



Zum derzeitigen Kenntnisstand über das protektive Antigen von *Erysipelothrix rhusiopathiae*

Reinhard Weiß¹, Martin H. Groschup² und Claudia Nakov¹

¹ Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere, Justus-Liebig-Universität, D-Giessen

² Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere, D-Tübingen

Zusammenfassung

Untersuchungen an Extrakten von Rotlaufbakterien, die auf der Basis früherer Literaturmitteilungen fortgeführt wurden, haben in den letzten Jahren die Identifizierung eines speziesspezifischen Proteinantigens im Bereich von 66-64 kDa ermöglicht. Die protektiven Eigenschaften dieses besonders in NaOH- bzw. NaOH-EDTA-, aber nicht in Säure- oder Hitzeextrakten nachzuweisenden Proteins konnten durch aktive Immunisierung von Mäusen mit dem durch präparative Elektroelution gewonnenen Antigen sowie durch passive Immunisierung von Mäusen und Schweinen mit polyklonalen bzw. monoklonalen Antikörpern mehrfach belegt werden. Die Erkennung und Charakterisierung des 66-64 kDa Proteins als protektives Antigen von Rotlaufbakterien kann als Grundlage für einen Ersatz des bis heute zur Wirksamkeitsprüfung von Rotlaufvakzinen und Immunseren vorgeschriebenen Mäuseschutztests, der hohe Versuchstierzahlen fordert, angesehen werden.

Summary: Newer knowledge concerning a protective antigen of Erysipelothrix rhusiopathiae

Investigations on extracts from Erysipelothrix (E.) rhusiopathiae carried out within the last few years yielded the identification of a species-specific proteinaceous antigen of 66-64 kDa. The protective properties of this protein presented in particular in crude NaOH and NaOH-EDTA but not in acid and heat extracts could be demonstrated in mice and pigs vaccinated with the electroeluted 66-64 kDa antigen or treated with polyclonal and monoclonal antibodies, respectively. The identification and characterization of the 66-64 kDa protein as a protective antigen of E. rhusiopathiae can be regarded as a basis for a possible replacement of the official mouse protection test in vaccine testing by an in vitro assay.

Keywords: Erysipelothrix rhusiopathiae, protective antigen, mouse protection test, replacement

Einleitung

Rotlaufbakterien sind weitverbreitete Kommensalen der Haut und der Schleimhäute vor allem des oberen Verdauungstraktes einer ganzen Reihe von Säugetieren, Vögeln und Fischen. Unter Streßbedingungen

oder lokalen traumatischen Einwirkungen können sie die epitheliale Barriere überwinden und im weiteren Verlauf eine Bakteriämie/Septikämie auslösen, die entweder zum Tod des Tieres führt oder im Gefolge verschiedenartige klinische Manifestationen an Haut, Gelenken und

Knochen oder Endokard nach sich zieht. Von den landwirtschaftlichen Nutztieren sind vor allem Schweine, aber auch Truthühner und Lämmer betroffen.

Trotz der hohen Empfindlichkeit der Rotlaufbakterien gegenüber Penicillinen hat die Immunprophylaxe und -therapie durch Impfstoffe und Immunseren stets ihren Platz in der Bekämpfung der Rotlaufkrankung bei Schwein und Pute behalten. Zur Immunisierung dienen in erster Linie inaktivierte Impfstoffe in Form von Adsorbat- oder Lysatvakzinen sowie avirulente Lebendimpfstoffe der Serovarietät 2. Auf der Basis dieser Impfstoffe hergestellte Hyperimmunseren stammen vom Schwein und vom Pferd.

Die protektive Wirkung von Rotlaufbakterien

Die im Rahmen der aktiven Immunisierung entstehenden humoralen Antikörper haben zumindest zum Teil protektiven Charakter und schützen das Individuum vor dem Ausbruch einer klinisch manifesten Rotlaufinfektion. Über die verantwortlichen protektiven Antigene von *Erysipelothrix (E.) rhusiopathiae* wurde in den vergangenen 50 Jahren eine ganze Reihe von Untersuchungen durchgeführt (Dedie, 1949; Brill et al., 1959; White und Verwey, 1970a und b; Erler, 1973; Takahashi et al., 1984). Diese zeigten zunächst, daß eine protektive Immunität außer durch attenuierte oder formalin-inaktivierte Ganzzellvakzinen auch durch Kulturüberstände bzw. mittels

