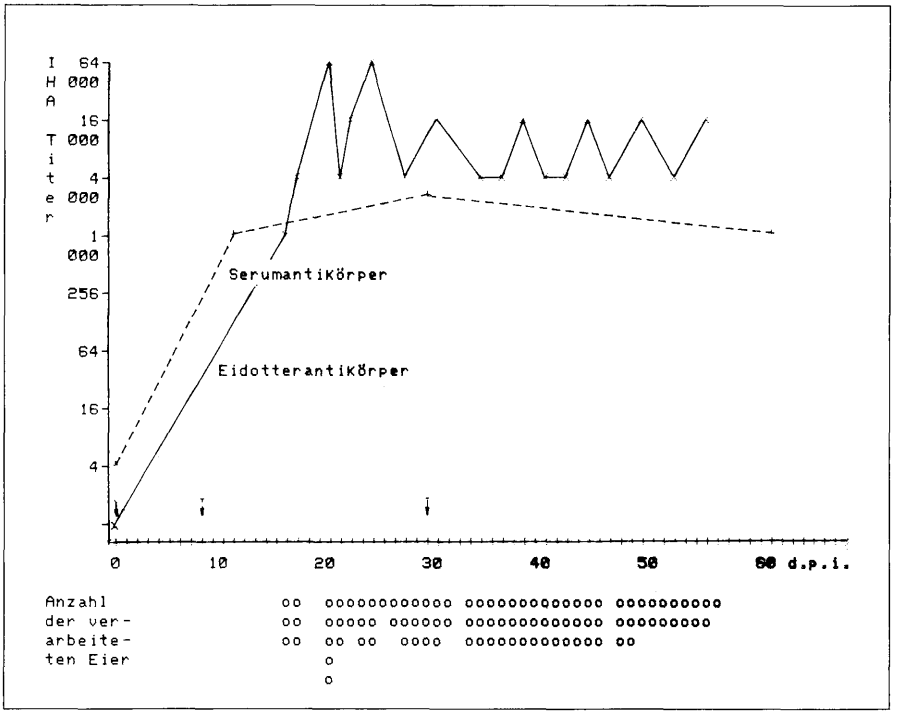


Abb. 1: Verlauf der Immunantwort (Durchschnittswerte) und Anzahl der gelegten Eier nach Immunisierung von 3 Hennen mit *Toxoplasma-gondii*-Antigen (o = Ei, ↓ = Immunisierung oder Boosterung)

©Österr. Ges. f. Tropenmedizin u. Parasitologie, download unter www.biologiezentrum.at

Diese IgY-Lösung konnte in der Gelfiltration in zwei Proteinfraktionen unterschiedlichen Gewichts zerlegt werden, wobei nur die Fraktion der leichteren Proteine nach der Filtration und nach Einengung wieder den Ausgangstiter im IHA erreichte, während die erste Fraktion, die der schwereren Proteine, eine vernachlässigbar geringe Antigenbindungsfähigkeit (Titer 1:256) aufwies. Durch Integration der in Abb. 2 gezeigten Kurven ergibt sich ein Verhältnis des Proteingehalts der beiden Fraktionen von 1:2,3.

