

## DOKAZOVANJE PROTITELES PROTI PATOGENIM MIKROORGANIZMOM V TEKOČINAH KOKOŠJEGA ZARODKA\*

Darja HERMAN<sup>a)+</sup>, Mojca NARAT<sup>b)</sup> in Dušan BENČINA<sup>c)</sup>

<sup>a)</sup> Univ. v Ljubljani, Biotehniška fak., Odd. za zootehniko, Groblje 3, SI-1230 Domžale, Slovenija.

<sup>b)</sup> Isti naslov, doc., dr., mag., e-pošta: [mojca.narat@bfro.uni-lj.si](mailto:mojca.narat@bfro.uni-lj.si).

<sup>c)</sup> Isti naslov, znanst. svetnik., dr., mag.

<sup>+</sup> Sedaj: Univ. v Ljubljani, Medicinska fak., Inštitut za biokemijo in molekularno biologijo, Lipičeva 2, SI-1000, Ljubljana, Slovenija.

Delo je prispelo 08. novembra 2001, sprejeto 20. novembra 2001.

Received November 08, 2001, accepted November 20, 2001.

### IZVLEČEK

Pred patogenimi mikroorganizmi, ki se prenašajo prek valilnih jajc, kokošji zarodek ščitijo protitelesa matere v rumenjaku in beljaku. Z uporabo imunoencimskih testov in monoklonskih protiteles (mAb) proti kokošjim imunoglobulinom razredov G (IgG), IgA in IgM smo ugotavljali prisotnost specifičnih protiteles proti *Mycoplasma synoviae*, *M. gallisepticum*, *Ornithobacterium rhinotracheale* in virusu atipične kokošje kuge v alantoisni tekočini (ALT), amnijski tekočini (AMT), žolču in krvi kokošjih zarodkov na različnih stopnjah embrionalnega razvoja. Že 7. dan embrionalnega razvoja je večina zarodkov imela v ALT specifična protitelesa IgG proti *M. synoviae*, nekateri zarodki pa tudi protitelesa IgG proti *M. gallisepticum* in virusu atipične kokošje kuge. V ALT so bila pri nekaterih zarodkih prisotna tudi protitelesa razreda IgA in IgM. Protitelesa IgA in IgM so se najverjetneje prenesla iz beljaka v ALT. V AMT smo specifična protitelesa IgG proti *M. synoviae* dokazali 7. dan embrionalnega razvoja. Količina IgA, IgG in IgM v AMT se je močno povečala po 12. dnevu embrionalnega razvoja. Specifična protitelesa lahko pridejo tudi v žolč, kjer smo protitelesa IgA in IgG proti *M. synoviae* in *O. rhinotracheale* dokazali pri 13 dni starih zarodkih. Tudi v vzorcih krvi, vzetih iz alantoisnega krvnega obtoka od 13. do 16. dne embrionalnega razvoja, smo dokazali IgG in IgA.

Ključne besede: perutnina / kokošji zarodek / imunologija / imunoglobulini / alantoisna tekočina / amnijska tekočina / žolč

## DETECTION OF ANTIBODIES TO PATHOGENIC MICROORGANISMS IN THE CHICKEN EMBRYO'S FLUIDS<sup>†</sup>

### ABSTRACT

Certain avian pathogens can be transmitted in chickens via hatching eggs. Specific maternal antibodies appearing in the egg yolk and egg white are able to protect embryo against a variety of vertically transmitted bacterial and viral pathogens. Immunoenzyme tests using different monoclonal antibodies (mAb) to chicken immunoglobulins G (IgG), IgA and IgM were used for detection of antibodies to *Mycoplasma synoviae*, *M. gallisepticum*, *Ornithobacterium rhinotracheale* and Newcastle disease virus in the allantoic fluid (ALF), amniotic fluid (AMF), bile and serum of chicken embryos on different stages of the embryonic development. In the

\* Prispevek je del diplomskega dela (zagovor 20. september 2001), mentorica doc. dr. Mojca Narat, somentor dr. Dušan Benčina.

<sup>†</sup> The paper is a part of graduation thesis (justification September 20, 2001), supervisor ass.prof. Mojca Narat, Ph.D., co-supervisor Dušan Benčina, Ph.D.

ALF of 7-day-old embryos IgG antibodies to *M. synoviae* were demonstrated for the first time in this study. Certain samples contained also IgG antibodies to *M. gallisepticum* and Newcastle disease virus. In addition, IgA, and IgM were also found in the ALF. It seems that transfer of IgA and IgM from the egg white to ALF is selective. In AMF specific IgG antibodies to *M. synoviae* were detected on day 7 of the embryonic development. From 12<sup>th</sup> day of the embryogenesis onward levels of IgA, IgG and IgM in AMF were apparently increased. Specific IgA and IgG antibodies to *M. synoviae* and *O. rhinotracheale* were detected in bile of 13-day-old embryos. In the blood, which was taken from the chorioallantoic veins from the 13<sup>th</sup> to 16<sup>th</sup> day of the embryogenesis, IgG and IgA were found.

