

654

Beretning fra Statens Husdyrbrugsforsøg

Majken Arnull

Vævstypeanalyse af to avlslinier af slagtekyllingetypen

*Histocompatibility analyses of
two different strains of meatype chickens*

With English summary and subtitles



Trykt i Frederiksberg Bogtrykkeri a.s 1989

FORORD

Den foreliggende beretning omhandler en vævstypeanalyse på avlsmateriale fra Avlsstationen for Fjerkræ, STRYNØ, i årene 1985/87. Driften af avlsstationen gennemføres for midler, der er bevilliget af Landsudvalget for Fjerkræ, medens ansvaret for tilrettelæggelse og gennemførelse af tilknyttede projekter påhviler Afdelingen for Forsøg med Fjerkræ og Kaniner.

Opgaverne omfatter såvel udvikling og afprøvning af nye avlsmetoder som gennemførelse af avlsforsøg med nye selektionskriterier som f. eks. vævstyper. Resultaterne fra avlsstationens virksomhed tjener som supplement for en optimering af den danske slagtekyllingeproduktion. Landbrugets Samråd for Forskning og Forsøg har via det bioteknologiske program bevilliget midler til gennemførelse af delprojektet: "MHC hos slagtefjerkræ" i afdelingens regie.

Det beskrevne projekt er det første i afdelingens program for indførelse og brug af nye bioteknologiske metoder på bl.a. avlsområdet, hvor der i stigende grad tages hensyn til resistens over for sygdomme.

Forsøgsplanlægning og udarbejdelse af analysemetoder er foretaget af vid.ass., cand.scient. Majken Arnull og professor, dr.med. Morten Simonsen, Institut for Eksperimentel Immunologi, medens viceforstander, dr.agro. Poul Sørensen har fungeret som koordinator på projektet. Bestyrer Niels Kold har forestået den daglige ledelse af avlsstationen - herunder indsamling af blodprøver til analyse. Tilrettelæggelse af forsøgsplaner vedr. aviær leukose er sket i samarbejde med stud.med.vet. et agro. Jan E. Hedemand. Cand.scient. Majken Arnull har behandlet de indsamlede data og udarbejdet beretningen. Overassistent Inge Erlandsen og assistent Birthe Jensen har opsat og renskrevet den.

Forfatteren ønsker at takke alle implicerede medarbejdere samt rette en tak til de øvrige medarbejdere på Afdelingen for Forsøg med Fjerkræ og Kaniner samt medarbejdere på professor Morten Simonsens laboratorium.

Frederiksberg, februar 1989

J.Fris Jensen

INDHOLDSFORTEGNELSE

	Side
FORORD	3
SAMMENDRAG	5
SUMMARY	7
1 INDLEDNING	9
2 MAJOR HISTOCOMPATIBILITY COMPLEX	10
2.1 Generelle træk	10
2.2 Den genetiske struktur af hønens MHC	12
2.3 Nomenklatur	13
3 METODER TIL KARAKTERISERING AF B-ALLOMORFER	15
3.1 B-allomorfer i dansk slagtefjerkræ	15
3.2 Etablering af hanefamilier	18
3.3 Fremstilling af alloantisera til identifikation af to avlslinier	22
4 HÆMAGGLUTINATIONSANALYSE AF TO AVLSLINIER	26
4.1 Fordeling af B-haplotyper i 3 generationer af Hvid Plymouth Rock	26
4.2 Fordeling af B-haplotyper i 3 generationer af Hvid Cornish	29
5 VURDERING AF DE OPNÅEDE RESULTATER	32
5.1 Alloantiserapanelets rækkevidde	32
5.2 MHC og relationer til aviær leukose	32
5.3 MHC i forbindelse med Mareks disease	33
5.4 Fordeling af B-haplotyper i 3 linier selekteret for foderudnyttelse	35
5.5 MHC som selektionsparameter	37
LITTERATUR	38
APPENDIKS	40
A Fremstilling af alloantisera	40
B Fremstilling af alloantisera ved hjælp af skin graft- ing	41
C Rensning af alloantisera ved hjælp af RBC	41
D Hæmagglutination	43
E Graft versus Host-analyser	43
F Mixed Lymphocyte Reaction	45
Buffere og opløsninger	46

SAMMENDRAG

Avlsmateriale fra Avlsstationen for Fjerkræ, STRYNØ har fungeret som testpopulation i bestræbelserne på at fremstille et panel af type-reagenser rettet mod hønsens Major Histocompatibility Complex (MHC) kaldet B-komplekset. Den her omtalte undersøgelse har hovedsagelig været koncentreret om to avlslinier af henholdsvis racen "Hvid Cornish (HC)" og "Hvid Plymouth Rock (HPR)".

MHC er en genetisk region, som koder for polymorfe proteiner med overordnede immunologiske funktioner. Hos høns består MHC af 3 loci, som kaldes B-F (klasse I), B-L (klasse II) og B-G (klasse IV), sidstnævnte loci har dog ikke de nævnte funktioner. Tilsammen udgør de nævnte proteiner individets vævstype - eller haplotype.

I kapitel 2 er givet en kort gennemgang af den molekylære opbygning af de implicerede elementer, samt en introduktion af den internationalt anerkendte nomenklatur, der anvendes til beskrivelse af de alleliske produkter (haplotyper) fra det før omtalte B-kompleks.

Kapitel 3 er et metodeafsnit, som beskriver den fremgangsmåde, der i dette projekt er anvendt til fremstilling af et vævstypespecifikt antiserapanel. De serologiske reagenser er fremstillet v.h.a. kryds-immuniseringer af søskende fra samme familie, der kun adskilte sig fra hverandre i MHC. Immuniseringerne blev foretaget således, at nogle dyr modtog rensede hvide blodlegemer (WBC), mens andre modtog rensede røde blodlegemer (RBC), i håb om på denne måde at fremstille alloantisera rettet mod henholdsvis B-F (klasse I) produktet og B-G (klasse II) produktet. Rækkevidden af panelet er begrænset til de to undersøgte linier.

Testpopulationen er opdelt i tre generationer for hver linie, hvor hvert individ er typet ved hjælp af det fremstillede typeserapanel. Resultatet af dette arbejde er samlet i kapitel 4. De to linier er klart adskilte, hvad angår MHC. Der blev ialt fundet 14 haplotyper, hvoraf de 5 var specifikke for HPR linien, mens en haplotype var fælles for begge linier. For HC liniens vedkommende var det muligt at identificere 95% af dyrene, mens det for HPR linien kun var muligt at vævstypebestemme 88%.

Sammenhæng mellem MHC og sygdomsresistens er et område, som har vakt manges interesse. Flere undersøgelser har vist, at en specifik haplo-type er korreleret til resistens overfor Marek's disease, men det er stadig uvist på hvilken måde MHC "formidler" resistensen. Lignende undersøgelser i relation til aviær leukose har ikke givet så éntydige resultater. I kapitel 5 omtales de skridt, der fra afdelingens side er taget, i håb om nærmere at belyse sammenhæng mellem MHC og resistens mod de to omtalte sygdomme. I samme kapitel behandles de foreløbige resultater af en vævstypeanalyse på 3 sublinier selekteret for foderudnyttelse. Disse resultater vil danne basis for videre undersøgelser, hvor formålet er at finde eventuel sammenhæng mellem det anvendte selektionskriterium og MHC.

Bagerst i beretningen findes et appendix, der indeholder metodebeskrivelser af de forskellige typer tests, der er anvendt. Som regel betragtes et appendix som et bilag, men i denne forbindelse har "appendix" en central betydning, idet nærværende opgaves hovedformål: At fremstille et vævstypespecifikt testserapanel - kan betragtes som et metdestudie.

SUMMARY

From the breeding station, "Avlsstationen for Fjerkræ, STRYNØ", breeding strains were selected as a test population. It comprises the main materials of our efforts to produce a panel of specific alloantisera against the chicken Major Histocompatibility Complex - so called B-complex. The two breeding strains selected for this purpose belong to the breeds WHITE CORNISH (HC) and WHITE PLYMOUTH ROCK (HPR).

The MHC of the chicken is - like the MHC found in mammals - a genetic region coding for polymorphic proteins with superior immunological functions. In the chicken, MHC comprises 3 classes of loci, i.e. the B-F (class I), the B-L (class II), and B-G (class IV). In chapter 2, a short introduction is given concerning the molecular structure and the function including the international nomenclature which applies to the allelic products (haplotypes) of the B-complex.

In order to achieve the main purpose of production of a haplotype specific alloantisera, the overall design was to cross-immunize individuals belonging to the same family that only differs with regard to MHC. In any case, some animals received purified white blood cells (WBC) while other ones received purified red blood cells (RBC) from their sibling donors. The "raw antisera" thus produced were subjected to the various kinds of tests mentioned in chapter 3 to obtain products acceptable as specific anti B-F and anti B-G testsera. The final panel is used in a haemagglutination assay on the test population.

In 3 generations the two lines were serotyped. The results are presented in chapter 4. The two lines represent 14 haplotypes which are almost exclusive for those specific lines. In the HPR-line, 5 specific haplotypes and 1 common one were found whereas the HC-line represents 7 specific and 2 ordinary ones. In this line it was possible to identify 95% versus 88% in the HPR-line.

Association between some diseases and MHC is a matter of special interest. The best known example is between Marek's disease and the B-haplotype B21. The way in which this resistance is conveyed is not

clear; investigations considering lymphoid leucosis have not given so clear results as in the case of Marek's disease. In chapter 5 preliminary results concerning the topic in question are stated. In the same chapter, too, preliminary results from a B-haplotype analysis as to 3 sublines selected for individual feed conversion are presented. Results from this investigation will serve as a guidance line in similar studies between B-haplotypes and other production parameters.

An appendix is added at the end of this report giving a detailed introduction into the methods used.

1 INDLEDNING

I slagtekyllingeproduktionen lægges særlig vægt på vækstevne, foderudnyttelse og -forbrug; egenskaber, der alle er dels under indflydelse af flere loci og således afhængig af heritabiliteten, dels under indflydelse udefra (Sørensen et al., 1982; Sørensen, 1986). De nævnte egenskaber har derfor været af særlig betydning i forbindelse med udvælgelse af selektionskriterier i avlsarbejdet. Imidlertid har ønsket om at vægte parametre som sygdomsresistens fundet indpas de seneste år. Major Histocompatibility Complex (MHC) er et eksempel på en kvalitativ egenskab, hvis fænotypiske fremtoning kan føres tilbage til ganske få loci - uafhængig af udefra kommende stimuli, og som kan være relateret til generel sygdomsresistens.

MHC er en genetisk region, der primært er associeret til celle-interaktioner i forbindelse med individets immunsystem; sekundært menes MHC at være koblet til såvel resistens mod patogene sygdomsvoldere som ikke-immunologiske funktioner. Det er disse sekundære egenskaber, der i denne forbindelse har vakt særlig interesse.

