

### **3. Immunisierung der Versuchstiere**

#### **3.1 Auswahl der Versuchstiere**

Zur Immunisierung wurden Kaninchen der Rasse Weißer Neuseeländer verwendet. Kaninchen zeichnen sich durch eine relativ leichte Haltung und Pflege, geringen Platzbedarf, sowie einfache Immunisierung aus. Kaninchen haben sich bei der Gewinnung von polyklonalen Antikörpern bewährt. Die Tierhaltung sowie der Entwurf des Immunisierungsschemas und die Immunisierung wurden von Prof. Dr. B. Hoffmann, Ambulatorische und Geburtshilfliche Veterinärklinik der Justus-Liebig-Universität Gießen, und seinen Mitarbeitern übernommen.

Neben den Kaninchen wurden aus den in Kapitel 1.5.3 dargelegten Gründen auch Legehennen der Rasse White Leghorn immunisiert. Die Haltung, die Erstellung des Immunisierungsschemas und die Immunisierung der Legehennen wurde von C. Kan und F. Schreurs vom ID-DLO Institute for Animal Science and Health, Department of Food Science, Beekbergen/NL durchgeführt.

#### **3.2 Immunisierung der Kaninchen**

Es wurden drei Kaninchen immunisiert, die mit je einem der Immunogene behandelt wurden. Dazu wurde 1 mg des jeweiligen Immunogens in 0,5 ml Natriumchloridlösung gelöst und mit 0,5 ml komplettem (FCA) oder inkomplettem (FIA) Freundschem Adjuvans emulgiert. Die Emulsion wurde subcutan in den Nacken injiziert. Für die Primärimmunisierung wurde das komplette Adjuvans verwendet, für die Folgeinjektionen, die ungefähr alle zwei Wochen durchgeführt wurden, das inkomplette. Es wurden also bei jeder Immunisierung 1 mg Immunogen injiziert. Bei jeder Immunisierung wurde gleichzeitig Blut abgenommen, so daß jeweils 5 - 10 ml Serum zur Verfügung standen.

Die Seren vom 119. Tag wurden auf die Entwicklung von penicillinspezifischen Antikörpern überprüft. Dabei stellte sich heraus, daß die erzielten Titerfaktoren mit Werten von 50 - 180 nicht sehr hoch waren (Kap. 4.2.1.2.1). Um eine stärkere Bildung der Immunglobuline zu erreichen, wurden die Immunisierungen nach dem 140. Tag für 7 Wochen ausgesetzt und am 182. Tag mit Freundschem komplettem Adjuvans wieder aufgenommen. Diese Technik hat in der Vergangenheit oft zum Erfolg geführt. Die folgenden Boosterinjektionen wurden in 14-tägigem Abstand bis zum 266. Tag mit inkomplettem Adjuvans durchgeführt. Am 276. Tag wurden die Kaninchen entblutet.

#### **3.3 Immunisierung der Legehennen**

Die Legehennen wurden mit dem Immunogen auf KLH-Basis immunisiert. Eine Immunisierung mit den Ovalbumin-Immunogenen scheint erfolglos, da Ovalbumin bei Hühnern nicht immunogen wirken sollte.

Fünf Hennen, die im Alter von 24 Wochen gerade begonnen hatten zu legen, wurden für die Immunisierungen herangezogen. In Vorversuchen zeigten Legehennen nach der Immunisierung unter

Zuhilfenahme von komplettem Freundeschem Adjuvans in den ersten eineinhalb Wochen eine um 50 % verringerte Futteraufnahme sowie eine Schwellung im Nackenbereich. Bei der Obduktion ca. 2 Monate später wurden an den Injektionsstellen große Entzündungsherde gefunden.

Um die starken Entzündungsreaktionen und die verringerte Futteraufnahme zu vermeiden, wurden die Injektionen ausnahmslos mit inkomplettem Adjuvans durchgeführt: 500 µg des 6-APA-KLH-Konjugates wurden in 500 µl physiologischer Kochsalzlösung gelöst und mit 500 µl Adjuvans emulgiert. 500 µl der Emulsion (= 250 µg des Immunogens) wurden wieder subcutan in den Nacken injiziert. Die Folgeinjektionen wurden etwa alle 4 Wochen vorgenommen.

Die Eier wurden nach Legedatum und Tier gesammelt. Außerdem wurden am 84. Tag jedem Tier einige Milliliter Blut entnommen, um exemplarisch die Serumtiter mit den Dottertitern zu vergleichen.