Key words: poultry / chicken embryo / immunology / immunoglobulins / allantoic fluid / amniotic fluid / bile

## UVOD IN PREGLED OBJAV

Ptiči so oviparne živali, zato pri njih zarodek ni neposredno povezan z materjo, temveč se razvija v jajcu. V času embrionalnega razvoja, ki pri kokošjih zarodkih traja 21 dni, se ob primerni valilni temperaturi snovi iz rumenjaka, beljaka in delno tudi iz jajčne lupine vgradijo v živa tkiva zarodka in njegove membrane (alantois, amnion in rumenjaka vrečka).

Rumenjak predstavlja najbogatejši vir hranilnih elementov, beljak je zaloga beljakovin in vode. V prvih dneh embrionalnega razvoja se na meji med beljakom in rumenjakom prehodno pojavi subembrionalna tekočina. Izginjanje te tekočine pa je povezano z naraščanjem količine amnijske in alantoisne tekočine.

Nekatere fiziološke procese, ki so pomembni za rast in razvoj zarodka, omogočajo embrionalne membrane. Zarodek črpa hrano preko žil rumenjakeve vrečke, ki obdaja rumenjak. Preko žil alantoisne membrane poteka izmenjava plinov med zarodkom in okoljem. Znotraj alantoisne membrane je alantoisna tekočina, kamor se izločajo odpadni produkti metabolizma zarodka. Amnijska membrana obdaja zarodek in je napolnjena z amnijsko tekočino. Ta ščiti zarodek pred okužbami, mehanskimi poškodbami, izsušitvijo... (Romanoff in Romanoff, 1967).

Kokoši lahko okužijo različni patogeni mikroorganizmi in nekateri se lahko prenesejo vertikalno. To pomeni, da se taki mikroorganizmi prenesejo iz razmnoževalnih organov okužene kokoši preko oplojenega jajca do izvaljenega piščanca. Prisotnost mikroorganizmov v jajcu je lahko posledica okužbe jajčnika ali jajcevoda kokoši, lahko pa je mikrob na površini jajca in prehaja skozi pore v jajčni lupini v notranjost (Zander in sod., 1997).

Pred delovanjem patogenih mikroorganizmov zarodek lahko zaščitijo komponente naravne odpornosti s protimikrobnim delovanjem. To so predvsem beljakovine iz beljaka: ovotransferin, avidin, ovoriboflavin, lizocim (Li-Chan in Nakai, 1989). Zarodek pa ščitijo tudi pasivno pridobljena materina protitelesa (Zander in sod., 1997). Prenos protiteles IgG iz seruma kokoši v jajčni rumenjak in nato preko žil rumenjakeve vrečke v krvni obtok zarodka je dobro opisan (Kowalczyk in sod., 1985).

Mikroorganizmi, ki okužijo jajcevod kokoši, pogosto izzovejo lokalno tvorbo protiteles IgA, IgG in IgM. Ta protitelesa se nato pojavijo v jajčnem beljaku. Okoli 12. dne embrionalnega razvoja se prekine sero-amnijska plošča in beljak se pomeša z amnijsko tekočino. To mešanico nato zarodek prične goltati in protitelesa iz beljaka na ta način pridejo v prebavila zarodka (Rose in sod., 1974).

V znanstveni literaturi skoraj ni podatkov o prisotnosti protiteles v alantoisni tekočini v času embrionalnega razvoja. Kramer in Cho (1970) sta v njej dokazala protitelesa proti virusu atipične kokošje kuge pri 8 dni starih zarodkih. Ewert in sod. (1979) so tudi poročali o protitelesih IgA in IgM proti istemu virusu v alantoisni tekočini, vendar starost zarodkov iz njihove objave ni razvidna.

Malo je tudi znanega o prisotnosti protiteles v žolču kokošjih zarodkov. Benčina in sod. (1992) so v žolču 14 dni starih zarodkov dokazali protitelesa IgA proti *M. gallisepticum* in *M. synoviae*.

Njihovi titri so naraščali s starostjo zarodkov. Shawky in sod. (1994) so poročali o prisotnosti protiteles IgG proti rotavirusom v žolčih purančkov na dan izvalitve.

V predstavljenem delu smo želeli z uporabo imunoencimskih testov ugotoviti ali se protitelesa proti *M. synoviae*, *M. gallisepticum*, *O. rhinotracheale* in virusu atipične kokošje kuge lahko pojavijo v alantoisni tekočini (ALT), amnijski tekočini (AMT) in žolču zarodkov.

## MATERIAL IN METODE

### Vzorci

Kokošje zarodke smo dobili v valilnici Katedre za perutninarstvo Odd. za Zootehniko Biotehniške fak. v Domžalah. Zarodki so pripadali kokošji pasmi grahasti prelux. Kokoši so bile cepljene proti virusu atipične kokošje kuge in naravno okužene z različnimi mikroorganizmi. Jajca so bila valjena v standardnih pogojih. Za posamezen dan embrionalnega razvoja je bilo iz valilnice naključno vzetih po deset jajc. Kokošjim zarodkom smo na začetku druge tretjine valjenja (7., 8. in 9. dan embrionalnega razvoja) odvzeli vzorce alantoisne tekočine, amnijske tekočine in rumenjaka. Zarodkom, ki so bili stari 13, 14, 15 in 16 dni, smo poleg teh vzorcev odvzeli še vzorce žolča in vzorce krvi (iz žil horio-alantoisne membrane).