Mekanismerne bag MHCs kontrol af egenskaber, der anvendes som avlsmål i slagtekyllingeproduktionen, er ikke éntydige, men to muligheder synes realistiske. For det første kan MHC-kontrollen tillægges en ren immunologisk funktion, hvor tilstedeværelse af patogene mikroorganismer favoriserer resistente MHC-typer (Gavora, 1985); for det andet kan MHC medvirke direkte i non-immunologiske funktioner eller være tæt koblet til gener med indflydelse på sådanne funktioner. Hvis dette er tilfældet, kan man håbe, at visse MHC-alleler er knyttet til fysiologiske parametre med indflydelse på de selekterede avlsmål.

Disse betragtninger dannede grundlag for et projekt, hvis formål var at fastlægge en eventuel sammenhæng mellem MHC og generel sygdomsresistens samt produktionsrettede egenskaber.

Min opgave var først og fremmest at udvikle et testserapanel, der tillod en fuldstændig typning af de to hønseracer: Hvid Plymouth Rock og Hvid Cornish. De to racer dominerer genpuljen bag den danske slagtekyllingeproduktion.

Det fremstillede testserapanel blev anvendt til screening af 3 generationer af slagtekyllinger fra Avlsstationen for Fjerkræ, STRYNØ. De her fundne forskellige vævstyper skal senere indgå i sammenlignende tests under både optimale og modificerede opdrætningsforhold.

2 MAJOR HISTOCOMPATIBILITY COMPLEX

2.1 Generelle træk

MHC er en evolutionær godt bevaret genetisk region, inden for hvilken det er muligt at finde fælles træk med hensyn til både biologi og biokemi hos næsten alle undersøgte arter; her skal blot nævnes 4 vigtige karakteristika.

1) MHC koder for to klasser af membranintegrerede glycoproteiner, der i følge den internationale terminologi (Klein, 1975) betegnes "klasse I-" og "klasse II-antigener" - i denne rapport refererende henholdsvis til MHC-I og MHC-II. Indenfor hver MHC-klasse findes flere former af antigener (allomorfer), der genetisk er forskellige (alleler). Et individs MHC-type eller haplotype refererer til en specifik kombination af MHC-I- og MHC-II-, og for hønen tillige MHC-IV-allomorfer.

Fig. 2.1 illustrerer væsentlige, strukturelle ligheder og forskelligheder mellem MHC-I og MHC-II. Som det ses, består både MHC-I og MHC-II af to polypeptid-kæder, kaldet henholdsvis alpha (α) og beta (β), der ikke er covalent bundet. Kæderne har i den ekstramembranale del en "domænestruktur", bestående af ca. 90 aminosyrerester hver. Denne strukturelle opbygning ses også hos immunoglobulinerne, hvilket kan indikere fælles evolutionær oprindelse; især domænet nærmest membranen har en markant aminosyresekvens-homologi med immunoglobulinernes tungkæde domæner. For såvel MHC-molekylerne som for immunoglobulinerne gælder, at hvert domæne kodes for af et separat exon i genomet (Steinmetz et al., 1983).

Medens MHC-II α - og β -kæderne har to domæner hver, bemærkes det, at α -kæden for MHC-I har 3 domæner, hvorimod β -kæden kun består af ét domæne; dette betegnes også β -2-mikroglobulin. Som det ses af figuren, er β -2m ikke integreret i membranen, men fastholdes indirekte via α -kæden. β -2m er et funktionelt godt bevaret molekyle, da hete-

rologudveksling af β -2m vil give et funktionelt MHC-I molekyle (Simonsen et al., 1983).

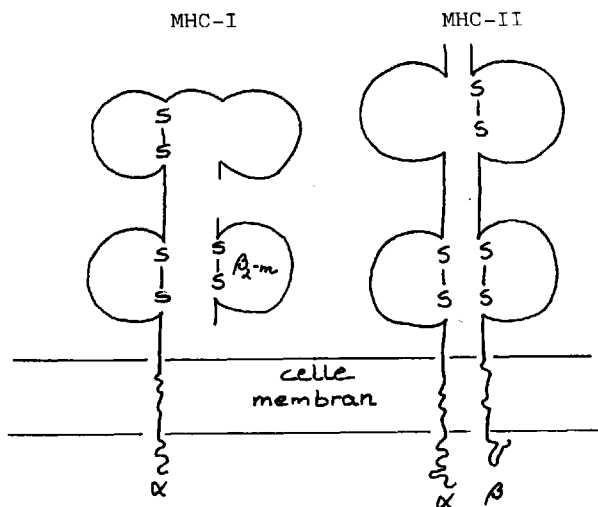


Fig. 2.1 Skematisk illustration af de to klasser af molekyler.

Illustration of the two classes of molecules.

2) MHC-I og MHC-II glycoproteinerne spiller en central rolle for individets cellulære immunrespons, idet de fungerer som restriktions-elementer for T-lymfocytternes skelnen mellem "selv" og "fremmed" (Klein, 1981). Derudover har MHC-molekylerne betydning for det humoral immunrespons; således er kobling mellem MHC og immunrespons(Ir)-gener vist i forbindelse med dannelse af antistoffer mod både naturlige og syntetiske polypeptider (Koch, 1977).

3) MHC-genprodukterne udviser ekstrem polymorfi. Hvorledes denne polymorfi er opstået, fremgår ikke klart, men den menes at have fysiologisk betydning for individet (og arten). Hvis en organisme f.eks. rammes af en virusinfektion, så vil det virale antigen præsenteres i association med værtens MHC-I-produkt (restriktionselement). Et effektivt immunrespons vil afhænge af, om den "rigtige" T-celleklon responderer, eller om denne klon er inaktiveret. Selektionen favoriserer de MHC-alleler, der fører til et højt immunrespons over for den invaderende virus.

4) Der eksisterer en stærk kobling (bindingsuligevægt) mellem de enkelte MHC-regioner, hvilket betyder, at rekombinationsfrekvensen er meget lav. Dette faktum er af stor vigtighed for genotypebestemmelser.

2.2 Den genetiske struktur af hønens MHC

Hønens MHC blev oprindeligt betragtet som et blodgruppelocus ved navn B-locus (Briles et al., 1948); 20 år senere blev det imidlertid klart, at B-locus kunne tilskrives de karakteristika, der er blevet beskrevet i det foregående afsnit. Pink et al. (1977) isolerede først to klasser af molekyler, hvis biokemiske struktur svarede til de mammale MHC-klasser I og II. Antigenerne blev benævnt henholdsvis B-F og B-L. En tredje klasse af molekyler viste sig at være erythrocyt-specifikke antigener, hvis gener var tæt koblet til MHC I og II, denne klasse af molekyler fik betegnelsen MHC-IV, og antigenerne blev benævnt B-G.

Indtil DNA-analyser kan afgøre den præcise organisation af det aviære MHC, er opbygningen beskrevet ud fra såvel genetiske som biokemiske analyser. Imidlertid har det ikke været muligt gennem disse metoder at deducere den præcise organisation af B-komplekset.

For det første er det faktiske antal af klasse I og II loci ikke kendt; for det andet er B-L-regionen og B-F-regionen så tæt koblete, at det igennem mere end 14.000 informative typninger ikke har været muligt at finde overkrydsninger (Koch, 1983; Skjædt, 1985). Dette giver en rekombinationsfrekvens på under 0,05%. Alle hidtil fundne rekombinationer har været mellem B-L/B-F-regionerne og B-G-regionen (Hala, 1976). På basis af disse data er beregnet en genetisk afstand på 0,04 centi morgan mellem B-G-regionen og B-L/B-F-regionerne.

B-F-antigenerne udtrykkes på alle hønseceller og findes i stort antal i membranen af de kerneholdige erythrocytter. Dette forhold kan udnyttes i produktionen af alloantistoffer, idet B-F-antigener provokerer et kraftigt humoralt respons.

Polymorfien af den tunge kæde afspejles i de varierende molekylévægte (MW), fundet hos forskellige B-F-allomorfer fra forskellige racer af homozygote høns (Ziegler et al., 1976). Biokemiske undersøgelser af forskellige B-F-allomorfer indikerer tilstedeværelse af mere end ét B-F-produkt, hvilket kunne antyde eksistensen af mere end et MHC-I-gen (Crone et al., 1985).

B-L-antigener findes på B-celler, celler, der tilhører monocyt/makrofagpopulationen, samt stimulerede T-celler. DNA-analyser ved hjælp af hønse DNA-MHC-II prober viser udpræget polymorfi, og antallet af B-L-gener anslås at være i størrelsesorden 10-12 (Lamont et al., 1987).

Det har ikke været muligt at tillægge B-G-regionen nogen immunologisk funktion, men den tætte kobling til B-L/B-F-regionerne har betydet, at B-G regnes til MHC. B-G-antigenerne er erythroide markører, som dels har fysiologisk betydning ved erythropoiesen og thrombocyternes fagocytose og dels har en adjuvant effekt ved produktionen af allo-antistoffer mod B-F-antigener (Hala, 1981). Den molekylære struktur af B-G-antigenet er stadigvæk ukendt, men molekylet er ikke glycosyleret eller har en domænestruktur som MHC-molekylerne (Salomonsen, 1987).

2.3 Nomenklatur

B-nomenklaturen blev først introduceret, efter at flere laboratorier havde produceret egne antisera i udvalgte flokke og nummereret de fundne allomorfer, således som de blev fundet. Dette betød, at sammenligninger af såvel antisera som haplotyper ikke var mulige de enkelte laboratorier imellem.

I ønsket om at etablere en universal B-nomenklatur blev afholdt et "workshop" i Innsbruck (Briles et al., 1982), hvor "laboratorier" fra Europa og Nordamerika fik lejlighed til at sammenligne og revidere deres materiale, så en ensartet nomenklatur kunne fastlægges.

B-nomenklaturen er adopteret fra et system, der oprindeligt blev anvendt til beskrivelse af de alleliske produkter fra det før omtalte B-blodgruppe-locus (Briles, 1957). B-allelerne nummereres fra B^1 til B^n og de tilsvarende antigener fra B1 til Bn, medens antisera mod disse navngives henholdsvis anti-B1 til anti-Bn. Denne nummerering kan direkte overføres til de enkelte MHC-regioner, da den gametiske association mellem et sæt af B-L, B-F og B-G loci er af en sådan styrke, at rekombinationer mellem de tre loci er meget sjældne. Eksempelvis vil genotypen B6 fænotypisk være karakteriseret af antigenprodukterne B-L6, B-F6 og B-G6.