NaOH- oder Ultraschallbehandlung hergestellte Rohextrakte erzeugt werden kann (White und Verwey, 1970a und b; Erler, 1973). Salzsäure- und Trichloressigsäureextrakte induzierten zwar ebenfalls die Bildung hoher Agglutinationstiter und in der Immundiffusion nachweisbarer präzipitierender Antikörper; eine Schutzwirkung ließ sich mit solchen Seren im Mäusebelastungsversuch jedoch ebensowenig erzielen wie mit Antiseren gegen hitzebehandelte (3h bei 80°C) Rotlaufbakterien (Erler, 1973). Bei den mit diesen Verfahren freigesetzten Antigenen handelt es sich vielmehr in erster Linie um die typspezifischen Polysaccharid-Antigene, anhand derer sich heute 26 verschiedene Serovaren von *E. rhusiopathiae*, zuzüglich der serologisch nicht eingruppierbaren sog. N-Stämme, unterscheiden lassen.

Neben den typspezifischen Polysaccharid-Antigenen war bereits von Dedie (1949) die Existenz eines allen Rotlaufstämmen gemeinsamen, alkalilöslichen Artantigens postuliert worden. In späteren Untersuchungen ließen sich die Speziespezifität und Protektivität dieses Proteinantigens bestätigen (Brill et al., 1959; White, 1962; Wood, 1979; Takahashi et al., 1984). Eine Teilcharakterisierung der protektiven antigenen Komponente von Rotlaufbakterien gelang White und Verwey (1970a und b) in Kulturüberständen. Mit der Gelfiltration konnten sie als Maus-protektives Antigen einen Glykolipoprotein-Komplex mit einem Molekulargewicht von ca. 200 kDa darstellen. Er erwies sich als empfindlich gegen Trypsin, nicht jedoch gegenüber Ribonuklease oder Lipase. In hohen SDS-Konzentrationen ließ er sich lösen, und 50%iges Ammoniumsulfat führte zu seiner Ausfällung. Von Erler (1973) und von Rothe (1982b) wurde die Empfindlichkeit des protektiven Antigens gegenüber Pepsin, 1 M HCl und Trichloressigsäure sowie Temperaturen über 60°C nachgewiesen. Das von Rothe (1982a) aus alkalischen Extrakten isolierte, in der präparativen Immunelektrophorese schwach kathodisch

wandernde Antigen löste nach Verabreichung an Mäuse einen schützenden Effekt aus. Andere Trennmethoden, wie Ionenaustauschchromatographie oder Gelfiltration hatten bis dahin stets zur weitgehenden Zerstörung der protektiven Aktivität der in Frage kommenden Fraktionen geführt (White und Verwey, 1970a; Erler, 1973).

Versuche von Lachmann und Deicher (1986) zur Charakterisierung von Oberflächenantigenen an einem Serovar 2-Stamm von *E. rhusiopathiae* mit Affinitätschromatographie, gelelektrischer Auftrennung und Immunoblot führten zum Nachweis eines Polysaccharid-Antigens mit einem Molekulargewicht von 14-22 kDa. Es wurden auch mehrere immunologisch stärker aktive Protei-

ne im Bereich von 60-75 und 40-50 kDa dargestellt, ohne jedoch deren protektive Aktivität zu testen.

Neuere Arbeiten zur Charakterisierung eines protektiven Antigens

In den letzten Jahren wurde die Frage hinsichtlich der protektiven Komponenten von *E. rhusiopathiae* von Groschup et al. (1991) sowie Timoney und Groschup (1993) erneut aufgegriffen. Es wurden NaOH-, EDTA-, Triton X- und Ultraschallextrakte sowie Kulturfiltrate von 2 *E. rhusiopathiae* Stämmen (T28 und Ffm XI) mit der SDS-PAGE verglichen. Dabei konnten Proteinantigene hauptsächlich im Bereich von 92, 66-64, 40-39 und 30-35 kDa festgestellt werden. Zum

Tabelle 1: Immunologische Reaktionen zwischen unterschiedlich extrahierten *E. rhusiopathiae* Antigenen (2 Stämme: T28 und FfmXI) und Hyperimmunseren von Pferd und Schwein im Immunoblot. Die verschiedenen Druckformen (**fett** > normal > kursiv-Druck) geben annäherungsweise die Stärke der Detektion an.