### Indirektni trostopenjski imunoencimski test na nitrocelulozni membrani

S tem testom smo ugotavljali prisotnost specifičnih protiteles proti patogenim mikroorganizmom. Test se imenuje tudi DIBA (dot-immunobinding assay) in smo ga izvedli podobno, kot je opisano v literaturi (Benčina in sod., 2000). V testu smo kot antigene uporabili različne mikroorganizme. Resuspendirani so bili v fosfatnem puftru (PBS; pH = 7,2), nato pa po 2 µl nanešeni na nitrocelulozno membrano. Izbrani mikroorganizmi so bili: *Mycoplasma gallisepticum* sev S6<sub>JMB</sub> (Benčina in sod., 1994), različni sevi *M. synoviae*: sev ULB001B, sev K1723 in sev TK3344, *Ornithobacterium rhinotracheale* (Zorman Rojs in sod., 2000) in virus atipične kokošje kuge sev La Sota (Pliva, Zagreb), pridobljen iz ALT kokošnjih zarodkov na Veterinarski fakulteti v Ljubljani. Poleg mikroorganizmov smo na membrano kot antigen nanesli še rekombinantno beljakovino rMSPB (Drobnič Valič, 2001), redčeno 1:50. Membrano smo blokirali 30 minut z 0,5 % Tween 20 (Difco) v PBS (0,5 % PBST). Po blokadi smo trakove membrane 60 minut inkubirali v ustreznih redčinah vzorcev. Vzorci ALT in AMT so bili redčeni 1:10; vzorci žolča, rumenjaka in krvi pa 1:100. Sledilo je trikratno spiranje po 10 minut v 0,025 % PBST. Na drugi stopnji smo trakove inkubirali 60 minut v ustreznih monoklonskih protitelesih, redčenih v PBS (pregl. 1). Sledilo je trikratno spiranje po 10 minut v 0,025 % PBST. Na tretji stopnji smo trakove inkubirali 45 minut v ustreznih sekundarnih protitelesih, konjugiranih s peroksidazo (pregl. 1). Ponovili smo spiranje trakov dvakrat po 10 minut v 0,025 % PBST in 10 minut v PBS. Trakove smo nato posušili in nanesli substrat (TRUE BLUE, Kirkegaard & Perry Laboratories).

Za kontrolo specifičnosti vezave konjugata smo nitrocelulozno membrano z nanešenimi antigeni na prvi stopnji inkubirali v PBS, vse nadaljnje faze pa so bile enake. Za pozitivne kontrole smo na membrano nanesli: kokošji serum, redčen 1:500 v PBS za preverjanje IgG; žolč kokoši, redčen 1:100 v PBS za preverjanje IgA; izpirek sapnika purana (10-krat koncentriran) za preverjanje IgM. Teste smo izvedli pri sobni temperaturi.

### Indirektni imunoencimski test na kolonijah celic *M. synoviae*

Test smo izvedli, kot je opisano v literaturi (Benčina in Bradbury, 1991). Kolonije celic *M. synoviae* (sevi: ULB001B in K1723) so bile na agarških blokkih, izrezanih iz gojišča. Na prvi

stopnji smo kolonije prelili z neredčenimi ali redčenimi (1 : 3 do 1 : 10) vzorci ALT oz. AMT kokošjih zarodkov, starih od 7 do 9 ter od 12 do 16 dni. Po 1 uri smo agarске bloke spirali eno uro v PBS, nato smo kolonije mikoplazem inkubirali 45 minut v s peroksidazo konjugiranih kunčjih protitelesih proti celim molekulam kokošjih IgG (pregl. 1). Po enournem spiranju v PBS smo dodali substrat diaminobenzidin (DAB; Sigma, D-5905). DAB (1 mg ml<sup>-1</sup>) je bil raztopljen v 0,1 M Tris-HCl (pH 7,5) z dodanim H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (v končni razredčini 0,03 %). Reakcije smo ustavili s spiranjem v destilirani vodi in jih nato ocenili s pregledom kolonij pod mikroskopom (povečava 100x). Če so bila v vzorcih ALT oz. AMT prisotna protitelesa IgG, specifična za površinske membranske antigeni *M. synoviae*, so se nanje vezala in zato so se kolonije rjavo obarvale. V testu so bili kot ustrezne kontrole vključeni vzorci, ki so imeli protitelesa IgG proti *M. synoviae* oz. vzorci, ki takih protiteles niso imeli.