Til rutineundersøgelser anvendes et hæmagglutinationsassay på hønseerythrocytter (RBC). Ved en sådan test opnås kun information om B-F-

og B-G-produkterne. Imidlertid kan genotypen for en B6-homozygot skrives som B6,6 i stedet for F6,G6/F6,G6, da ovennævnte koblingsforhold retfærdiggør anvendelse af et hæmagglutinationsassay til genotypbestemmelser, når de anvendte testsera er både B-F- og B-G specifikke.

Hovedsagelig er alle de beskrevne haplotyper fundet i racen: Hvid Italiener; dette arbejde vil imidlertid koncentrere sig om B-allelomorfer, fundet i broilerracerne: Hvid Plymouth Rock og Hvid Cornish.

3 METODER TIL KARAKTERISERING AF B-ALLOMORFER

3.1 B-allomorfer i dansk slagtefjerkræ

I de foregående afsnit er MHCs molekulære struktur samt MHC-produkternes immunologiske funktion præsenteret. De følgende afsnit omhandler den praktiske anvendelse af MHC antigenerne (som genetiske markører) i en afgrænset population af udavlet slagtefjerkræ. Imidlertid har det vist sig, at haplotyperne for disse høns afviger væsentligt fra haplotyper fundet hos æglæggere - hovedsagelig af Hvid Italiener afstamning - der har været den foretrukne race til fremstilling af konventionelle typereagenser (iflg. Workshop i Innsbruck, 1981). Derfor har det været nødvendigt først at fremstille typereagenser, der kan diskriminere mellem B-allomorfer i testpopulationen.

Man kan vælge flere metoder til fremstilling af typereagenser. Imidlertid er majoriteten af de typereagenser, der anvendes på fjerkræ, alloantisera. De her fremstillede alloantisera fremkommer gennem gentagne immuniseringer med en kendt mængde af "antigen"; i dette tilfælde: Lymfocytter eller erythrocytter fra donorhane til recipienthøne (appendix A). Celleoverfladens antigen (inkl. MHC-produkterne) fremprovokerer et immunrespons, der er sammensat af mange B-cellekloners respons mod flere antigendeterminanter (polyklonalt respons). Det "rå" alloantiserum indeholder både relevante (anti-B) antistoffer og irrelevante non-B-antistoffer.

Non-B-antistoffer må først fjernes (absorberes) (appendix C) fra alloantiserum, førend dette kan anvendes til B-typebestemmelser. I udavlede flokke er det praktisk talt umuligt. Derfor blev forsøget indledt med etablering af små afgrænsede familier, hvori de udvalgte recipienter og donorer kun segregerede i MHC forskellige grupper (N og M). På denne måde kunne non-B-antistoffer fjernes fra anti-N-serum gennem absorption med erythrocytter fra gruppe M og omvendt. Fig. 3.1.

Foruden absorption for non-B-antistoffer er det nødvendigt i videst mulige omfang at fjerne krydsreaktive antistoffer. MHC-produkternes komplekse proteinstruktur fremstår som en mosaik af antigendeterminanter for recipientens immunsystem.

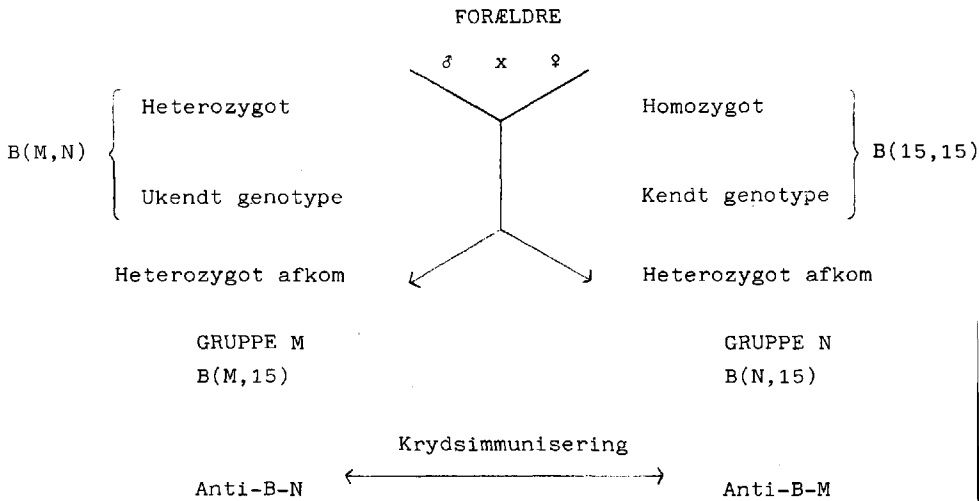


Fig. 3.1 Oprettelse af hanefamilie

Establishment of scheme for cock families

Nogle antigendeterminanter vil være fælles for andre MHC-molekyler, men alle molekyler indeholder unikke områder (specifikke determinanter). De krydsreaktive antistoffer er rettet mod fælles-determinanter og vil kunne fjernes gennem absorption med haplotyper, der også indeholder dem.

Ofte finder man, at et alloantiserum reagerer monospecifikt over for ét panel af haplotyper, medens det mod et andet giver flere krydsreaktioner. Det er derfor vigtigt at kende de "rammer", inden for hvilke et typeserum er monospecifikt. Eksempelvis kan nævnes, at det fremstillede typeserapanel hovedsagelig består af monospecifikke alloantisera, rettet mod allomorfer, fundet i Hvid Plymouth Rock og Hvid Cornish, medens det sandsynligvis ikke vil opføre sig monospecifikt over for en population af Brun Italiener.

Det største udbytte af serologiske reagenser får man, når de kun er rettet mod én klasse af MHC-produkter. Alloantisera mod B-F produktet fås ved at immunisere med lymfocytter, hvorimod alloantisera mod B-G antigener fås ved at immunisere med erythrocytter; dette vil dog give kontaminering med B-F antistoffer. Sådanne forurenende antistoffer kan være vanskelige at få bortabsorberet, hvis ikke donor lymfocytter, milt- og thymusceller anvendes. Erythrocytter fra rekombinante haplotyper, hvor donor og recipient besidder samme F-allel, er særlig anvendelige i dette tilfælde.

De færdig absorberede reagenser er anvendt i et hæmagglutinationsassay (se appendix D) på materiale fra Avlsstationen STRYNØ.

De informationer, som man får via et hæmagglutinationsassay, er udelukkende om B-F og B-G allomorferne. Information om B-L allomorfer fås gennem histogenetiske tests - f. eks. Graft v. Host assays (GvH) og Mixed Lymphocyte Reaction (MLR).

GvH-reaktioner måles som miltforstørrelser, observeret hos 19 dage gamle embryoner efter i.v. injektion af donor fuldblod 5 dage tidligere. Den observerede splenomegali er resultatet af de immunokompetente donorcellers (T-lymfocytter) reaktion på den umodne vært på grund af MHC-II-forskellen.

GvH-reaktioner kan også give vigtige informationer vedrørende MHC-I-forskelle. I dette tilfælde anvendes et GvH-inhibitionsassay, hvor der gøres brug af det faktum, at alloantisera, der indeholder

antistoffer mod et bestemt MHC-I antigen, specifikt vil hæmme T-lymfocytalloaggressionen. Resultatet af et sådant GvH-inhibitionsassay kan tolkes på to måder: GvH-inhibition er et mål for, at testcellerne har antigendeterminanter til fælles med den af alloantiserum definerede haplotype. GvH-inhibitionen skyldes krydsreagerende antistoffer, der findes i det benyttede alloantiserum.

Endnu en test er nødvendig for at kunne afgøre, hvilken af de to fortolkninger, der er mest sandsynlig.

De GvH-inhæberende alloantistoffer kan naturligvis fjernes gennem absorption med donorererythrocytter i et såkaldt GvH-inhibition-release assay. Hvis erythrocytter fra en testhaplotype på lignende måde kan fjerne alle inhæberende antistoffer, kan det konkluderes, at der er "MHC-I-lighed" mellem de to haplotyper. GvH-forsøgene blev udført i overensstemmelse med de forsøg, der er beskrevet af Simonsen et al. (1982) (se appendix E).

MLR forekommer, når to genetisk forskellige T-cellepopulationer bringes i kontakt med hverandre. Stimulationen mellem de to T-cellepopulationer fører til proliferation, som måles ved inkorporering af radioaktivt thymidin i det nysyntetiserede DNA; de stimulerende antigener er MHC-II-produkter. Den benyttede procedure er beskrevet af Schou, M. (1980) (se appendix F).

3.2 Etablering af hanefamilier

Testpopulationen består, som tidligere nævnt, af liniemateriale fra Avlsstationen STRYNØ. Arbejdet har hovedsagelig været koncentreret om linie 74 - Hvid Plymouth Rock - og linie 85 - Hvid Cornish; for en uddybende beskrivelse af liniematerialet henvises til Beretning nr. 536 (1982).

Forsøget startede med en vejledende hæmagglutinationstest af avlshæner med konventionelle alloantisera, fremstillet på Institut for Eksperimentel Immunologi (Simonsen, 1982).

De udvalgte avlshaner blev overført til kontrolstationen, Favrholm, hvor hver hane blev parret med 3 Hvid Italiener høner fra Favrholm kontrollinie 8, der var fænotypisk B-homozygot, bærende enten B-15 eller B-19. På denne måde kunne fædrenes 2 MHC-kromosomer genfindes i afkommet på enten B-15 eller B-19 "baggrund". "Hanefamilierne", der hver bestod af 20-30 dyr, blev typebestemt efter samme panel som deres fædre; det viste sig, at hver familie segregerede i 2 grupper (M og N).

Tabel 3.1 Agglutinationsmønster for broileravlshaner og deres afkom
Agglutination patterns of breeding males and their offspring

Mor B-fænotype	Hane nr.	Far B-fænotype	Afkomsgrupper (M) (N)	
B15/15	1	B6/Y	B6/15-1	By/15-1
	2	B6/838	B6/15-2	B838/15-2
	3	B1223/838	B838/15-3	B1223/15-3
	4	B1223/101	B1223/15-4	B101/15-4
B19/19	5	B6/101	B6/19-5	B101/19-5
	6	B13/21	B13/19-6	B21/19-6
	7	B21/204	B21/19-7	B204/19-7

Tabel 3.1 viser resultatet af dette hæmagglutinationsassay med angivelse af fædre og afkoms B-fænotyper efterfulgt af hane nr. Fænotypen er "bestemt ud" fra den positive reaktion med et B-F alloantiserum. Denne fremgangsmåde er valgt, fordi typning med både B-F og B-G reagenser gav et afvigende agglutinationsmønster; f.eks. agglutinerede RBC fra hane nr. 1 med anti F-6 serum, men ikke med anti G-6 serum. Afkom fra denne hane resulterede i gruppe (M): Agglutination med anti F-6, anti F-15 og anti G-15 samt gruppe (N): Agglutination med flere B-F reagenser (BY) samt anti F-15 og anti G-15.

