

Nachweis von *Clostridium novyi*-Typ B Alpha-Toxin mittels Zellkulturen

Erika Borrmann und Frank Schulze

BgVV, Fachbereich 4 „Bakterielle Tierseuchen und Bekämpfung von Zoonosen“, D-Jena

Zusammenfassung

Für die Wirksamkeitsprüfung von Clostridien-Impfstoffen, die als wirksames Antigen das Alpha-Toxoid enthalten, soll ein Zellkulturassay als Alternative zu dem im DAB 10 vorgeschriebenen Toxinneutralisationstest in Mäusen entwickelt werden. Voraussetzung für die Entwicklung eines Zellkulturassays, der auf dem Nachweis der zytotoxischen Wirkung des nicht-neutralisierten Alpha-Toxins beruht, ist die Auswahl einer geeigneten Zelllinie. Dazu überprüften wir neun Zelllinien (FBTR, VERO, EBL, BHK-21, IEC-6, MDCK, CHO-K1, MA 104, ESH-L) hinsichtlich ihrer Toxinempfindlichkeit mikroskopisch und mittels Tetrazolium-(MTT)-Test. Dabei reagierte die ESH-L-Zelle am stärksten auf das Alpha-Toxin. Die spezifische Wirkung des Alpha-Toxins wurde durch Neutralisation der Toxinwirkung mit dem internationalen Standard für das *C. novyi*-Antitoxin nachgewiesen, während das heterologe Serum von *C. perfringens*-Alpha-Antitoxin die Toxinwirkung nicht neutralisierte. Davon ausgehend kann mit dem Aufbau eines Neutralisationstests zur Wirksamkeitsprüfung von *C. novyi*-Alpha-Toxoid-haltigen Impfstoffen begonnen werden.

Summary: Detection of Clostridium novyi type B alpha toxin using cell culture systems

The aim of our study was to investigate if a cell culture assay can replace the toxin neutralisation test in mice for the potency testing of alpha toxoid containing clostridial vaccines for veterinary use.

The basis for the development of our cell culture assay was the detection of the cytotoxic/cytopathic action of alpha toxin on cells in culture. Nine permanent cell lines were examined for their reaction to the alpha toxin. The action of the toxin was determined after three days by microscopic examination and MTT assay. The alpha toxin exhibited the strongest effect on the ESH-L cells. We were able to show that the cytopathic effect was neutralised by the international standard for gas gangrene antitoxin (*C. novyi*) but never by heterologous antisera. Our results showed that the ESH-L cell line was a suitable indicator for the detection of the cytotoxic effect of alpha toxin.

Keywords: clostridium novyi, alpha toxin, cell lines, cell culture assay, detection

1 Einleitung

Clostridium (C.)-novyi Typ B gehört zu den Erregern des Gasödem-Komplexes und verursacht bei Schafen, seltener bei Rindern, eine infektiöse nekrotische Hepatitis (*black disease*, Deutscher Bradsot; Seifert 1995).

Das Letaltoxin der virulenten Stämme ist das nekrotisierende Alpha-Toxin. Es wirkt auf die Kapillarpermeabilität und induziert massive Ödeme (Hatheway, 1990). Infolge seiner Größe (200-280 kDa) wird es in die Gruppe der großen Clostridien-Toxine eingeordnet (Donelli und Fiorentini, 1994).

Die infektiöse nekrotische Hepatitis führt zu hohen wirtschaftlichen Verlusten. Berichte über Erkrankungen liegen aus Australien, Neuseeland, Großbritannien, Rumänien und Deutschland vor (Kimberling, 1988). Nahezu alle infizierten Schafe sterben. Die Verluste in einer Herde können zwischen 15 und 30% betragen.

Der Einsatz von Impfstoffen, die als wirksames Antigen das Alpha-Toxoid enthalten, ist bei der Bekämpfung dieser Infektion die einzig erfolgversprechende Maßnahme.

Zur Qualitätskontrolle dieser Impfstoffe sind im Deutschen Arzneibuch (DAB 10) Tierversuche vorgeschrieben. Dabei werden die in Kaninchen gegen *C. novyi*-Alpha-Toxin gebildeten Antikörper quantitativ durch einen Toxinneutralisationstest in Mäusen bestimmt. Bewertungskriterium für die Impfstoffe ist dabei die Sterberate (LD₅₀-Wert) der Mäuse in Prüf- und Referenzserumgruppen. Dieser Wert stellt das Maß der Neutralisation des Alpha-Toxins durch die in den Kaninchenserum enthaltenen Antikörper dar.

Die notwendigen Vorversuche zur Bestimmung der Prüfdosis des Toxins und die Einstellung eines Antitoxin-Laborstandards erfolgen ebenfalls an Mäusen.

Neben Impfstoffen sind auch antitoxische Immunsereen im Handel. Auch hier

erfolgt die Wirksamkeitsprüfung durch einen gleichartig aufgebauten Mäuseschutztest.

Unter Berücksichtigung des Tierschutzaspektes sollten diese belastenden Tierversuche durch geeignete *in vitro* Methoden ersetzt werden. Neben ELISA-Methoden scheint die Entwicklung eines Zellkulturassays auf der Grundlage des zytotoxischen/zytopathischen Effektes des Alpha-Toxins eine erfolgversprechende Alternative zu sein.