Preglednica 1. Seznam protiteles, ki so bila uporabljena v imunoencimskih testih  
Table 1. The list of antibodies used in immunoenzyme assays

Specifičnost za Specificity for	Izvor From	pAb / mAb* (klon, clone)	Delovna razredčina Working dilution	Referenca Reference
Kokošji IgG (cela molekula) Chicken IgG (whole molecule)	Kunec** Rabbit**	pAb	1:3000	Sigma, A-9046
Kokošji IgG Chicken IgG	Miš Mouse	mAb (1F5/3G2)	1:10	Rejc M. (1999)
Kokošji IgA Chicken IgA	Miš Mouse	mAb (A1)	1:300	Erhard M.H. in sod. (1992)
Kokošji IgM Chicken IgM	Miš Mouse	mAb (M1)	1:20	Mockett A.P.A. (1986)
Kokošji ovalbumin Chicken ovalbumin	Miš Mouse	mAb (OVA-14)	1:500	Sigma, A-6075
Mišji IgG (Fc del) Mouse IgG (Fc specific)	Koza* Goat*	pAb	1:3000	Sigma, A 0168

\* = pAb – poliklonska protitelesa / policlonal antibodies; mAb – monoklonska protitelesa / monoclonal antibodies

\*\* = označena s peroksidazo / conjugated to peroxidase

## Imunoblot

Da bi ugotovili, katere beljakovine mikroorganizmov prepoznajo protitelesa iz vzorcev ALT, AMT in rumenjaka, smo izvedli imunoblot analize. Beljakovine izbranih mikroorganizmov smo najprej ločili z denaturacijsko poliakrilamidno gelsko elektroforezo (SDS-PAGE). Uporabljeni so bili antigeni: *M. synoviae* (sev ULB 925, klon KF9), *M. gallisepticum* (sev S6<sub>JMB</sub>), *O. rhinotracheale* (izolat iz sapnika pure) in virusa atipične kokošje kuge (La sota). SDS-PAGE smo izvedli z aparatom PhastSystem TM (Pharmacia) po navodilih proizvajalca in po programu, ki je že opisan (Benčina in sod., 1994). Za ločevanje beljakovin v gradientnem gelu (PhastGel, Gradient 8–25) smo uporabili program 1 (250 voltov, 12,5 watov, 15 °C, skupaj 70 voltnih ur).

Beljakovine, ki smo jih ločili z elektroforezo, smo iz gela prenesli na membrano Immobilon P (Milipore). Prenos je potekal 20 minut pri 70 °C (Benčina in sod., 1994).

Določevanje beljakovin z uporabo mAb smo izvedli po opisih v literaturi (Benčina in sod., 1994; Narat in sod., 1998). Membrano z beljakovinami, prenešenimi iz gela, smo blokirali v

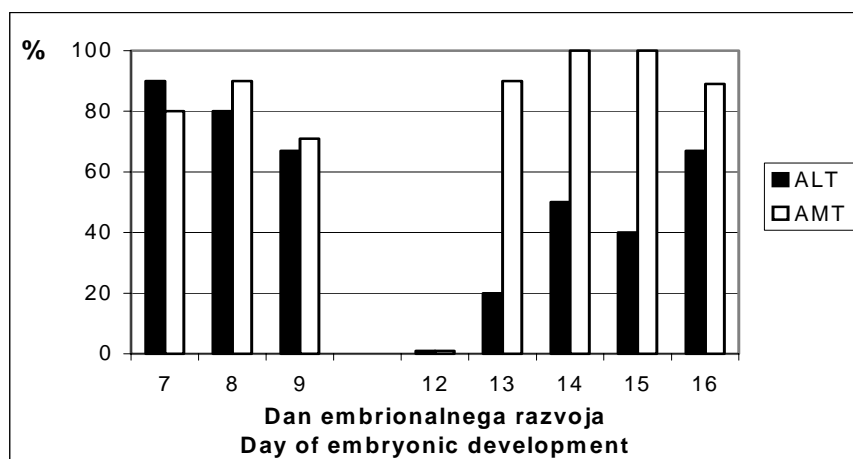
0,5 % PBST in jo nato inkubirali 1 uro v vzorcih (ALT in AMT smo redčili 1:5 do 1:20; rumenjaka pa 1:100 ali več). Po spiranju v 0,05 % TPBS je sledila inkubacija (45 minut) v s peroksidazo konjugiranih kunčjih protitelesih proti celim molekulam kokošjih IgG (pregl. 1). Po ponovnem spiranju smo dodali DAB (Sigma, D-5905). Rjava barva se je razvila pri tistih beljakovinah mikoplazem, ki so jih prepoznavala specifična protitelesa IgG iz vzorcev.

## REZULTATI IN RAZPRAVA

### Protitelesa v alantoisni tekočini kokošjih zarodkov

DIBA-testi so pokazali, da so v vzorcih ALT protitelesa IgG, IgA in IgM že 7. dan embrionalnega razvoja. V vseh vzorcih, ki smo jih odvzeli kokošjim zarodkom, starim od 7 do 9 dni, smo dokazali protitelesa IgG proti virusu atipične kokošje kuge, v večini vzorcev pa so bila tudi protitelesa IgG proti *M. synoviae*. Protitelesa IgA in IgM so bila usmerjena predvsem proti virusu atipične kokošje kuge. V posameznih vzorcih so bila dokazana še protitelesa IgG proti *M. gallisepticum* in *O. rhinotracheale* ter protitelesa IgM proti *O. rhinotracheale*.