EDTA-Extrakt								
T28	Pferd	94*	72	66-64	52	39	35	26
	Schwein	94	72	66-64	52		35	27-21
Ffm	Pferd		72	64		40	35	<30
	Schwein		72	64			35	<30
NaOH-EDTA-Extrakt								
T28	Pferd	94	72	66-64		39	35	
	Schwein	94	72	66-64		39	35	27-21
FfmXI	Pferd	94	72	66-64		39	35	30 27 25
	Schwein	94	72	66-64		39	35	30-14
NaOH-Extrakt								
T28	Pferd	94	72	66-64		39	35	25
	Schwein	94	72	66-64		39	35	27-21
FfmXI	Pferd	94	72	66-64		39	35	25
	Schwein	94	72	66-64		39	35	25-21
ULTRASCHALL-Extrakt								
T28	Pferd	94	72	<i>66-64</i>			35	25
	Schwein	94	72	<i>66-64</i>			35	30-20
FfmXI	Pferd	94		<i>66-64</i>			35	27 25
	Schwein	94		<i>66-64</i>		41	35	30 25
KULTURFILTRAT								
T28	Pferd		72	66-64		41	39	35
	Schwein		72	66-64			39	35
FfmXI	Pferd	100	72	66-64	55			
	Schwein		72	66-64	55 45 43		33	
SÄURE-Extrakt								
T28	Pferd		72		58 48	39	35	30
	Schwein	n. d.**						
FfmXI	Pferd	n. d.**						
	Schwein	n. d.**						

* kDa-Werte, ** nicht durchgeführt

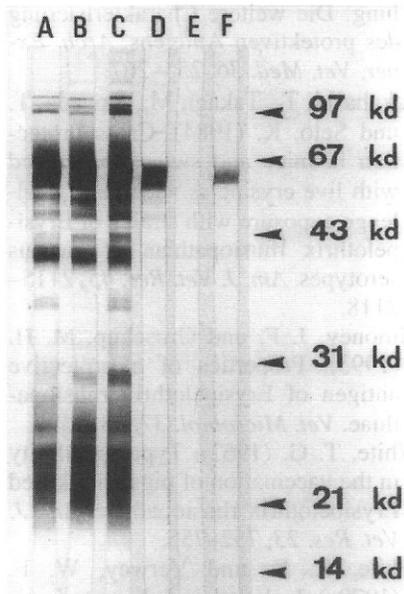


Abbildung 1: Erkennung von Antigenen eines NaOH-Extraktes von *E. rhusiopathiae* T28 im Immunoblot durch gepoolte Seren von geimpften Mäusen (A-D, F), die eine Belastungsinfektion überlebten. E ist eine Kontrolle mit Mäusenormalserum.

Vergleich mitgeführte, unter Hitze- einwirkung präparierte Säureextrakte wiesen dagegen keine Bandenbildung oberhalb von 30 kDa auf. Durch vorausgehende Trypsinbehandlung der Extrakte konnte der Proteincharakter dieser Banden demonstriert werden.

SDS-PAGE und Immunoblot-Analyse mit Hyperimmuseren von Pferd und Schwein führte zum Nachweis zahlreicher Reaktionen im Molekulargewichtsbereich zwischen 94 und 25 kDa, wobei vor allem mit EDTA- und NaOH-Extrakten die Reaktion mit der 66-64 kDa-Bande dominierte (Tabelle 1). Pferde- und Schweinenormalseren zeigten in diesem Bereich keine Reaktion. Dagegen reagierten Seren von Mäusen, welche nach Impfung mit einer kommerziellen Vakzine bzw. einem NaOH-Extrakt des Stammes T28 (Abbildung 1) eine Belastung mit 1000 LD₅₀ des Stammes Ffm XI überlebt hatten, wiederum außer mit

Banden von 98 und 26-23 kDa mit den 66-64 und 40-39 kDa-Antigenen. Ansätze mit Seren von nicht immunen Kontrollmäusen blieben negativ.

Protektive Wirksamkeit des 66-64 kDa Antigens

Die protektiven Eigenschaften des 66-64 kDa-Antigens konnten durch aktive Immunisierung von Mäusen mit verschiedenen Rohextrakten bzw. mit Antigen, das durch präparative Elektroelution aus einem gelelektrophoretisch aufgetrennten NaOH-Extrakt gereinigt worden war, demonstriert werden (Tabelle 2). In letzterem Fall überlebten alle 40 der dreimal mit diesem Antigen vakzinierten Mäuse eine Belastungsinfektion mit 1 LD₅₀ eines Serovar 1a-Rotlaufstammes, während 47% der Kontrolltiere starben (Groschup et al., 1991). Dies entspricht einer Signifikanz im Chi-Quadratstest von $p < 0,01$. Vor der Belastung gewonnene Seren reagierten im Immunoblot stark mit dem 66-64 kDa-Antigen und mit zwei weiteren Banden bei 98 und >100 kDa.