Reaktion med flere B-G reagenser illustrerer, at den pågældende allomorf har flere fællesdeterminanter med andre allomorfer, og at der ikke findes et monospecifikt alloantiserum i dette typeserumpanel. Det bemærkes, at flere afkomsgrupper reagerer med samme B-F reagens og får samme B-F fænotype. Denne foreløbige identifikation giver

ingen evidens for, at B-F fænotypen i de pågældende afkomsgrupper er identiske med B-F genotypen. Derfor blev alle afkomsgrupperne afprøvet i et GvH-assay, som giver mere præcis information vedr. B-F produktet.

Tabel 3.2 viser henholdsvis et GvH-inhibitionsassay og et direkte GvH-forsøg. I inhibitionsassay'et er de MHC-I-specifikke antisera, der blev anvendt i hæmagglutination, absorberet med testtypens RBC. Det absorberede serum og donorlymfocytter er dernæst injiceret i ikke-histokompatible embryoner.

Splenomegali (++) betyder, at testtypens RBC udtrykker MHC-I antigener, identiske med donorlymfocytterne. Som det ses af tabel 3.3, er der histogenetisk identitet mellem flere afkomsgrupper for MHC-I-antigener. I forsøget med direkte forlig anvendes fuldblod fra testtypen, injiceret i histokompatible embryoner. Fravær af splenomegali betyder, at testtypen har MHC-II antigenlighed med embryonet. Imidlertid giver GvH forsøgene ikke information vedr. alle hanegenotyperne, idet embryoner som dækker alle haplotyper ikke er til rådighed. Derfor er det nødvendigt at anvende et MLR-assay i de tilfælde, hvor afkomsgrupper fra forskellige haner giver ophav til samme B-F fænotype.

Tabel 3.3 viser et MLR-forsøg, hvori 4 afkomsgrupper blev udvalgt og testet over for hverandre. Høje SI-værdier angiver MHC-II-forskelligheder, hvorimod de lave betyder MHC-II-ligheder (muligvis identitet). Det erindres, at der i alle forsøg arbejdes med udavlede høns, hvorfor der vil være forskel på andre loci end B; derfor vil man observere en svag stimulation mellem søskende.

To dyr - numrene 671 og 661 - viser intet signifikant respons på stimulation fra hønerne 551 og 547 og omvendt; og det samme forhold gælder for de 4 andre dyr. MLR-forsøget og GvH analyserne indikerer således haplotypeidentitet med hensyn til MHC-I og MHC-II for de testede afkomsgruppers vedkommende.

Tabel 3.2 Histogenetisk analyse af afkomsgrupper
Graft versus Host assays of 13 off-spring groups

Afkomsgr. nr.:	GvH - IR Alloantisera, specifikt								GvH - R Embryon fænotype			
	B6	F838	F1223	Bw5	B101	B21	B13	B204	B6	B13	B15	B21
B6/15-1-501								-	++	++	-	++
B6/15-2-539	++								-	++	-	++
B838/15-2-671		++										
B1223/15-3-542			++	++								
B838/15-3-551		++							++	++	-	++
B1223/15-4-574			++	++					++	++	-	++
B101/15-4-585					++				++	++	-	++
B6/19-5-566	++								-	++	++	++
B101/19-5-567					++							
B21/19-6-527						++			++	++	++	-
B13/19-6-521							++		++	-	++	++
B21/19-7-653						++						
B204/19-7-650								++	++	++	++	++
NON - ABS.	-	-	-	-	-	-	-	-				
Celler	++	++	++	++	++	++	++	++				

GvH - IR (++) = Miltforstørrelse

GvH - R (++) = Miltforstør.

Figuren viser GvH-IR test af 8 testsera abs. med afkom fra 13 familiegrupper. De 8 testsera er individuelt abs. med RBC fra de pågældende numre. Disse dyr har desuden fungeret som donorer i en GvH-test med B6, B13, B15 og B21 embryoner. Rækkerne nr. 14 og 15 er kontrol på henholdsvis testserum og immunokompetente lymfocytter.

Tabel 3.3 Stimulationsindeks fra et MLR-forsøg med 8 repræsentanter fra 4 afkomsgrupper
One way MLR representing 8 animals from 4 off-spring groups

Stimulator	B838/15-2		B1223/15-3		B838/15-3		B1223/15-4	
	(671)	(661)	(542)	(543)	(551)	(547)	(574)	(576)

Responder:								
B838/15-2 (671)	1,00	0,86	8,24	6,57	0,48	0,96	9,39	9,87
(661)	1,61	1,00	30,86	48,28	0,98	0,58	71,19	15,40
B1223/15-3(542)	9,84	3,93	1,00	1,32	13,90	2,33	1,73	0,93
(543)	14,01	4,26	0,49	1,00	20,45	4,00	0,91	0,51
B838/15-3 (551)	0,78	1,11	16,18	22,12	1,00	0,52	31,76	22,80
(547)	1,14	0,92	3,97	6,54	0,78	1,00	10,16	5,33
B1223/15-4(574)	17,67	11,12	0,97	2,36	17,32	6,81	1,00	1,31
(576)	26,38	8,15	1,09	1,25	29,58	5,28	1,23	1,00

Til fremstilling af testserapanel blev donorer valgt ud fra de her testede afkomsgrupper.

3.3 Fremstilling af alloantisera til identifikation af to avlslinier

Hæmagglutinerende alloantisera blev inden for hver hanefamilie fremstillet ved én gang ugentlig i.v. injektion af en standardiseret suspension af enten WBC eller RBC (se appendix A). Recipienterne blev tappet for blod, og det afpipetterede alloantiserum blev herefter absorberet for non-B. I videst mulige udstrækning blev anvendt en pool af vaskede RBC fra 10 B-negative søskende.

De non-B absorberede alloantisera blev herefter delt i to grupper og hver for sig testet i GvH for inhiberende antistoffer; den ene gruppe bestod af potentielle B-F antisera, der hovedsagelig var fremstillet ved immunisering med WBC, hvorimod den anden bestod af potentielle B-G antisera (immuniseringer ved hjælp af RBC).

De potentielle B-F antisera blev testet i GvH-inhibition, idet hvert serum blev individuelt absorberet med RBC fra B-positive søskende. Hvis de inhiberende antistoffer blev fjernet, antog man, at serum var rettet mod B-F antigener; i modsat fald var testserum rettet mod irrelevante antigener og blev følgelig kasseret.

Dernæst blev hvert alloantiserum testet i hæmagglutination i den fundne inhiberende titer over for et panel af RBC fra Hvid Italiener

og repræsentanter fra alle familiegrupper. De positive krydsreaktioner blev testet i GvH ved absorption af alloantiserum med den pågældende haplotypes RBC.

I de tilfælde, hvor antiseraspecificiteten blev skærpet efter den pågældende absorption, d.v.s. kontaminerende inhiberende antistoffer fjernet, blev hele puljen af testserum absorberet og derpå testet igen. På denne måde fremkom et panel af B-F typereagenser, der i stor udstrækning var monospecifikke over for det anvendte typepanel.

De potentielle B-G antisera blev ligeledes testet i hæmagglutination, men i den koncentration, som ikke virkede inhiberende i GvH. Ligeledes blev antiseraspecificiteten søgt skærpet ved hjælp af absorptionsreaktioner med RBC fra krydsreagerende haplotyper.

Reaktionsmønsteret med det færdige panel af typereagenser er vist i Tabel 3.4. Den hidtil anvendte fænotypebetegnelse erstattes nu af en provisorisk haplotype, da det, som det tidligere nævnte koblingsforhold, sandsynliggør, at B-fænotypen er identisk med B-genotypen. Haplotypen er karakteriseret ved hjælp af dels de fremstillede typereagenser mod B-F og B-G antigenerne, dels reaktioner med andre haplotyper.

I tabellen er angivet, hvilken titer der anvendes i hæmagglutinations-test og i GvH. Den sidste kolonne viser, med hvilke andre alleler den pågældende haplotype har antigendeterminantligheder. Kun i ét tilfælde er hele haplotypen unik (B125); i andre tilfælde er det enten B-F eller B-G allelen, der er unik (B123, B128, B121). Oftest er agglutinationsmønsteret en mosaik af kendte og ukendte allelkombinationer. I de angivne tilfælde er det ikke muligt at fjerne krydsreaktionen uden samtidig at fjerne reaktionen over for donorhaplotypen. Dermed være ikke sagt, at de pågældende alleler er identiske med donorens, men at de anvendte polyklonale testsera genkender antigendeterminanter hos de implicerede haplotyper, der er ens.

Data vedrørende allelidentitet vil først være tilgængelig, når RFLP (Restriction fragment length polymorphism) analyser er udført på hver enkelt haplotype for alle MHC-loci. Allelidentitet kan indtil da ikke udelukkes, men da rekombinationer inden for MHC-kompleksets B-F og B-G alleler er meget sjældne, er der sandsynligvis tale om antigendeterminantligheder mellem de nye allomorfer og allomorfer, fundet i Hvid Italiener populationer.

Tabel 3.4 Karakteristik af typesera til typning af Hvid Plymouth Rock (linie 74) og Hvid Cornish (linie 85)

Characterization of typing sera used to serotype White Plymouth Rock (Line 74) and White Cornish (Line 85)

Afkoms- gruppe Fænotype	Proviso- risk haplotype	Fremstil- lede type- reagenser	Positivt reage- rende haplotyper (++) Aggl.	Konc.	Inhibition i GvH	Haplotype- karakteris- stik
B101/-	B121	á F121 á G121	B101; B121 B121	1:3 1:8	++ -	F101, G121
B838/-	B123	á F123 á G123	B123 B123; B7	1:10 1:8	++ -	F123, G7
B204/-	B124	á F124 (á G124)	B204; B124 B204; B124	1:8 1:8	++ ++	F204, G204
B1223/-	B125	á F125 á G125	B125 B125	1:10 1:8	++ -	F125, G125
B6/-	B126	á F126 á G126	B6; B126; B127 B9; B126	1:10 1:20	++ -	F6, G9
B6/-	B127	á F127 á G127	B6; B126; B127 Bw3; B127	1:20 1:40	++ -	F6, Gw3
	B128	á F125 á G19	B125; B128 B128; B19			F125, G19
BY/-	B129	á F129 á G129	B4; B13; B12; B129 B6; B129	1:4 1:15	++ -	F13, G6
B21/-	B130	á F130 á G130	Bw1; B130 Bw1; B130	1:5 1:30	++ -	F21, Gw1
	B131	á F131	B1; B5; B7; B21; B130; B131	1:10	++	F21, G126
	B132	á F132	B4; B13; B132	1:5	++	F13, G?
	B133	á F133	B133	1:20	++	F133, G13
	B134	á F134	B2; B12; B134	1:10	++	F12, G?
	B122	á B122	B122	1:50		

Det fremstillede typeserapanel er først blevet afprøvet i en afkoms-test, hvori hvert testserum er afprøvet over for afkom af bror/søsterparringer inden for hver haplotype. På denne måde sikrer man, at panelet faktisk er rettet mod B-komplekset.