Vzorci ALT, ki smo jih odvzeli 7 do 9 dni starim kokošjim zarodkom, smo testirali tudi z imunoencimskimi testi na kolonijah *M. synoviae*. Rezultati so se ujemali z rezultati DIBA-testov. Dokazali smo, da so bila že v 7. in 8. dnevu embrionalnega razvoja pri 80–90 % preiskanih vzorcev alantoisne tekočine prisotna protitelesa IgG proti površinskim membranskim antigenom *M. synoviae*. Opazili smo znižan odstotek (67 %) vzorcev s protitelesi IgG proti *M. synoviae* v 9. dnevu embrionalnega razvoja. Testirali smo tudi vzorce ALT, odvzete od 12. do 16. dneva embrionalnega razvoja. Dvanajsti dan v vzorcih ALT nismo dokazali IgG proti *M. synoviae*; od 13. dneva dalje pa je število takih vzorcev naraščalo (graf. 1). Ta nihanja so morda posledica dotoka vode v alantois, saj volumen ALT narašča vse tja do 13. dne embrionalnega razvoja, relativna koncentracija beljakovin (npr. imunoglobulinov) pa se na ta račun zmanjšuje. Podobno nihanje koncentracij beljakovin iz rumenjaka in beljaka sta opisala Kramer in Cho (1970) ter zaključila, da je le-to posledica pretoka vode.

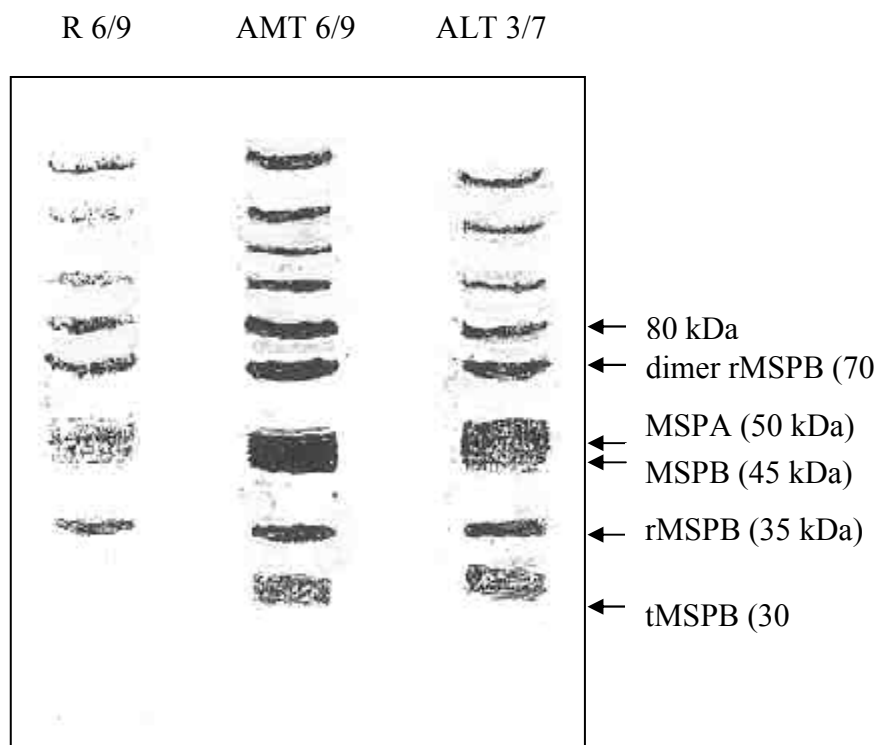


Grafikon 1. Preiskava vzorcev alantoisne tekočine kokošjih zarodkov, starih od 7 do 9 ter od 12 do 16 dni, z uporabo indirektnega imunoencimskega testa na kolonijah *M. synoviae*.

Graph 1. Examination of allantoic fluid samples of 7 to 9 and 12 to 16-day-old embryos by indirect immunoperoxidase assay using colonies of *M. synoviae*.

Glede na objave v znanstveni literaturi je to prvi dokaz protiteles v ALT v tako zgodnji fazi embrionalnega razvoja. Glede na relativno visoke titre protiteles v nekaterih vzorcih je precej verjetno, da so bila protitelesa v ALT že pred 7. dnevem embrionalnega razvoja. Prihodnje raziskave bi lahko pokazale, ali se protitelesa začnejo prenašati v alantoisno takočino že tedaj, ko se ta pojavi (od 5. dne embrionalnega razvoja dalje).