In Kaninchen hergestellte Antiseren gegen das elektroelierte 66-64

kDa-Antigen wurden zur passiven Immunisierung von Mäusen eingesetzt, was bei 7 der 36 Versuchstiere (19,4%) den tödlichen Ausgang einer Belastungsinfektion verhinderte; die Überlebensrate bei Kontrolltieren lag dagegen nur bei 5,5%.

Weniger protektiv wirkte ein rekombinantes Fusionsprotein, das durch Klonierung und Exprimierung des Strukturgens des 66-64 kDa Proteins in einem *E. coli* Stamm gewonnen wurde und mit dem Mäuse vakziniert wurden (Galan und Timoney, 1990). Allerdings reagierte ein Antiserum gegen dieses Fusionsprotein im Immunoblot stark mit der 66-64 kDa-Bande. Diese schwach schützende Potenz könnte eventuell auf den Verlust von antigenen Determinanten an dem mit β -Galaktosidase fusionierten Protein oder auf eine Interferenz der β -Galaktosidase oder anderer *E. coli* Antigene mit dem Rotlaufantigen zurückzuführen sein. Bereits die Immunisierungsversuche an Mäusen mit dem elektroelierten 66-64 kDa-Antigen hatten gezeigt, daß seine protektive Wirkung bei weitem unter jener von EDTA-, Triton X- und NaOH-Rohextrakten lag, die eine Belastungsinfektion mit 1000 LD₅₀ erlaubten, gegenüber ei-

Tabelle 2: Protektive Eigenschaften verschiedener Extrakte und von gereinigtem 66-64 kDa Antigen von *E. rhusiopathiae* T28 nach aktiver und passiver Immunisierung von Mäusen und Belastungsinfektion (ca. 1000 LD₅₀) mit Stamm FfmXI.

Antigen bzw. Antiserum	n	Überlebende	Überlebensrate
EDTA	16	16	100 %
NaOH-EDTA	16	16	100 %
NaOH	16	13	81,3 %
KULTURFILTRAT	16	9	56,3 %
ULTRASCHALL	16	2	12,3 %
SÄURE-Extrakt	16	0	0,0 %
Positivkontrolle	16	16	100%
Negativkontrolle	10	0	0,0%
Kaninchenanti- serum gg. 66-64 kDa Protein	36	7	19,4%
Negativkontrolle	18	17	5,5%
66-64kDa Protein	40	40	100%**
Negativkontrolle	19	10	52,6%**

** Belastungsinfektion mit ca. 1 LD50 des Stammes E1-6P

ner beträchtlich niedrigeren Belastungsdosis nach Vakzination mit dem gereinigten Antigen.

Worauf diese Unterschiede in der schützenden Aktivität beruhen, ist zunächst noch unklar. Eine Erklärung wäre möglicherweise darin zu sehen, daß das 66-64 kDa Antigen in den Rohextrakten, verbunden mit Glykolipid, als Komplex vorliegen könnte, analog dem von White und Verwey (1970b) beschriebenen Glykolipoprotein-Komplex. Höher molekulare Strukturen des Antigens dürften eine ausgeprägtere Immunogenität entwickeln als das gereinigte 66-64 kDa-Antigen, nicht zuletzt auch bedingt durch einen Adjuvans-Effekt von seiten der Polysaccharid-Antigene in einem solchen Komplex.

Zusätzliche Informationen über die protektiven Eigenschaften des 66-64 kDa-Antigens sind mit Hilfe monoklonaler Antikörper (mAk) möglich. Wenn auch entsprechende eigene Untersuchungen noch keine endgültigen Aussagen zulassen, so liegen seit jüngster Zeit doch erste Ergebnisse aus den *National Veterinary Services Laboratories*, Ames, Iowa, vor. Danach konnten durch Vermischung einer Belastungsdosis von Rotlaufbakterien mit einem mAk gegen das 66-64 kDa Antigen vor der Verabreichung an 5 Schweine die klinischen Symptome signifikant reduziert (4 Tiere) bzw. vollständig unterbunden (1 Tier) werden. Noch deutlicher zeigte sich die Wirkung der mAk bei ihrer Applikation einen Tag *ante infectionem*: Im Gegensatz zu den 5 Tieren, die mit nicht Rotlaufhomologer Ascitesflüssigkeit vorbehandelt waren, entwickelte keines der 5 mit den 66-64 kDa-spezifischen mAk prämediierten Schweine nach Belastung mit *E. rhusiopathiae* klinisch Symptome einer Rotlaufinfektion (Henderson, 1994). Zusammen mit den Erfahrungen an Mäusen (Groschup et al., 1991) dürften diese Ergebnisse die Relevanz des 66-64 kDa-Proteins als protektives Antigen bei Rotlaufbakterien unterstreichen.