For at afgøre "rækkevidden" af det nye testserapanel, er dette blevet afprøvet over for 3 generationer af Hvid Plymouth Rock og Hvid Cornish. Målet er at kunne identificere mindst 95% af disse populationer.

Under afprøvning af testserapanelet viste det sig, at populationerne indeholdt flere ukendte haplotyper; de fik de provisoriske betegnelser: B131, B132, B133, B134 og B122. Der blev forsøgt rejst B-F alloantistoffer mod de nye haplotyper gennem skin-grafting (se appendix B), efterfulgt af i.v. immuniseringer med WBC. Alloantisera blev derefter testet efter samme metode, som de foran omtalte testsera. Viden om disse haplotyper er stadig utilstrækkelig, hvorfor nye immuniseringer er planlagt.

4 HÆMAGGLUTINATIONSANALYSE AF TO AVLSLINIER

Det fremstillede testserapanel er anvendt dels til identifikation af blindprøver fra de 2 avlslinier: Hvid Plymouth Rock 74 og Hvid Cornish 85 fra Avlsstationen STRYNØ, dels til udvælgelse af forældredyr til et haplotypekontrolpanel, lokaliseret på Forsøgsanlæg Foulum.

Kontrolpanelet tjener flere formål: For det første benyttes panelet som en positiv kontrol over for de testsera, der anvendes til blindprøverne; for det andet leverer kontrolpanelet donorer og recipienter til fremstilling af nye testsera; for det tredje anvendes kontrolpanelet til histogenetiske og molekylære analyser af hver enkelt haplotype.

I alt 2365 blindprøver er afprøvet med testserapanelet. Blindprøverne fordeler sig på 3 generationer af avlsdyr fra 1985, 1986 og 1987 og heraf repræsenterer 1306 individer linie 74.

4.1 Fordeling af B-haplolyper i 3 generationer af Hvid Plymouth Rock

I 1985 blev 52 hanekyllinger og 325 hønekyllinger typet; i 1986 fordelte prøverne sig mellem de to køn som 142/342, og i 1987 var forholdet 98/343.

Tabel 4.1 viser fordelingen af B-haplolyper i hver af de 3 generationer samt det samlede antal dyr, der deltog i afprøvningerne. Eftersom de to MHC-kromosomer er kodominante, vil produkterne af de to B-komplekser blive udtrykt som to "hele" haplolyper (én fra hver forælder), bestående af ét L-, F- og G-produkt fra hvert kromosom.

Tabel 4.1 B-haplotyfefrekvenser i 3 generationer af Hvid Plymouth Rock, linie 74
 B-haplotype frequency in 3 generations of White Plymouth Rock, line 74

År	Antal	Haplotyper							χ^2 (p)
		B121	B123	B125	B127	B128	B129	BY	
1985	(377)	127	197	74	87	37	105	4	
	f	0,3369	0,5225	0,1963	0,2308	0,0981	0,2785	0,0106	
	p	0,1857	0,3090	0,1035	0,1229	0,0503	0,1506	0,0053	0,9273
1986	(488)	178	295	26	93	59	105	4	
	f	0,3648	0,6045	0,0533	0,1906	0,1209	0,2152	0,0082	
	p	0,2030	0,3711	0,0270	0,1003	0,0624	0,1141	0,0041	0,8860
1987	(441)	106	215	135*)	121	ND	77	15	
	f	0,2404	0,4875	0,3061	0,2744	-	0,1746	0,0340	
	p	0,1284	0,2841	0,1670	0,1482	-	0,0915	0,0171	0,8363
	(1306)	411	707	331	301		287	23	
	p	0,1722	0,3228	0,1360*)	0,1228	-	0,1167	0,0088	0,8793
f = den fænotypiske frekvens for det i'te gen p = den genotypiske frekvens for det i'te gen * = sum af både B125- og B128-individer									

Imidlertid bør man være klar over følgende forhold, når man bruger et hæmagglutinationsassay: For det første er det ikke teknisk muligt at afgøre, om det er én haplotype, der udtrykkes i dobbelt dosis (homozygot individ), eller om den ene haplotype er "stum" (et heterozygot individ med en kendt allel). For det andet giver metoden ingen information vedrørende L-produktet respektivt produkterne, da den cellulære komponent er RBC; i denne forbindelse skal man ligeledes erindre, at antallet af F- og G-produkter er ukendte, eftersom antallet af gener er ukendt, indtil DNA-analyser er udført. For det tredje giver metoden ingen mulighed for at detektere molekulære ændringer - så som overkrydsninger. Rekombinationshændelser inden for B-komplekset er, som allerede nævnt, sjældne, men en sådan hændelse ville i givet fald først blive opdaget i næste generation.

Blandt de typede prøver fra linie 74 er 23 individer opført i kolonnen BY, hvilket henfører til at begge MHC-kromosomer er "stumme". Genotypen for disse individer betegnes BY. Tilstedeværelse af ukendte haplotyper i populationen vil betyde, at en del tilsyneladende homozygote i virkeligheden er heterozygote, hvor én kendt B-haplotype er associeret til en stum haplotype.

Omfanget af skjulte heterozygoter er ukendt, men under antagelse af "Hardy-Weinberg-ligevægt" er frekvensen af BY $0,13 \pm 0,02$, hvilket antyder, at andelen af homozygote, som i virkeligheden er heterozygote, er lille. Imidlertid betyder tilstedeværelse af "BY", at udregning af genfrekvenserne må foretages på grundlag af "kvadratrodsformelen": $1 - p_1 = \sqrt{R}$, hvor p_1 er frekvensen af det i'te gen, og R er proportionen af individer, der ikke besidder det i'te gen, hvilket i dette tilfælde er den fænotypiske frekvens af disse individer.

Usikkerheden ved anvendelse af "kvadratrodsformlen" forstærkes med et voksende antal af BY, fordi skjulte heterozygote regnes som kendte homozygote, og disse vægtes ikke, da udgangsværdierne er baseret på fænotypiske observationer. Dette forhold afspejles i (p), som divergerer væsentligt fra 1,00 i 1987-generationen.

Hvad angår det anvendte testserapanel, så har dette været i stand til at identificere hovedparten af alle F- og G-alleler i populationen, således at den serologiske fænotype kan betragtes som individets haplotype, d.v.s. at alle individer, der tilskrives en B-haplotype, reagerede med et sæt af F- og G-antisera.

På denne måde er der i L 74 identificeret 5 haplotyper: B121; B123; B125; B127; B128 og B129. B128 adskiller sig fra B125 ved at agglutinere med anti-G19-serum. Dette antiserum er fremstillet på Institut for Eksperimentel Immunologi i Hvid Italiener og er sammen med anti-F19 rettet mod B19-haplotypen, der er særdeles hyppig i høns af æglægningstypen (Simonsen et al., 1982). Desuden bemærkes, at i 1987-generationen skelnedes ikke mellem B125 og B128, hvorfor de typede 135 individer repræsenterer både B125 og B128. Haplotypebetegnelsen "BY" dækker over de ialt 23 dyr, der hverken har reageret med antisera fra dette panel eller testsera, rettet mod kendte haplotyper fra æglæggere. Der er forsøgt frembragt antisera mod BY gennem immunisering med fuldblod fra en heterozygot BY-donor i homozygote søskende. Ved hjælp af dette testserum var det kun muligt at type 2 ud af de 15 dyr fra 1987 generationen; BY må derfor repræsentere mere end én haplotype.

På grundlag af de 3 generationer er der udregnet en total haplotypefrekvens for de fem kendte haplotyper samt BY. Fluktuationer mellem disse værdier og frekvenserne fra de enkelte år er så små, at de kan tilskrives genetisk drift. L 74 er domineret af B123 haplotypen, som er repræsenteret i godt og vel en trediedel af populationen, medens B121; B125 + B128; B127 og B129 hver især næsten indgår med lige store andele.

4.2 Fordeling af B-haplotyper i 3 generationer af Hvid Cornish

Hvad angår L 85, så blev der i alt typet 1059 individer, og heraf udgør 1985-generationen 27 hanekyllinger og 122 hønniker; i 1986 var forholdet 131/295 og i året 1987 152/332. Tabel 4.2 gengiver haplotypefrekvenserne fra hver årgang samt den vægtede gennemsnitlige frekvens over år.

Tabel 4.2 B-haplotyfefrekvenser i 3 generationer af Hvid Cornish, linie 85
 B-haplotype frequency in 3 generations of White Cornish, line 85

År	Antal	B 121	B 124	B 126	B 130	B 131	B 132	B 133	B 134	B 13	$\Sigma (p)$
1985 (149)		27	15	60	83	25	3	16	11	24	
	f	0,1812	0,1007	0,4027	0,5570	0,1678	0,0201	0,1074	0,0738	0,1611	
	p	0,0951	0,0517	0,2271	0,3345	0,0877	0,0101	0,0552	0,0376	0,0841	0,9831
1986 (426)		13	18	145	275	102	20	36	29	70	
	f	0,0305	0,0423	0,3404	0,6455	0,2394	0,0469	0,0845	0,0681	0,1643	
	p	0,0154	0,0214	0,1878	0,4046	0,1279	0,0238	0,0432	0,0346	0,0858	0,9445
1987 (484)		8	32	180	346	119	13	8	36	45	
	f	0,0165	0,0661	0,3719	0,7149	0,2459	0,0269	0,0165	0,0744	0,0930	
	p	0,0083	0,0336	0,2075	0,4660	0,1316	0,0135	0,0083	0,0379	0,0476	0,9544
(1059)		48	65	385	704	246	36	60	76	139	
	p	0,0229	0,0312	0,2022	0,4210	0,1238	0,0171	0,0287	0,0366	0,0679	0,9514

Linie 85 indeholder 9 haplotyper, der alle kan identificeres, hvilket ikke var tilfældet i L 74; 7 af de 9 er nye haplotyper, der kun findes i L 85. B121 genfindes i L 74, og B13 er, som førmtalte B19, en haplotype, der er almindelig i Hvid Italiener. B13-individerne er fundet ved hjælp af testsera fremstillet på Institut for Eksperimentel Immunologi. De to haplotyper B130 og B131 har i GvH-analyser vist identitet med hensyn til F-allelen (tabel 5.1); derudover er der identitet mellem G131 og G126, hvilket kunne antyde, at B131 er opstået gennem en overkrydsning mellem B130 og B126 F- og G-loci.