Ker so testiranja vzorcev alantoisne tekočine pokazala, da so v njih prisotna specifična protitelesa proti različnim mikroorganizmom, smo želeli ugotoviti, proti katerim antigenom teh organizmov so protitelesa usmerjena. Imunoblot analize so pokazale, da protitelesa IgG najbolj intenzivno reagirajo z antigeni *M. synoviae*. V imunoblotih so protitelesa IgG iz preiskanih vzorcev alantoisne tekočine prepoznavala do 10 različnih beljakovin *M. synoviae*. Vsi vzorci so vsebovali protitelesa IgG, ki so reagirala z beljakovino MSPB (imunodominantna beljakovina *M. synoviae*), njegovo kratko obliko - tMSPB (~30 kDa), v večini primerov pa so močno reagirala še z beljakovinami z molekularno maso približno 80 kDa. Protitelesa IgG iz večine preiskanih vzorcev so reagirala tudi z rekombinantno beljakovino rMSPB in njegovo dimerno obliko (~70 kDa) (slika 1, steza ALT).



Slika 1. Reakcija specifičnih protiteles IgG iz vzorcev alantoisne in amniotske tekočine ter rumenjaka kokošnjih zarodkov z beljakovinami *M. synoviae* (R 6/9 = rumenjak 9 dni starega zarodka; AMT 6/9 = amniotska tekočina 9 dni starega zarodka; ALT 3/7 = alantoisna tekočina 7 dni starega zarodka).

Figure 1. Reaction of specific antibodies from allantoic fluid, amniotic fluid and egg-yolk of chicken embryo with *M. synoviae* proteins (R 6/9 = egg-yolk of 9-day-old embryo; AMT 6/9 = amniotic fluid of 9-day-old embryo; ALT 3/7 = allantoic fluid of 7-day-old embryo).

Pojav protiteles proti *M. synoviae* in *M. gallisepticum* v ALT že 7. dan embrionalnega razvoja ima verjetno pomembno zaščitno vlogo, ki je zaenkrat slabo raziskana. Znano je, da *M. synoviae* in *M. gallisepticum* lahko okužita kokošji jajcevod (Benčina in sod., 1991) in se nato pojavita v jajcih. Razmnožujeta se lahko v alantoisni votlini oz. na alantoisni membrani in patogeni sevi lahko povzročijo zamrtje zarodkov. O zaščitni vlogi materinih protiteles, ki so bila v rumenjaku

in so preprečevala pogine zarodkov, ki so bili okuženi z *M. gallisepticum*, so poročali že Levisohn in sod. (1985).

Prenos protiteles iz beljaka (predvsem IgA in IgM) v alantoisno tekočino je verjetno selektiven. Na to kažejo razmerja koncentracij beljakovin (npr. IgA, ovalbumin) v ALT v primerjavi z njihovimi koncentracijami v beljaku. Iz beljaka se v ALT ne prenašajo tudi nekatere majhne molekule kot npr. antibiotiki (Greenfield in Bigland, 1971).

### **Protitelesa v amnionski tekočini kokošjih zarodkov**

Z DIBA-testi smo 8. dan embrionalnega razvoja v vseh vzorcih AMT dokazali IgG, IgA in IgM protitelesa proti *M. synoviae*. Tudi 9. dan so v vzorcih prevladovala protitelesa (IgG, IgA in IgM) proti tej bakteriji. Po 13. dnevu embrionalnega razvoja se je povečalo število vzorcev z dokazanimi protitelesi IgA proti vsem testiranim mikroorganizmom.

Vzorci AMT kokošjih zarodkov smo testirali tudi z imunoencimskim testom na kolonijah *M. synoviae*. Vzorci AMT, odvzeti od 8. do 9. dne embrionalnega razvoja, so večinoma (~80 %) vsebovali protitelesa IgG proti površinskim antigenom te. Podobno kot smo opazili pri vzorcih ALT, tudi v vzorcih AMT, odvzetih 12. dan embrionalnega razvoja, nismo dokazali protiteles IgG proti *M. synoviae*. Od 13. dneva embrionalnega razvoja dalje pa so bila protitelesa dokazana v večini vzorcev (graf. 1).

V imunoblotih so protitelesa IgG iz vzorcev AMT prepoznavala enake beljakovine *M. synoviae* kot protitelesa IgG iz vzorcev ALT (slika 1, steza AMT).

Visoke koncentracije beljakovin, vključno z ovalbuminom, v vzorcih AMT od 13. dne embrionalnega razvoja dalje, so posledica dejstva, da se v tem času beljak pomeša z AMT. Ko zarodek požira to mešanico, pridejo protitelesa v njegov prebavni trakt (Rose in sod., 1974). V AMT in v prebavilih zarodka imajo verjetno pomembno zaščitno vlogo, saj nekateri mikroorganizmi (npr.: *M. gallisepticum*, *M. meleagridis* pri puranih in *M. iowae*) skupaj z amnionsko tekočino pridejo v prebavni trakt zarodka (Reis in Yamamoto, 1971).