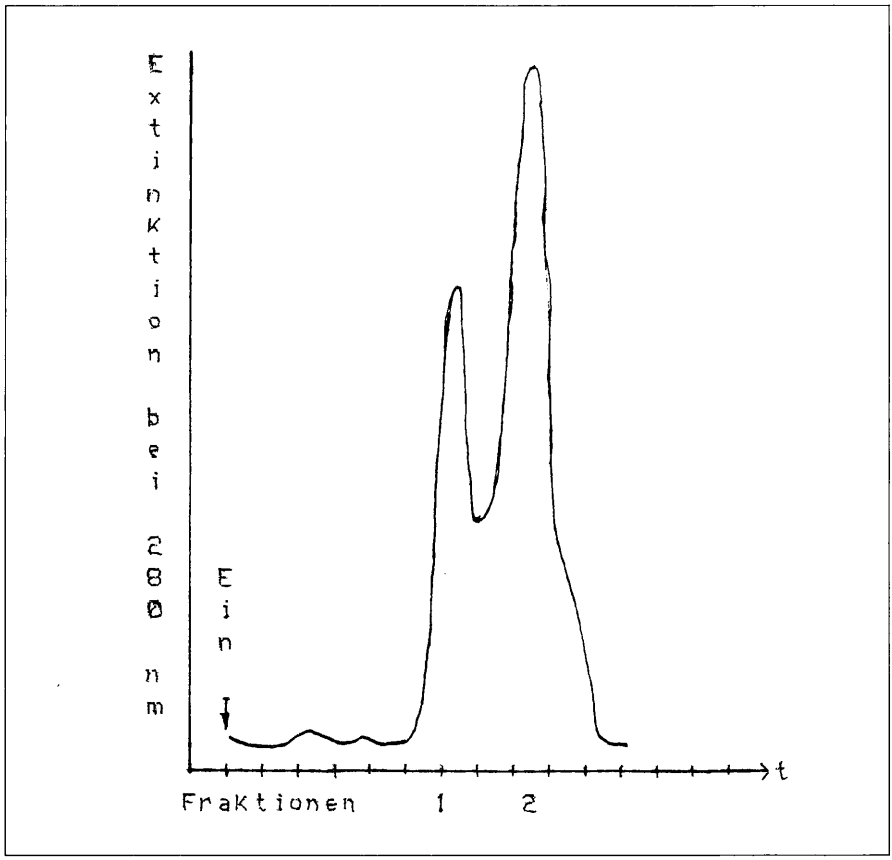


Abb. 2: Gelfitration der IgY-Antikörper

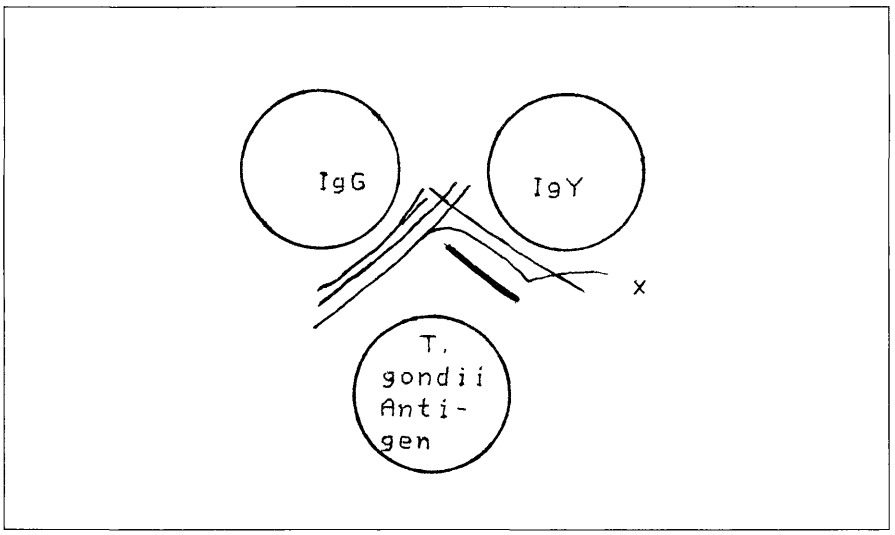
Aus Abb. 3 ist das Muster der Präzipitationsbanden im Gel-Diffusionstest ersichtlich. *Toxoplasma-gondii*-Antigen wird sowohl vom Kaninchen-Antiserum als auch von den spezifischen IgY-Antikörpern in mehreren, voneinander unabhängigen Banden präzipitiert, nur ein Antigenteil wird von beiden Antikörpern gleichartig gebunden.

Diskussion

Spezifische IgY-Antikörper aus den Eiern experimentell immunisierter Hühner wurden bereits vor mehreren Jahren von verschiedenen Autoren als Reagenzien in Serotests genutzt (VIEIRA et al. 1984; GOTTSTEIN und HEMMELER 1985); die Möglichkeiten ihrer Verwendung in der Toxoplasmose-Serologie wurden jedoch noch nicht überprüft.

©Österr. Ges. f. Tropenmedizin u. Parasitologie, download unter www.biologiezentrum.at

Unsere Untersuchungen belegen in vollem Einklang mit Ergebnissen anderer Autoren (POLSON et al. 1980; GOTTSTEIN und HEMMELER 1985), daß unter Benutzung gleicher Immunisierungsschemata von Kaninchen und Hühnern ungefähr die gleiche Menge an spezifischen Antikörpern aus den Eiern wie auch aus dem Serum isoliert werden kann. Der entscheidende Vorteil der IgY-Herstellung ist jedoch die leichtere Pflege und Handhabung der Hühner verglichen mit dem Umgang mit Säugetieren. Besonders bei Bedarf an größeren Mengen von spezifischen Antikörpern erweist sich das IgY-Modell als überlegen, da Schäden an den Versuchstieren durch die notwendigen, regelmäßigen Blutabnahmen nicht auftreten können.



x = Bande unklarer Herkunft

Abb. 3: Geldiffusionstest

In unserer Untersuchung wollten wir zudem die Möglichkeit einer über die Präzipitation mit PEG hinausführenden Reinigung der IgY-Antikörper prüfen. Da einerseits das Molekulargewicht der IgY-Antikörper beschrieben ist (165 kD, POLSON et al. 1980), uns andererseits Reinigungsschritte durch affine Bindungen nicht bekannt sind, wählten wir die Gelfiltration als Trennverfahren. Mit ihrer Hilfe konnten wir ca. 30% der Proteine als unspezifische Verunreinigung abtrennen und verwerfen, ohne einen nennenswerten Verlust an spezifischen Antikörpern in Kauf zu nehmen.