Haplotypefrekvenserne for B131 er jævnt stigende fra år til år, det må derfor formodes, at overkrydsningen har stabiliseret sig i populationen, og at den således har vist sig at være gunstig for de pågældende individer. En nærmere gennemgang af de B130-lignende-haplotyper præsenteres i næste afsnit.

Ligesom i linie 74 kan bevægelser i haplotypefrekvenserne fra år til år tilskrives genetisk drift; linien er helt domineret af B130; B131 og B126, der repræsenterer 75% af genpuljen, hvorefter de godt 40% er B130 individer.

5 VURDERING AF DE OPNÅEDE RESULTATER

I nærværende beretning er MHC-produkterne blevet anvendt som genetiske markører i en vævstypeanalyse af 2 avlslinier af broilertype. Målet med analysen var:

- at fremstille et panel af antistoffer, der var i stand til at skelne mellem populationens forskellige B-allomorfer
- at anvende de opnåede resultater til associationsstudier i relation til genetisk sygdomsresistens og produktionsrettede parametre.

5.1 Alloantiserapanelets rækkevidde

Med hensyn til det første delmål har vævstypning for MHC-I og MHC-IV produkterne igennem 3 generationer vist, at det fremstillede testserapanel kan identificere omkring 90% af Hvid Plymouth Rock-linien og 95% af Hvid Cornish-linien.

For kl.II-produktets vedkommende har det ikke været muligt at identificere det ved hjælp af klassiske serologiske metoder. Den fremtidige typning for MHC-II vil sandsynligvis blive baseret på RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) af det aviære genom under anvendelse af aviære-MHC-II-prober. Foreløbige undersøgelser med human-MHC-II- β -probe (Anderson et al., 1987) og aviær-MHC-II-probe (Lamont et al., 1987) har vist, at serologisk forskellige MHC-I-allomorfer også er forskellige med hensyn til MHC-II. Under anvendelse af en aviær-MHC-II-probe bliver opløseligheden væsentlig bedre, hvorfor båndmønsteret for hver MHC-II-allel splittes op i flere bånd. Det heraf estimerede antal MHC-II-gener er i størrelsesordenen 10-12 (Lamont et al., 1987).

5.2 MHC og relationer til aviær leukose

Med hensyn til det andet delmål - så har de foreløbige resultater ført til tiltag i begge retninger; i forbindelse med genetisk sygdomsresistens har arbejdet været koncentreret om aviær leukose.

Subkliniske infektioner kan føre til reduktion i såvel immunrespons som egenskaber med avlsmæssig relevans.

Data fra to infektionsforsøg er under behandling (Hedemand, SH); det første forsøg blev baseret på en syntesepopulation af både Hvid Plymouth Rock og Hvid Cornish oprindelse, hvor hver haplotype blev væg-
tet tilnærmelsesvis lige meget. De MHC-typede dyr blev delt i en kontrolgruppe og en gruppe, der blev udsat for en forhøjet dosis af naturligt forekommende vira (oral infektion).

I det andet forsøg blev anvendt laboratoriestammer (Rous sarcoma virus), repræsenterende to subgrupper; på denne måde er det muligt at relatere de opnåede resultater direkte til én virusfænotype, hvilket ikke var muligt i det første forsøg. I dette forsøg blev de MHC-type-
de dyr direkte påført virus (injektion i vingehuden).

Resultatet af dette forsøg antyder, at dyr, der udvikler sarcom, for-
trinsvis tilhører samme haplotype, og at udviklingen er subgruppe
specifik. (Personlig kommunikation, Jan Hedemand).

5.3 MHC i forbindelse med Marek's disease

Marek's disease (hønselammelse) er resultatet af en oncogen herpesvi-
rusinfektion, der indtil 1968 forårsagede elimination af hele popula-
tioner af dyr. I begyndelsen af 1970'erne påbegyndtes vaccination
især med HVT (kalkun herpesvirus), der forhindrede epidemiske udbrud
af MD. Imidlertid har flere undersøgelser fra den pågældende periode
og senere vist, at dyr, der er fænotypisk B21, er naturligt resisten-
te mod MD.

Undersøgelser af rekombinanter, der adskiller B-L/B-F-regionen fra
B-G-regionen, har vist, at MD-resistens er korreleret til B-L/B-F-re-
gionen, men hvilken af disse to regioner, der er ansvarlig, er stadig
ikke afklaret.

Det er lykkedes at "isolere" 4 varianter af B21-haplotypen med hensyn
til MHC-I og MHC-IV (tabel 5.1) og opformere dette dyremateriale, som
kan anvendes i en challenge test.

B130 og B131 er fundet i Hvid Cornish-materialet, B21 stammer fra
Hvid Italiener, og BW1 en en hybrid af Red Bankiwa chicken.

Tabel 5.1 Serologisk typning og GvH-tests af B21-lignende haplotyper i forskellige stammer

Serological typing and Graft v. Host tests of B21 like haplotypes in different strains

Haplotype	Specifikation af test sera							*)Middellog. af embryomiltvægt i	
	F130	G130	F21	G21	GW1	G12	G126	B21/21	B15/15
B130	++	++	++	-	++	++	-	1,32 ± 0,13	1,93 ± 0,28
B131	-	-	++	-	-	-	++	1,65 ± 0,08	2,17 ± 0,11
B21	-	-	++	++	-	-	-	1,25 ± 0,14	2,10 ± 0,22
Bw1	++	++	++	-	++	-	-	1,32 ± 0,17	1,99 ± 0,19

*) Middelvægt af 6 B-homozygote embryomilte.

Mean weight of 6 B-homozygotes embryo spleens.

De 4 varianter er serologisk karakteriseret, og i stor udstrækning viser varianterne forlig i B21-embryoner. Foreløbige undersøgelser med en aviær MHC-II- β -probe har vist, at de F21-lignende produkter faktisk kan skelnes fra hverandre med hensyn til L (Simonsen et al., 1988). Spørgsmålet bliver dernæst, om en challenge-test også diskriminerer mellem de 4 varianter.

5.4 Fordeling af B-haplotyper i 3 linier selekteret for foderudnyttelse

Sammenhænge mellem produktionsrettede faktorer og MHC må betegnes som endnu mere kontroversiel end ovennævnte relationer. Imidlertid er der allerede taget skridt i denne retning i form af MHC-I- og MHC-IV typning af 3 selektionslinier af følgende oprindelse: Med basis i linie 85 etablerede man i 1980 3 nye sublinier: 86, 87, 88; og disse linier blev anvendt i et selektionsforsøg, hvis formål var at undersøge effekten af selektion for foderudnyttelse.

I en periode på 21 dage, begyndende ved en alder på 18 dage, blev kyllingerne registreret for individuel foderoptagelse samt tilvækst i følge anførte skema:

Linie	Selektionskriterium	Foder	Opdræt.form
86	Foderudnyttelse	Normalt	Bur
87	Foderudnyttelse	Reduceret proteinindhold	Bur
88	Tilvækst	Normalt	Gulv

Linie 85 holdes efter samme kriterier som 88. (Sørensen et al., 1982. Beretning nr. 536). De pågældende linier er opretholdt i 7 generationer efter samme skema. 1986-generationen er blevet MHC-typet og sammenlignet med L85 fra samme årgang (tabel 5.2). Umiddelbart antyder tabellen, at diversiteten indsnævres i de 3 sublinier, hvad angår haplotyper. Man skal dog ikke lægge for stor vægt på de angivne frekvenser, dels fordi den oprindelige population fra 1980 er ukendt, dels fordi de selekterede linier repræsenterer en lille population, i hvilken man ikke kan udelukke genetisk drift og nogen grad af indavl.

Tabel 5.2 B-haplotyfefrekvenser i 4 linier; 2 selekteret for foderudnyttelse fra årgang 1986
 B-haplotype frequency in 4 lines; 2 selected for feed conversion. Data from 1986

Li.(ant.)	B121	B124	B126	B130	B131	B132	B133	B134	B13	BY	$\bar{x}$ (p)
85 (426)	13	18	145	275	102	20	36	29	70	-	
f	0,0305	0,0423	0,3404	0,6455	0,2394	0,0469	0,0845	0,0681	0,1643	-	
p	0,0154	0,0214	0,1878	0,4046	0,1279	0,0238	0,0432	0,0346	0,0858	-	0,9445
86 (138)	23	-	59	96	4	-	-	4	14	20	
f	0,1667	-	0,4275	0,6957	0,0290	-	-	0,0290	0,1014	0,1449	
p	0,0871	-	0,2434	0,4483	0,0146	-	-	0,0146	0,0521	0,0753	0,9354
87 (136)	4	2	37	80	-	-	25	17	31	34	
f	0,0294	0,0147	0,2721	0,5882	-	-	0,1838	0,1250	0,2279	0,2500	
p	0,0148	0,0074	0,1468	0,3583	-	-	0,0966	0,0646	0,1213	0,1340	0,9438
88 (136)	10	-	47	39	-	-	31	-	89	4	
f	0,0735	-	0,3456	0,2868	-	-	0,2279	-	0,6544	0,0294	
p	0,0375	-	0,1910	0,1555	-	-	0,1213	-	0,4121	0,0148	0,9322

I 1988 er oprettet 2 nye linier, der er henholdsvis en sublinie af L85 og en sublinie af L86. Disse to linier vil blive selekteret for foderudnyttelse og vækst som linie 86 (personlig kommunikation Poul Sørensen.) Det vil da blive muligt at følge avlsdyr fra de 2 nye linier samt L 86 og L 85 igennem flere generationer, således at data-sættet kan blive så stort som muligt, og kan anvendes til belysning af eventuelle sammenhænge mellem de selekterede faktorer og MHC.

5.5 MHC som selektionsparameter

Anvendelse af B-komplekset som selektionskriterium i avlen med slagtekyllinger skal opfattes som et muligt supplement til de allerede eksisterende parametre. Studier af vævstyperne i relation til sygdomsresistens over for et bredt spektrum af patogene organismer vil styrke vor viden om de mekanismer, der fungerer på cellulært niveau, og forhåbentlig vil disse informationer finde anvendelse i den mere praktisk orienterede avlsstrategi.

Det er ikke umuligt, at en haplotype som B21 på andre måder end den velkendte resistens mod MD kan have flere fordele, for selv om HVT-vaccinen beskytter mod epidemiske udbrud, har det vist sig, at en kombination mellem genetisk resistens og vaccination giver en langt bedre beskyttelse. Anvendelse af HVT-vaccinationen af alle daggamle kyllinger har formindsket B21-frekvensen drastisk blandt æglæggere. Imidlertid udgør frekvensen af B21 i slagtekyllingepopulationer - så som Hvid Cornish, linie 85, næsten 30%, hvorfor B21 i dette tilfælde må have andre fordele, der gør, at netop denne haplotype foretrækkes i selektionen. I hanelinierne inden for slagtefjerkræ lægges særlig vægt på parametre som "livskraft"; kan denne parameter relateres til B21? og hvis den kan, er relationen så knyttet til MHC-I eller MHC-II?