### **Protitelesa v žolču kokošjih zarodkov**

Specifična protitelesa IgG in IgA so bila v vzorcih žolča prisotna le 13. dan embrionalnega razvoja (z izjemo enega vzorca). V vseh teh vzorcih smo dokazali protitelesa IgG in IgA proti *M. synoviae* ter protitelesa IgA proti *O. rhinotracheale*. Naši rezultati so v nasprotju s predhodnimi raziskavami, kjer so Benčina in sod. (1992) opazili naraščanje titrov protiteles IgA, IgG in IgM proti *M. synoviae* in *M. gallisepticum* v žolču zarodkov od 14. dne embrionalnega razvoja dalje. Naša opažanja bi lahko pripisali razlikam med skupinami zarodkov. Take razlike med skupinami smo opazili tudi za imunoglobuline v ALT oz. za beljakovine v beljaku.

Načina prenosa imunoglobulinov v žolč ne poznamo, vendar bi bil lahko povezan s spremembami, ki se zgodijo v steni žolčnega mehurja zarodka. Med 12. in 15. dnem embrionalnega razvoja se tam pojavijo sekretorne celice, ki omogočajo povečano izločanje neznanih glikoproteinov v žolč (Gheri-Bryk in sod., 1990). Med te neznane glikoproteine morda spadajo tudi imunoglobulini.

### **Protitelesa v serumu kokošjih zarodkov**

V obdobju od 13. do 16. dne embrionalnega razvoja smo zarodkom jemali kri, in sicer iz horioalantoisnih žil. V teh vzorcih so bili imunoglobulini razredov IgG in IgA. Z imunoencimskimi testi na kolonijah *M. synoviae* smo dokazali, da so bila prisotna protitelesa IgG proti tej bakteriji. Rose in sod. (1974) so poročali, da so v serumu 19 dni starih kokošjih zarodkov prisotna le protitelesa IgG. Prisotnost protiteles IgA v naših vzorcih seruma pa si lahko razlagamo tako, da se v treh različnih krvnih obtokih kokošjega zarodka nekatere snovi lahko

selektivno prenesejo in so zato na določeni stopnji embrionalnega razvoja prisotne v določenem obtoku, v drugih dveh pa ne. Verjetno iz tega izvirajo različni rezultati v objavah avtorjev, ki so raziskovali prisotnost imunoglobulinov v serumu zarodka.

### SKLEPI

Rezultati so pokazali, da so protitelesa (IgG, IgA in IgM), ki so prepoznavala antigene *M. synoviae*, *M. gallisepticum* in virusa atipične kokoške kuge, prisotna v ALT in AMT že 7. dan embrionalnega razvoja. Protitelesa lahko preidejo tudi v žolč, kar smo dokazali pri 13 dni starih zarodkih. V krvi, odvzeti iz žil horioalantoisne membrane od 13. dne embrionalnega razvoja dalje, pa smo poleg protiteles IgG dokazali tudi IgA.

Za dokazovanje specifičnih protiteles smo uporabili DIBA-teste. S temi testi bi lahko izboljšali sedanjo serološko diagnostiko, saj lahko vzorec istočasno testiramo na prisotnost protiteles proti vsaj šestim antigenom, hkrati pa tudi določimo imunoglobulinski razred protiteles. Poleg tega so ti testi enostavni in relativno hitri.

Dokazovanje protiteles v embrionalnih tekočinah (npr. ALT) bi bil lahko dober test za ugotavljanje okužbe jajcevoda pri perutnini. Seveda pa je potrebno ta diagnostični potencial potrditi z nadaljnjimi preiskavami.

### SUMMARY

The purpose of investigation was to determine whether the specific antibodies were transferred to embryonic fluids of chicken embryo. Results demonstrated that antibodies (IgG, IgA and IgM), which specifically recognized antigens of *M. synoviae*, *M. gallisepticum* and Newcastle disease virus could be detected in allantoic fluid and in amniotic fluid on 7<sup>th</sup> day of embryonic development. Regarding the data from literature this is the first evidence of such an appearance of antibodies in embryonic fluids of chicken embryo. Specific antibodies were detected also in the bile on 13<sup>th</sup> day of the embryogenesis while in the blood taken from the chorioallantoic veins at this stage of development IgA antibodies were also detected.

These results could be applied as well. Namely, DIBA-assay, which was used for the detection of specific antibodies, can improve the serological diagnosis since at least six antigens can be used at the same time to test the presence and class of antibodies in each sample. Beside that this test is relatively simple and quick. Determination of specific antibodies in embryonic fluids could be a good test for the detection of the infection of oviduct since collecting the eggs is a non-invasive method for getting the samples.