Wie im Diffusionstest zu erkennen ist, binden die IgY-Antikörper weitgehend andere Toxoplasma-Antigenkomponenten als das Antiserum aus den Kaninchen. Dies ist bemerkenswert, da beide Versuchstierarten nach dem gleichen Schema immunisiert wurden. GOTTSTEIN und HEMMELER (1985) haben bei ähnlichen Versuchen mit Echinococcus-Antigen zwar auch nicht völlige, aber weitgehende Übereinstimmung gefunden. Worauf diese unterschiedlichen Reaktionen von Hühnern und Kaninchen gegenüber den beiden Parasitenantigenen beruhen, bleibt noch offen; möglicherweise spielen neben der Anzahl der involvierten Parasitenepitope auch Verunreinigungen durch Wirtsantigene eine Rolle. Das Zustandekommen der mit x gekennzeichneten Präzipitationslinie in Abb. 3 ist unklar; Tatsache ist, daß sie auch bei Wiederholung des Tests in identischer Ausprägung auftrat.

©Österr. Ges. f. Tropenmedizin u. Parasitologie, download unter www.biologiezentrum.at

Die Produktion spezifischer IgY-Antikörper gegen *Toxoplasma gondii* aus Eiern stellt somit zwar eine arbeitstechnisch günstige Alternative zur Herstellung spezifischer IgG-Antikörper dar. Da diese im Huhn produzierten Antikörper jedoch offenbar mit anderen Antigenen reagieren als die derzeit routinemäßig verwendeten Antikörper aus Kaninchen, sind Serotests mit den beiden Antikörperklassen nicht gleichwertig. Daher ist ein Ersatz von IgG-Antikörpern durch IgY-Antikörper in bestehenden Serotests nicht ohne gleichzeitige Überprüfung der Aussagekraft des Testsystems möglich. Weitere, detailliertere Untersuchungen müssen klären, welcher Stellenwert den IgY-Antikörpern in der Toxoplasmose-Serologie zukommen kann.

Zusammenfassung

Legehennen wurden mit wasserlöslichem *Toxoplasma-gondii*-Trophozoitenantigen immunisiert und die Eier über einen Zeitraum von 40 Tagen gesammelt. Aus den Dottern wurden die IgY-Antikörper isoliert und in einer Gelfiltration von Begleitproteinen abgetrennt. In einem Geldiffusionstest wurden Präzipitationsmuster zwischen Toxoplasma-Antigen und IgY-Antikörpern bzw. IgG-Antikörpern aus Kaninchen ermittelt und miteinander verglichen.

Die wesentlichen Vorteile der Herstellung spezifischer IgY-Antikörper liegen im geringeren Arbeitsaufwand gegenüber einer Produktion spezifischer IgG-Antikörper in Säugetieren. Sie stellen durch den Wegfall der Blutabnahme überdies eine Alternative zum Tierversuch dar. Ein beträchtlicher Nachteil der gegen *Toxoplasma gondii* gerichteten IgY-Antikörper ist jedoch dadurch gegeben, daß sie mit anderen Antigenen reagieren als die aus Kaninchen gewonnenen IgG-Antikörper. Die Möglichkeiten des Ersatzes konventioneller Antiseren durch IgY-Antikörper für die Toxoplasmose-Serologie müssen daher erst durch weiterführende Untersuchungen geklärt werden.

Summary

Experimental studies on the demonstration of egg-yolk immunoglobulin Y against Toxoplasma gondii

Hens were immunized with aqueous extracts of *Toxoplasma gondii* trophozoites, eggs were collected, and egg yolk IgY-antibodies were isolated by PEG precipitation. Gel filtration was done for separation of antibodies from residues. In an Ouchterlony-test Toxoplasma-antigen was precipitated with IgY-antibodies on one hand and conventionally raised rabbit IgG-antibodies on the other, and the precipitation lines were compared.

The production of specific IgY-antibodies offers important advantages particularly with regard to modern animal protection regulations and work facilitation. Nevertheless, a considerable disadvantage is that different antigen constituants are precipitated by IgY- and IgG-antibodies. Thus the use of egg yolk IgY as an alternative source of specific antibodies for serology of toxoplasmosis needs further investigations.

Literatur

GOTTSTEIN, B., HEMMELER, H. (1985): Egg yolk immunoglobulin Y as an alternative antibody in the serology of echinococcosis. Z. Parasitenkd. 71, 273–276.

©Österr. Ges. f. Tropenmedizin u. Parasitologie, download unter www.biologiezentrum.at

POLSON, A., WECHMAR, B. von, REGENMORTEL, M. van (1980): Isolation of viral IgY antibodies from yolks of immunized hens. Immunol. Commun. 9, 475–493.

VIEIRA, J. G., OLIVEIRA, M., RUSSO, E., MACIEL, R., PEREIRA, A. (1984): Egg yolk as a source of antibodies from human parathyroid hormone (hPTH) radioimmunoassay. J. Immunoassay 5, 121–129.

KORRESPONDENZADRESSE:

Dr. A. Haßl
Hygiene-Institut der Universität Wien
Abteilung für Medizinische Parasitologie

Kinderspitalgasse 15
A-1095 Wien

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: Mitteilungen der Österreichischen Gesellschaft für Tropenmedizin und Parasitologie

Jahr/Year: 1986

Band/Volume: 8

Autor(en)/Author(s): Hassl Andreas R., Aspöck Horst

Artikel/Article: Untersuchungen über den Nachweis von IgY-Antikörpern gegen Toxoplasma gondii in Eiern experimentell immunisierter Hühner. 135-140