I hønelinierne, d.v.s. her repræsenteret med linie 74, Hvid Plymouth Rock, er selektionskriterierne desuden lagt an på ægydelse. Her er det klart ingen fordel at bære B21-typen, da der i denne population ikke er fundet én eneste. Derimod findes haplotyper, der er unikke. Kan der være korrelation mellem disse typer og ægydelse?

I denne beretning er der kun fokuseret på B-komplekset, men det kan selvfølgelig ikke udelukkes, at også andre loci influerer på de valgte selektionsparametre. Koblingsmekanismer til disse loci bør naturligvis undersøges og indgå i en samlet vurdering.

LITTERATUR

Briles, W. E., McGibbon, W. H., Irwin, M.R.: Studie of the time of development of cellular antigens in the chicken. *Genetics* vol. 33, pp 97-103 (1948).

Briles, W. E., Allen, C. P., Miller, T. W.: The B-blood group system of the chicken. *Genetics* vol. 42, pp 631-637 (1957).

Briles, W. E., Bumstead, N., Ewert, D. L., Gilmour, D. G., Gogusev, J., Hala, K., Koch, C., Longenecker, B. M., Nordskog, A. W., Pink, J. R. L., Schierman, L. W., Simonsen, M., Toivanen, A., Toivanen, P., Vainio, O., Wick, G.: Nomenclatur for chicken major histocompatibility (B) complex. *Immunogenetics* vol. 15, pp 441-447 (1982).

Crone, M., Simonsen, M., Skjødt, K., Linnet, K., Olson, L.: Mouse monoclonal antibodies to class I and class II antigens of the chicken MHC. *Immunogenetics* vol. 21, pp. 181-187 (1985).

Gavora, J. S., Simonsen, M., Spencer, J. L., Fairfull, R. W., Gowe, R. S.: Changes in the frequency of major histocompatibility haplotypes in chickens under selection for both high egg production and resistens to Marek's disease. *Zeitschrift für Tierzuchtung und Zuchtungsbiologie*, vol. 103, pp. 218-226 (1986).

Hala, K., Vilhelmova, M., Hartmannova, J.: Probable crossing-over in the B-blood group system of the chickens. *Immunogenetics* vol. 3, pp 97-101 (1976).

Hala, K., Plachy, J., Schulmannova, J.: Role of the B-G region antigen in the hummural immune response to the B-F region antigen of the chicken MHC. *Immunogenetics* vol. 14, pp 393-401 (1981).

Klein, J.: In "Biology of the mouse histocompatibility-2 complex". Springer Verlag, New York (1975).

Klein, J., Juretic, A., Baxevanis, C. N., Nagy, Z. A.: The traditional and a new version of the mouse H-2 complex. *Nature* vol. 291, pp 455-460 (1981).

Koch, C., Simonsen, M.: Ir-genes in chickens. *Immunogenetics* vol. 5, pp 161-170 (1977).

Koch, C., Skjødt, K., Toivanen, A.: New recombinants within the MHC (B-complex) of the chicken. *Tissue Antigens* vol. 21, pp 129-137 (1983).

Lamont, S., Warner, C. M., Nordskog, A.: Molecular analysis of chicken MHC genes and products. *Poultry Science* vol. 66, pp. 819-824 (1987).

Pink, J.R.L., Drege, W., Hala, K., Miggianno, V.C., Ziegler, A.: A three-locus model for the chicken major histocompatibility system. *Immunogenetics* vol. 5, pp 203-216 (1977).

Salomonsen, J., Simonsen, M., Crone, M., Skjødt, K.: The chicken erythrocyte-specific MHC antigen. Characterization and purification with mouse monoclonal antibodies. *Immunogenetics* vol. 25, pp. 373-382 (1987).

Schou, M.: A micromethod of chicken MLR: Technical aspects and genetic control. *Tissue antigens* vol. 15, pp 373-380 (1980).

Simonsen, M., Crone, M., Koch, C., Hala, K.: The MHC haplotypes of the chicken. *Immunogenetics* vol. 16, pp 513-532 (1982).

Simonsen, M., Olson, L.: Possible role of Compound receptors in the immune system. *Ann. Immunol.* vol. 134, pp 85-92 (1983).

Simonsen, M., Arnulf, M., Sørensen, P.: The chicken MHC and its importance. (Composite paper covering presentation at EEC Meeting 7-9 Nov. 1988).

Skjødt, K., Koch, C., Crone, M., Simonsen, M.: Analysis of chickens for recombination within the MHC (B-complex). *Tissue Antigens* vol. 25, pp 278-282 (1985).

Steinmetz, M., Hood, L.: Genes of the major histocompatibility complex in mouse and man. *Science* vol. 222, pp 727-731 (1983).

Sørensen, P., Jensen, A. H.: Avlsarbejde med høns af kødtype på Avlsstationen Strynø 1980-1981. Beretn. 536 fra Statens Husdyrbrugsforsøg (1982).

Sørensen, P.: Studium af effekten af selektion for vækst hos slagtekyllinger. Landhusholdningsselskabets Forlag, pp 1-314 (1986).

Ziegler, A., Pink, J. R. L.: Chemical properties of two antigens controlled by the major histocompatibility complex of the chicken. *J. Biol. Chem.* vol. 251, pp 5391-5396 (1976).

APPENDIKS

A. Fremstilling af alloantiseraImmunisering

Fra den udvalgte donors halsvene (v.jugularis) udtages 20 ml citrat-blod (4 ml citrat + 16 ml fuldblod). Blodet fordeles på 8 stk. 10 ml rør således: 2,5 ml blod + 2,5 PBS (pH = 7,4); forsigtigt påføres nedfra med lang kanyler 4 ml, 20°C Ficoll Isopaque (specifik densitet 1.077 g/ml); centrifugeres ved 1200 x g i 25 minutter, 20°C. Efter centrifugeringen opsamles WBC fra interfasen med pasteurpipette til nyt 10 ml rør (2 pr. 1 nyt rør); tilsæt straks PBS (4°) til 10 ml og resuspendér. RBC fra et centrifugeglas overføres ligeledes til rent rør og resuspenderes med PBS (4°) til 10 ml. Cellekulturerne vaskes hver for sig 2 gange ved 200 x g i 6 minutter; supernatant suges af, og cellerne resuspenderes i rent PBS (10 ml, 4°). Herefter udtages til tællekammer (Neubauer):

WBC: Indstil til konc. 5×10^7 /ml sættes på køl 4°C;

RBC: Indstil til konc. 2×10^9 /ml sættes på køl 4°C; = (1% suspension.

De udvalgte recipienter modtager 1 ugentlig i.v. injektion af 1 ml cellesuspension x 6. Ved første injektion udtages 2 ml serum (kontrol), dernæst tappes dyrene for antiserum eller plasma efter 3, 4, 5 og 6 immunisering.

Plasma: I en 20 ml sprøjte udtages citratblod (1/5 vol. 3,8 g/100 ml Na-citrat); centrifuger ved 200 x g i 8 minutter, afpipetter plasma; fryses ved -20°C.

Serum: I en 20 ml sprøjte udtages fuldblod, stilles på vandbad 40°C, til det koagulerede blod kan løsnes (eventuelt natten over ved 5°C); centrifuger ved 200 x g i 8 minutter, afpipetter og fryser ved -20°C.

Det fremstillede råserum/råplasma skal yderligere absorberes for non-B og krydsreaktioner samt testes i GvH før brug (afsnit C + E).

B. Fremstilling af alloantisera ved hjælp af skin-grafting

I nogle tilfælde kan det give større udbytte, hvis recipienterne sensitiveres 14 dage før immuniseringer påbegyndes; kun sterile instrumenter anvendes, og indgrebet foretages under så "sterile" forhold som muligt.

Whattle transplantation

- 1) Donorens hagelap sprittes, og den nederste 2/3 afskæres; hagelappen spændes op på et stk. kork, spaltes og renses med skalpel, (bindevæv fjernes); anbringes i TC-199 + 1%, pen. strep. og klippes i stykker på 1,5 x 1,5 cm².
- 2) Anæstesi af recipienten, (skal faste i 12 timer inden). Recipienten bedøves med i.v. injektion umiddelbart før indgrebet; dyrets venstre side lige bag ved vingen pilles fri for fjer og dun, (huden må ikke gå i stykker). Narkosen afhænger af størrelsen (ca. 200-350 µl/udvokset høne), 8 dele Ketalar (ketaminklorid 50 mg/ml) + 2 dele Rompun (xylazinum 20 mg/ml).
- 3) Transplantationsområdet sprittes, og huden frigøres fra underlaget ved at løfte den op med en lille hagepincet og skære et lille hul (undgå blødninger). En steril saks føres ind, og hulrummet udvides; den overflødige hud klippes af, så hullet passer til transplantatet, der fæstnes med knuder i alle 4 hjørner. Sterilt kompres lægges over, og selvklæbende plaster vikles rundt om hele dyret.
- 4) Dyrene lægges til opvågning under observation; tilses daglig, og plasteret fjernes en uge senere; afstødningen noteres.

C. Rensning af alloantisera ved hjælp af RBC

Absorption

Råserum/råplasma fortyndes i PBS (1:1). Til absorption for non-B vaskes de røde blodlegemer i PBS x 3, hvorefter de pakkede RBC tilsættes råserum/råplasma i forholdet 1:20 (eksempel: 100 ml råserum 1:1 + 5 ml pakkede RBC). Blandingen rystes og henstår ved 20°C i 30 minutter, hvorefter den centrifugeres ved ca. 200 x g i 8 minutter.

Supernatanten (= det absorberede råserum) testes i hæmagglutination mod donorhaplotype samt de dyr, der er anvendt under absorptionen. Hvis råserum reagerer på de sidstnævnte, så absorberes igen.

Når testserum er "rent" for non-B antistoffer, titreres det i en GvH-test, hvorefter det yderligere absorberes for krydsreaktioner - således: 1 ml testserum i den fundne fortynding absorberes med 1 ml pakkede RBC af den første krydsreagerende haplotype o.s.v. Efter absorptionen udtages 500 µl til GvH-test, medens resten anvendes i en hæmagglutinationstest mod donorhaplotypen.