### VIRI

- Benčina, D./ Bradbury, J.M. Indirect immunoperoxidase assay for the detection of antibody in chicken *Mycoplasma* infections. *Avian Pathology*, 20(1991), 113–124.
- Benčina, D./ Dorrer, D./ Tadina-Jakšič, T. Transmission of the antibodies to pathogenic avian mycoplasmas from the albumen of the chicken egg to the embryo. V: IOM Letters. Vol. 2, Program and abstracts of the 9<sup>th</sup> International Congress of the International Organization for Mycoplasmaology, 1992-08-02/07. Ames, Iowa, International Organization for Mycoplasmaology, 1992, 251.
- Benčina, D./ Dovč, P./ Mueller-Premru, M./ Avšič Županc, T./ Sočan, M./ Beovič, B./ Arnež, M./ Narat, M. Intrathecal synthesis of specific antibodies in patients with invasion of the central nervous system by *Mycoplasma pneumoniae*. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 19(2000), 524–530.
- Benčina, D./ Kleven, S.H./ Elfaki, M.G./ Snoj, A./ Dovč, P./ Dorrer, D./ Russ I. Variable expression of epitopes on the surface of *Mycoplasma gallisepticum* demonstrated with monoclonal antibodies. *Avian Pathology*, 23(1994), 19–36.



- Drobnič Valič, M. Molekularne osnove nastanka antigenskih variant hemaglutinina pri bakteriji *Mycoplasma synoviae*. Magistrsko delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Medicinska fak., Biotehniška fak., 2001, 108 str.
- Erhard, M.H./ von Quistorp, I./ Schraner, I./ Jüngling, A./ Kaspers, B./ Schmidt, P./ Kühlmann, R. Development of specific enzyme-linked immunosorbent antibody assay systems for the detection of chicken immunoglobulins G, M, and A using monoclonal antibodies. *Poultry Science*, 71(1992), 302–310.
- Ewert, D.L./ Barger, B.O./ Eidson, C.S. Local antibody response in chickens: analysis of antibody syntheses to Newcastle disease virus by solid-phase radioimmunoassay and immunofluorescence with class-specific antibody for chicken immunoglobulins. *Infection and Immunity*, 24(1979), 269–275.
- Gheri-Bryk, S./ Gheri, G./ Pacini, P. The development of the chick embryo gallbladder studied by scanning electron microscope. *Anatomischer Anzeiger*, 171(1990), 297–305.
- Greenfield, J./ Bigland, C.H. Translocation of antibiotics in developing avian embryos. *Avian Diseases*, 15(1971), 572–580.
- Kowalczyk, K./ Daiss, J./ Halpern, J./ Roth T.F. Quantitation of maternal-fetal IgG transport in the chicken. *Immunology*, 54(1985), 755–762.
- Kramer, T.T./ Cho, H.C. Transfer of immunoglobulins and antibodies in the hen's egg. *Immunology*, 19(1970), 157–167.
- Levisohn, S./ Glisson, J.R./ Kleven, S.H. In ovo pathogenicity of *Mycoplasma gallisepticum* strains in the presence and absence of maternal antibody. *Avian Diseases*, 29(1985), 188–197.
- Li-Chan, E./ Nakai S. Biochemical basis for the properties of egg white. *Critical Reviews in Poultry Biology*, 2(1989), 21–58.
- Mockett A.P.A. Monoclonal antibodies used to isolate IgM from chicken bile and avian sera and to detect specific IgM in chicken sera. *Avian Pathology*, 15(1986), 337–348.
- Narat, M./ Benčina, D./ Kleven, S.H./ Habe, F. The hemagglutination-positive phenotype of *Mycoplasma synoviae* induces experimental infectious synovitis in chickens more frequently than does the hemagglutination-negative phenotype. *Infection and Immunity*, 66(1998), 6004–6009.
- Reis, R./ Yamamoto, R. Pathogenesis of single and mixed infections caused by *Mycoplasma meleagridis* and *Mycoplasma gallisepticum* in turkey embryos. *American Journal of Veterinary Research*, 32(1971), 63–74.
- Rejc M. Priprava s peroksidazo konjugiranih monoklonskih protiteles proti kokošjim imunoglobulinom razreda G (IgY). Diplomsko naloga. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fak., Enota medoddelčnega študija mikrobiologije, 1999, 79 str.
- Romanoff, A.L./ Romanoff, A.J. Biochemistry of the avian embryo – a quantitative analysis of prenatal development. New York, John Wiley & Sons, 1967, 398 str.
- Rose, M.E./ Orlans, E./ Buttress, N. Immunoglobulin classes in the hen's egg: their segregation in yolk and white. *European Journal of Immunology*, 4(1974), 521–523.
- Shawky, S.A./ Saif, Y.M./ McCormick J. Transfer of maternal anti-rotavirus IgG to the mucosal surfaces and bile of turkey poults. *Avian Diseases*, 38 (1994), 409–417.
- Zander, D.V./ Bermudez, A.J./ Mallinson, E.T. Principles of diseases and prevention: diagnosis and control. V: Diseases of poultry. 10<sup>th</sup> ed. (ur.: Calnek B.W./ Barnes H.J./ Beard C.W./ McDougald L.R./ Saif Y.M.). Ames, Iowa State University Press, 1997, 3–45.
- Zorman Rojs, O./ Zdovc, I./ Benčina, D./ Mrzel, I. Infection of turkeys with *Ornithobacterium rhinotracheale* and *Mycoplasma synoviae*. *Avian Diseases*, 44(2000), 1017–1022.