

E. Zusammenfassung

Das Immunsystem der Wirbeltiere besteht aus dem unspezifischen und spezifischen adaptiven Anteil, wobei letzterer in die humorale und zellvermittelte Abwehr unterteilt wird. Um die Ontogenese des Immunsystems der Ente zu untersuchen, wurden in den vorliegenden Untersuchungen die unspezifische zelluläre Zytotoxizität des Vollbluts, die Immunglobulinkonzentrationen im Serum, die Anzahl Immunglobulin-positiver Zellen in verschiedenen lymphatischen Organen und zellvermittelte Immunreaktionen von 15- und 22-tägigen Entenembryonen und Enten im Alter von 3 Tagen bis zur 16. Woche ermittelt.

Die unspezifische zelluläre Immunabwehr des Vollblutes wurde im Zytotoxizitätstest unter Verwendung von *Saccharomyces cerevisiae* (Sc) ermittelt. An 22-tägigen Embryonen wurde eine niedrige Sc-Zytotoxizität (1,10%) festgestellt, während im Blut von 15-tägigen Embryonen keine Sc-Zytotoxizität nachgewiesen wurde. Die Sc-Zytotoxizität bei Enten im Alter von 3 Tagen bis 16 Wochen lag zwischen 17,25% und 21,25%. Es ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen diesen Altersstufen ($p > 0,05$), aber zwischen Embryonen und Enten nach dem Schlupf ($p < 0,01$).

Um monospezifische Antisera gegen Immunglobuline der Ente herzustellen, deren Konzentration zu messen und Immunglobulin-positive Zellen in verschiedenen Organen zu identifizieren, wurden IgM, IgY und IgY(Δ Fc) der Enten durch Chromatographie an Sephacryl S-300 und mittels Ionenaustausch-Chromatographie an DEAE₃₂ gereinigt und μ -, ν - und $\nu(\Delta$ Fc)-Ketten elektrophoretisch (SDS-PAGE) isoliert. In der Immunelektrophorese erwiesen sich die resultierenden Antisera als spezifisch für die jeweiligen Ketten. Im Western-Blot erwies sich das Antiserum gegen μ -Ketten monospezifisch, während das Antiserum gegen ν -Ketten eine schwache Kreuzreaktion mit $\nu(\Delta$ Fc)-Ketten und dem Antiserum gegen $\nu(\Delta$ Fc)-Ketten eine schwache Kreuzreaktion gegen μ -Ketten sowie eine starke Reaktion mit ν -Ketten zeigte.

Die Bestimmung der Konzentrationen der Immunglobulinfractionen im Serum erfolgte durch einfache radiale Immundiffusion. Bei 15- und 22-tägigen Embryonen sowie 3-tägigen Enten wurde lediglich IgY in Konzentrationen von 0,04 mg/ml, 0,37 mg/ml und 5,18 mg/ml nachgewiesen. Bei 2-wöchigen Enten wurde eine IgY-Konzentration von 1,15 mg/ml gemessen, und die Werte stiegen bis zur 12. Woche kontinuierlich an. Bei 14- und 16-wöchigen Enten betragen die Konzentrationen 4,26 und 4,54 mg/ml. IgM wurde erst bei 2-wöchigen Enten gefunden (1,10 mg/ml), die Konzentration erhöhte sich von 0,87 über 1,58 auf 2,11 mg/ml bei 8-wöchigen Enten. Im Alter von der 10. bis zur 16. Woche schwankten die IgM-Konzentrationen zwischen 1,78 und 2,32 mg/ml. Die Gesamtmenge der Immunglobuline wurde aus den IgY- und IgM-Konzentrationen errechnet. Sie betragen für IgY 15-tägiger Embryonen 0,03 mg/ml, 22-tägiger Embryonen 0,37 mg/ml und bei 3-tägigen Enten 5,18 mg/ml. Anschließend

nahmen diese Werte von 2,27 über 2,76 auf 4,63 mg/ml bei 2- bis 6-wöchigen Enten zu und lagen bei 8- bis zur 16-wöchigen Enten zwischen 5,63 und 6,36 mg/ml (2 bis 16. Woche, IgY und IgM).