Im Hinblick auf die Wirksamkeitsprüfung von Rotlaufvakzinen und

Immunseren bietet dieses Antigen, z.B. über den selektiven Nachweis protektiver Antikörper in den Hyperimmunseren oder in Seren einiger weniger, vakzinierter Versuchstiere bzw. eventuell auch durch die Bestimmung des Anteils an protektivem Antigen in den Vakzinen selbst, erfolgversprechende methodische Alternativen zum bis heute vorgeschriebenen, hohe Versuchstierzahlen fordernden Mäuseschutzversuch.

Literatur

- Brill, J., Mikulaszek, E. und Truszczynski, M. (1959). Immunochemische Untersuchungen über die Antigenstruktur des Erysipelothrix rhusiopathiae. *Zbl. Bakt. Hyg. Orig. A*, 175, 558-569.
- Dedie, K. (1949). Die säurelöslichen Antigene von Erysipelothrix rhusiopathiae. *Monatshefte Vet. Med.* 4, 7-10.
- Erler, W. (1973). Serologische, chemische und immunochemische Untersuchungen an Rotlaufbakterien. XIII. Das immunisierende Antigen. *Arch. Exper. Vet. Med.* 27, 321-326.
- Galan, J. E. und Timoney, J. F. (1990). Cloning and expression in *Escherichia coli* of a protective antigen of Erysipelothrix rhusiopathiae. *Infect. Immun.* 58, 3116-3121.
- Groschup, M. H., Cußler, K., Weiß, R. und Timoney, J. F. (1991). Characterization of a protective protein antigen of Erysipelothrix rhusiopathiae. *Epidemiol. Infect.* 107, 637-649.
- Henderson, L. M. (1994). Persönliche Mitteilung.
- Lachmann, P. G. und Deicher, H. (1986). Solubilization and characterization of surface antigenic components of Erysipelothrix rhusiopathiae T28. *Infect. Immun.* 52, 818-822.
- Rothe, F. (1982a). Das protektive Antigen des Rotlaufbakteriums (Erysipelothrix rhusiopathiae). 1. Mitteilung: Spezifischer Nachweis des protektiven Antigens. *Arch. Exper. Vet. Med.* 36, 243-253.
- Rothe, F. (1982b). Das protektive Antigen des Rotlaufbakteriums (Erysipelothrix rhusiopathiae) 2. Mittei-
- lung: Die weitere Charakterisierung des protektiven Antigens. *Arch. Exper. Vet. Med.* 36, 255-267.
- Takahashi, T., Takagi, M., Sawada, T. und Seto, K. (1984). Cross protection in mice and swine immunized with live erysipelas vaccine to challenge exposure with strains of Erysipelothrix rhusiopathiae of various serotypes. *Am. J. Vet. Res.* 45, 2115-2118.
- Timoney, J. F. und Groschup, M. H. (1993). Properties of a protective antigen of Erysipelothrix rhusiopathiae. *Vet. Microbiol.* 37, 381-387.
- White, T. G. (1962). Type specificity in the vaccination of pigs with killed Erysipelothrix rhusiopathiae. *Am. J. Vet. Res.* 23, 752-755.
- White, R. R. und Verwey, W. F. (1970a). Isolation and characterization of a protective antigen-containing particle from culture supernatant fluids of Erysipelothrix rhusiopathiae. *Infect. Immun.* 1, 380-386.
- White, R. R. und Verwey, W. F. (1970b). Solubilization and characterization of a protective antigen of Erysipelothrix rhusiopathiae. *Infect. Immun.* 1, 387-393.
- Wood, R. L. (1979). Specificity in response of vaccinated swine and mice to challenge exposure with strains of Erysipelothrix rhusiopathiae of various serotypes. *Am. J. Vet. Res.* 40, 795-801.

Kontaktadresse

Reinhard Weiß
 Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere
 Justus-Liebig-Universität
 Frankfurter Str. 89
 D-35392 Giessen