Resultatet af GvH-inhibitions-test og hæmagglutinationen vil afgøre, om testserum skal absorberes med den krydsreagerende haplotype eller ej:

	GvH-inhibit. af donorlym.	Hæmaggl. mod donor	Absorpt. anbefales
Testserum á B-F	nej	nej	nej
(immunisering med WBC)	ja	ja ¹⁾	ja
	nej	ja ¹⁾	nej ²⁾
	ja	nej	nej ²⁾
Testserum á B-G:	nej	nej	nej ³⁾
(immunisering med RBC)	ja	ja	ja ⁴⁾
	nej	ja	ja ⁴⁾
	ja	nej	nej

-
- 1) Iflg. GvH-test er MHC-I hos donor- og testtypen identiske; derfor må hæmagglutinationen tilskrives non-B (testserum bør absorberes yderligere for dette).
 - 2) Iflg. GvH-test fjernes ingen relevante antistoffer under absorptionen, hvorimod det er tilfældet under hæmagglutinationen. Testserum må kasseres.
 - 3) Testserum indeholder antistoffer mod MHC-I, som kun kan fjernes under absorption med WBC og miltceller fra donortypen.
 - 4) Iflg. GvH-test fjernes inhiberende antistoffer (á B-F), medens agglutinerende antistoffer bevares; det potentielt bedste á B-G testserum.

Prøveabsorptioner

Hvis et færdigabsorberet testserum giver et atypisk agglutinationsmønster over for en blindprøve, foretages en prøveabsorption, d.v.s. blindprøven vaskes 3 x i PBS, og 200 µl pakkede blodlegemer absorberes med 200 µl testserum.

Hvis supernatanten fra prøveabsorptionen ikke giver agglutination med donorhaplotypen, antages der at være identitet mellem donoren og blindprøven; omvendt tilskrives en agglutination non-B antistoffer i testserum.

D. Hæmagglutination

Kan udføres på en åben-glas plade eller i en rundbundet microtiter-plade.

1. Åben-glas plade: 1 dråbe alloantiserum + 1 dråbe af en 2% fuld-blod-suspension blandes forsigtigt på pladen og henstår i fugtkammer i 30 minutter. Tilsæt 1 dråbe frisk optøet 20% NHP (normal hønseplasma i PBS) og bland forsigtigt. (NHP indeholder hæmagglutinationsfremmende faktorer).
Henstår igen i fugtkammer i ca. 15 minutter; aflæses ved at "ridse" i bloddråben med pasteurpipette.
2. Microtiterplade: 1 dråbe 2% suspension, (pladerne kan sættes på køl natten over) + 1 dråbe alloantiserum blandes på "mixer". Pladerne står fladt i 30 minutter; tilsæt frisk optøet 20% NHP med 12 kanalpipette ca. 30 µl/brønd, og stil den fladt i 5-10 minutter; herefter skråt med sidste række op i ca. 30 minutter. Derefter vendes pladerne og aflæses. (Negative prøver vil løbe, medens positive prøver er klistret til brøndens bund og top).

E. Graft versus Host (GvH) analyser

GvH-reaktioner erkendes som miltforstørrelser hos 19 dage gamle kyllingeembryoer efter i.v.-injektion af én af følgende opløsninger 5 dage tidligere:

0,1 ml frisk citratblod til analyse for MHC-II

0,05 ml testserum + 0,05 ml lymfocytuspension analyse for MHC-I

0,05 ml abs.testserum + 0,05 ml lymfocytuspension analyse for MHC-I

Kun i det første tilfælde kræves, at B-haplotypen hos embryonerne er kendt; i alle tilfælde skal embryonernes haplotype være forskellig fra test-typens.

Procedure

14 dage gamle rugeæg gennemlyses, og den store vene, der transporterer affaldsstoffer fra fosteret til blommesækken, lokaliseres, og en lille rude ($0,3 \times 0,8 \text{ cm}^2$) skæres med sandpapirskive uden at beskadige skalhinden. Hinden klares umiddelbart før injektionen med paraffinolie (1 dråbe), hvorefter den ønskede opløsning injiceres.

Ruden forsegles med smeltet voks, og ægget lægges tilbage i rugemaskinen med den buttede ende opad. Forholdene bør være så antiseptiske, som det er muligt, og æggene bør ikke udsættes for alt for store temperatursvingninger.

Hver test udføres i 5 til 6 æg, og det samme antal positive og negative kontroller udføres. Når embryonerne er 19 dage, slås hul på æggene, hvorefter kyllingen tages ud og slås ihjel med det samme. Kyllingen vejes, miltens udtages og kønnet bestemmes; miltens vejes, og den geometriske middelvægt findes.

GvH-inhibition

Separation af testlymfocytter fra citratblod. Blodet sedimenterer spontant i 5 ml volumer ved 20°C i 30 minutter. Cellerne spindes yderligere ned i 4 minutter ved 80 g. Lymfocytterne afpipetteres i rent glas og vaskes x 3 i TC-199 sterilt medium + 2% BSA. Cellekoncentrationen indstilles efter tælling i Neubauerkammer til:

$$\frac{\text{Antal celler} \times 25 \times \text{volumen}}{2000} = \text{antal ml inh. } 2 \times 10^7 \text{ celler}$$

således, at hvert embryo modtager $2 \times 10^7 \times 0,05 \text{ ml} = 1 \times 10^6$ celler.

Til titrering af nyt testserum injiceres 0,05 ml cellesuspension + 0,05 ml testserum i 4 koncentrationer: 1:2; 1:10; 1:50; 1:100 samt en cellekontrol (0,05 ml medium + 0,05 ml cellesuspension). Testen afgør i hvilken koncentration testserum inhiberer.

GvH-inhibition - release

Testserum i den inhiberende koncentration absorberes in vitro med testhaplotypens RBC (0,05 ml testserum + 0,05 ml RBC); 0,05 ml supernatant + 0,05 ml donorlymfocytter, (separeret ved hjælp af ovennævnte

metode), injiceres. Antistoffer i supernatanten må reagere med donor T-lymfocytterne for at inhibere splenomegali.

Da T-cellerne udtrykker F-antigener, men ikke L-antigener, er testen indikation på kl.I-identitet/forskel på testhaplotypen og donorhaplotypen. Der benyttes 4 kontroller i denne test: 1) testserum i inhiberende koncentration + lymfocytter; 2) testserum i koncentration, der ikke inhiberer + lymfocytter; 3) medium + lymfocytter; 4) testserum, absorberet med donor RBC + lymfocytter.

F. Mixed Lymphocyte Reaction

Til MLR anvendes steril arbejdsgang i Flow bench, og der benyttes maksimum 8 dyr/forsøg. Dyr, der anvendes som lymfocytdonorer i in vitro kulturer, er mere end 3 måneder gamle. Blodet tappes fra jugular-venen i sterile sprøjter, indeholdende 1/5 vol. dyrkningsmedium med 25 I.E. Heparin (Novo, 5 IE/ml fuldblod). Blodet sedimenterer spontant i 5 ml volumer ved 20°C i 30 minutter i 10 ml sterile rør (Nunc N-1390-1).

Lymfocytter vaskes ved 200 g i 8 minutter i dyrkningsmedium og resuspenderes til 5 ml. Cellesuspensionerne deles i 2 sæt rør á 2,5 ml cellesuspension; de lymfocytter, der skal fungere som stimulatorceller, mitomycinbehandles ved at tilsætte 100 µl/prøve (25 µg/ml), afskærmes for lys på vandbad 41°C i 30 minutter. Responderceller vaskes 2 gange og resuspenderes til densitet $1,5 \times 10^7$ /ml. Stimulatorceller vaskes 2 gange efter mitomycinbehandlingen og indstilles ligeledes på $1,5 \times 10^7$ /ml.

Ved hjælp af 1 ml steril éngangssprøjte, monteret på en Hamilton-dispenser, "udsås" cellekulturer i 2 sterile rundbundede (Nunc-N262162) mikrotitterplader med låg således: lodret x 3 søjler á 20 µl/brønd stimulatorceller - dernæst vandret x 1 række á 20 µl/brønd responderceller, d.v.s. hul A-1; A-2; A-3 indeholder 3×10^5 responder- og 3×10^5 stimulatorceller i total volumen på 40 µl hver, og cellerne stammer fra samme dyr.

Microkulturerne inkuberer i 72 timer (3 dage) ved 41°C i 5% CO₂ i mættet vanddamp (Assab T-303 GF, Sverige). De sidste 6 timer af inkuberingen foregår efter tilsætning af 0,5 µCi af methyl-³H-thymin (Amersham 5 Ci/mM) opløsning, svarende til 20 µl/brønd med Hamilton-dispenser. Cellerne høstes på glasfilter med Skatron multiculture cellehøster. Filtrene tørres en time ved 90°C (eller natten over ved 20°C) og tælles i et minut i 1 ml scintillationsvæske i en β-tæller. Data præsenteres som et stimulationsindeks, som er forholdet mellem det geometriske middeltal af triplikaternes tælleletal i MLC-kulturer og kontrolkulturer.

Buffere og opløsninger

PBS: ("Phosphatbufferet" saltvand - pH 7,3)
til 5 l

130 mM	NaCl	(MW 58,44)	38 g
8 mM	Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O	(MW 177,99)	7,1 g
20 mM	KH ₂ PO ₄	(MW 136,09)	1,4 g

Opløses under opvarmning og omrøring;
pH indstilles til 7,25-7,30;
destilleret H₂O sættes til 5 l ionstyrke;
8,6-8,9 mmho; opbevares ved 5°C.

Na-citrat: Tri-natriumcitrat · 2 H₂O (MW 294,1) 38 g/l;
opløses under opvarmning og omrøring i 1 l destilleret H₂O; fordeles på infusionsflasker, dateres og opbevares ved -20°C.

Til blodprøver anvendes 1/5 vol. Na-citratopløsning.

TC-199: 1 brev opløses i 1 l destilleret H₂O med 3 ml (10% NaHCO₃); opbevares ved 5°C i en uge eller nedfryses i passende portioner.

Til 100 ml opløses 2g BSA (2%) under omrøring;
pH indstilles til 7,3, og opløsningen steriliseres; opbevares ved 5°C eller fryses ved -20°C.

Dyrkningsmedium

Iscove's modificerede Dulbecco's Medium (IMDM 78-5220 Gibco), indeholdende 2mM 2-glutamin, 25 mM Hepes buffer, opløses i 900 ml sterilt vand og tilsættes 3,024 g NaHCO_3 ; tilsæt 100 IE/ml penicillin og 100 $\mu\text{g/ml}$ streptomycin. Justér til 1 l og sterilfiltrér; fordeles på 250 ml flasker og fryses. Umiddelbart før brug tilsættes sterilfiltreret $7,5 \times 10^{-5}$ M α -thioglycerol (monothioglycerol, Sigma M-1753) og 2% sterilfiltreret frisk/nyoptøet NHS eller 2% BSA (Sigma, Cohn V fraktion).

Mitomycin C

Stamopløsning, 1250 ng/ml (Sigma M-0503)
(1 vial + 1,8 ml sterilt vand)

NB. GiftigtMethyl- ^3H -thymidin

Stamopløsning (Amersham 5Ci/mM) = (9,75 ml dyrkningsmedium + 250 μl ^3H -thymidin).