Die Immunglobulin-positiven Zellen wurden mit Hilfe der indirekten Immunperoxidase-Methode identifiziert. IgM- und IgY-positive Zellen wurden zuerst in der Bursa Fabricii und Milz 22-tägiger Embryonen festgestellt. Vereinzelt wurden sie auch im Thymus, der Darmwand (nur IgM) und in den Harderschen Drüsen (nur IgM) gefunden. Auch bei 3-tägigen Enten wurden IgY- und IgM-positive Zellen in den oben genannten Organen nachgewiesen. Ihre Zahl nahm vom 3. Tag bis zur 4. Woche, abgesehen vom Thymus, deutlich zu. Bei quantitativen Untersuchungen an Bursa Fabricii-Präparaten zeigte sich, daß die Zahl der IgM-positiven Zellen von 81 über 117 auf 250 Zellen pro Follikel ansteigt (22-tägige Embryonen, 3-tägige und 2-wöchige Enten) und in den weiteren 14 Wochen langsam bis zu 195 Zellen pro Follikel abnahm. Die Zahl IgY-positiver Zellen erhöhte sich von 73 über 106 und 142 auf 157 Zellen pro Follikel (22-tägige Embryonen, 3-tägige, 2-wöchige und 4-wöchige Enten) und lag in der 8. und 16. Wochen bei 209 und 195 Zellen pro Follikel.

Der Leukozytentransformationstest (LTT) unter Verwendung von MTT ist eine Alternative des LTT zur Verwendung von Isotopen z. B. ^3H -Thymidin. Um diese Methode bei Enten einsetzen zu können, wurden zunächst die optimalen Testbedingungen ermittelt. In Vorversuchen wurden zunächst die Versuchsbedingungen optimiert. Als am besten geeignetes Mitogen erwies sich PHA in einer Konzentration von 7,2 $\mu\text{g/ml}$ Medium, eine Zelldichte von $7,5 \times 10^6$ Zellen/ml, ein Zusatz von 1% Hühnerserum zum Medium, 72 Stunden Inkubation mit PHA, und für MTT eine Konzentration von 0,34 mg/ml sowie 90%iges Ethanol als Lösungsmittel.

Unter diesen Testbedingungen wurde die Zellproliferation von peripheren Blutleukozyten der Enten im Alter von 2 bis zur 16 Wochen untersucht. Bei 2- bis 6-wöchigen Enten wurden Proliferationsraten von 50,2% – 212,3% ermittelt (Abb. 40). Die Proliferationsrate blieb bei Enten im Alter von 8 bis zur 16 Wochen im Bereich von 193,0% bis 281,0%.

Die erzielten Untersuchungsergebnisse liefern erstmalig Informationen über die mittels LTT-MTT gemessene afferente Phase zellulärer Immunreaktionen *in-vitro*, über die Ontogenese der Phagozytosefähigkeit des Vollblutes, sowie zur Ontogenese und Peripherialisierung Ig-positiver Zellen bei Enten. Die Untersuchungsergebnisse sind Grundlage weiterer, auch klinischer, Applikationsmöglichkeiten zur Bestimmung der Immunkompetenz von Enten.

Juwei Wang (1998):

Investigations on the ontogeny of cellular and humoral immune functions of the duck.

Summary

The immune system of vertebrates is composed of the nonspecific and specific adaptive system, whereby the latter is subdivided in the humoral and cell-mediated immune system. In order to examine the ontogeny of the immune system of duck, the nonspecific cytotoxicity of the whole blood, the concentration of immunoglobulins in the serum (IgY and IgM), the presence and proportion of immunoglobulin-positive cells in different lymphatic tissues and the cell-mediated immunity were determined in 15- and 22-day-old embryos and ducks (3 days up to 16 weeks).

The nonspecific cellular immune defence of whole blood was determined in the cytotoxicity test employing against *Saccharomyces cerevisiae* (Sc) as target. In 22-day-old embryos, a low Sc-cytotoxicity (1.10%) was detected, whereas no Sc-cytotoxicity was seen in the blood of 15-day-old embryos. The Sc-cytotoxicity of ducks (3 days to 16 weeks old) varied between 17.25% and 21.25%. There were no significant differences between these age-groups ($p > 0.05$), but between embryos and ducks after hatching ($p < 0.01$).

For production of monospecific antisera against the immunoglobulins of the duck, and to measure their concentrations and detection of immunoglobulin-positive cells, IgM, IgY and IgY(Δ Fc) were purified chromatographically in Sephacryl S-300 and DEAE₁₂ columns, and μ -, ν - and $\nu(\Delta$ Fc)-chains were isolated by electrophoresis (SDS-PAGE). These antisera were shown to be immunoelectrophoretically specific for the respective chains. In immunoelectrotransfer (Western blot), the antiserum against μ -chains proved to react monospecifically, while the antiserum raised against ν -chains cross-reacted weakly with $\nu(\Delta$ Fc)-chains. The antiserum against $\nu(\Delta$ Fc)-chains cross-reacted weakly with μ -chains as well as distinctly with ν -chains.

The concentrations of immunoglobulin-fractions in the serum were determined by single radial immunodiffusion. In 15- and 22-day-old embryos as well as in 3-day-old ducks, only IgY was found in the concentrations of 0.04 mg/ml, 0.37 mg/ml and 5.18 mg/ml. In 2-week-old ducks, the concentration of IgY was 1.15 mg/ml, and the IgY values increased up to the 12th week continuously. In 14- and 16-week-old ducks, the concentrations were 4.26 and 4.54 mg/ml, respectively. IgM was found first in 2-week-old ducks (1.10 mg/ml), thereafter the concentration increased from 0.87 over 1.58 to 2.11 mg/ml (4-, 6- and 8-week-old ducks). At the age of 10 to 16 weeks, the concentration of IgM ranged between 1.78 and 2.32 mg/ml. The total immunoglobulins were calculated from the concentrations of IgY and IgM. The concentrations in 15- and 22-day-old embryos as well as 3-day-old ducks were 0.03 mg/ml, 0.37 mg/ml and

5.18 mg/ml (IgY only), and increased from 2.27 over 2.76 to 4.63 mg/ml in 2- to 6-week-old ducks (IgY and IgM). The values ranged between 5.63 and 6.36 mg/ml in 8- to 16-week-old ducks (IgY and IgM).

Immunoglobulin-positive cells were identified by indirect immunoperoxidase technique. IgM- and IgY-positive cells were first detected in the bursa of Fabricius and spleen of 22-day-old embryos, and were sporadically also found in thymus, in the intestinal wall (IgM only) and in the Harderian glands (IgM only). At 3 days, IgY- and IgM-positive cells were easily identified in the tissues mentioned above. Their number increased from the 3rd day up to 4th week, except in the thymus. In the sections of the bursa of Fabricius, the number of the IgM-positive cells rose from 81 over 117 to 250 cells per follicle (22-day-old embryos, 3-day- and 2-week-old ducks, respectively). In the following 14 weeks, they declined slowly to 195 cells per follicle. The number of IgY-positive cells increased from 73 to 106 and 142 up to 157 cells per follicle (22-day-old embryos, 3-day-, 2- and 4-week-old ducks) and was 209 and 195 cells per follicle in 8th and 16th week.

The leukocyte transformation assay (LTA) employing MTT is an alternate approach for the conventional LTT employing radio-isotopes such as tritiated thymidine. To apply this method to ducks, the test conditions were optimised. For best reactivity the mitogen PHA was employed in a concentration of 7.2 µg/ml, a cell density of 7.5×10^6 cells/ml, 1% chicken serum in the medium, 72 hours incubation period, and MTT in a concentration of 0.34 mg/ml, and 90% ethanol as solvent.

Under these conditions, the proliferation of peripheral blood leukocytes was examined in 2- up to 16-week-old ducks. In 2- to 6-week-old ducks, the proliferations were 50.2%, 128.1 % and 212.3 %. They were in the range from 193.0% to 281.0% in the age of 8 to 16 weeks.

The results obtained for the first time provide information on the use of LTT-MTT to measure *in-vitro* cell-mediated immune reactions in the afferent phase, on the ontogeny of the phagocytosis of the whole blood of ducks as well as on the ontogeny of Ig-positive cells of ducks. The results are the basis for future basic and clinical applications to investigate the immune competence of ducks.