Die zytotoxische Wirkung von Alpha-Toxin konnte sowohl auf verschiedenen Zelllinien, wie VERO, CHO, HT 29 (Ball et al., 1993), L-929, PC-12 (Bette et al., 1989), WI-38-Zellen (Knight et al., 1986), als auch primären Endothelzellen (Müller, 1992) und embryonalen Lungenfibroblasten (Schallehn und Wolf, 1988) nachgewiesen werden, jedoch wurde noch kein Zelltest zur quantitativen Bestimmung des Antikörpergehaltes von Kaninchenserum aufgebaut.

Unsere Zielstellung bestand in der Auswahl einer geeigneten Zelllinie für den zu entwickelnden Toxinneutralisationstest und dem Nachweis der spezifischen Wirkung des Alpha-Toxins auf diese Zelle.

2 Material und Methoden

2.1 Toxin

Als Alpha-Toxin wurde das Standardtoxin für den *C. novyi*-Alpha Toxinneutralisationstest in Mäusen (Lot-Nr. 425) verwendet, das uns von Dr. Hauer (*Animal and Plant Health Inspection Service, Center for Veterinary Biologics, Ames, USA*) zur Verfügung gestellt wurde.

Die Molmasse des Alpha-Toxins wurde mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und Immunoblotting bestimmt. Für den Immunoblot wurde als primärer Antikörper ein von Frau Dr. Pietrzykowski (CSL Ltd., Victoria, Australien) freundlicherweise zur Verfügung gestellter monoklonaler Antikörper (CN 9.7B9 -Ascites) eingesetzt.

2.2 Antiseren

Folgende Antiseren wurden eingesetzt:
 – Internationales Standardantiserum für *Clostridium-novyi* (*International Standard for Gas-gangrene antitoxin-CI.novyi, equine*; 3. Standard, 1966, Statens Seruminstitut Kopenhagen, Dänemark), gelöst in 1ml PBS, enthält 1100 Internationale Einheiten des Gas-Gangrän-Antitoxins.
 – Internationales *C.perfringens*-Alpha-Antitoxin (5. Standard, 1963, *Central Veterinary Laboratory, Weybridge, Großbritannien*).

2.3 Zellkulturen

Für den Nachweis der Zytotoxizität wurden folgende Zelllinien verwendet: embryonale bovine Lungenzelllinie (EBL), fetale bovine Tracheazelllinie (FBTR), Nierenzelllinie der afrikanischen grünen Meerkatze (VERO), intestinale Rattenzelllinie aus dem Dünndarm (IEC-6), Hamsterovarienzelllinie (CHO-K1), embryonale Nierenzelllinie vom Rhesusaffen (MA 104), Hundenierenzelllinie (MDCK), Nierenzelllinie vom Syrischen Hamster (BHK-21-BSR/PK 5/88) und embryonale Hautzelllinie vom Schaf (ESH-L).

Die Anzucht von VERO-, ESH-L-, EBL- und FBTR-Zellen erfolgte in *Minimal Essential Medium Eagle* mit Earle-Salzen (MEM). Für die Kultivierung der

MDCK wurde MEM mit nichtessentiellen Aminosäuren (NEAA) eingesetzt, während zur Kultivierung der BHK-Zelle MEM mit NEAA unter Zusatz von Natriumpyruvat und für die CHO-K1-Zelle MEM mit 150 µg/ml Prolin benötigt werden. Die MA 104-Zelle züchteten wir in Dulbeccos *Minimal Essential Medium* (DMEM) und die IEC-6 in DMEM mit HEPES unter Zusatz von Insulin. Alle Medien enthielten 10% fötales Kälberserum (FKS), 2 mM Glutamin und 50 µg/ml Gentamycin. Für die CHO-K1-Zellen wurde inaktiviertes FKS verwendet. Die Zellen wurden bei 37° C und 5% CO₂ gehalten.

2.4 Zelltest

Die Durchführung des Zelltests erfolgte in 96-Kavitäten-Platten (*Costar Europe Ltd., Badhoevedorp, NL*). Zur Testdurchführung wurde der Serumgehalt der verwendeten Zellkulturmedien auf 5% herabgesetzt. 50 µl des entsprechenden Zellzuchtmediums wurden in jede Kavität vorgelegt, 50 µl der Toxinlösungen in den jeweiligen Verdünnungsstufen und 50 µl Zellsuspension zugegeben. Jede Verdünnungsstufe wurde doppelt ausgeführt. Die Zellsuspensionen gewannen wir durch Abtrypsinieren der in Zellkulturflaschen konfluent gewachsenen Zellen und Resuspendieren in den jeweiligen Medien. Mit diesen Medien setzten wir auch die Toxinverdünnungsreihen an.

Als Zellkontrollen wurden 50 µl der jeweiligen Zellsuspension in 100 µl Zellzuchtmedium pro Kavität eingesetzt und als sechsfach Bestimmung ausgeführt.

Für den Neutralisationstest wurden pro Kavität 50 µl des jeweiligen Antiserums in log 2-Verdünnungsstufen und 50 µl Toxinlösung gemischt und die Platten 1h bei Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von 50 µl Zellsuspension. Als Zellkontrollen dienten 50 µl Zellsuspension in 100 µl Zellzuchtmedium pro Well bzw. für die Toxinkontrolle 50 µl Toxinlösung in 50 µl Zellzuchtmedium und 50 µl Zellsuspension pro Kavität. Die Toxinkonzentration wurde für den Neutralisationstest so ausgewählt, daß nach Toxinwirkung noch 20-40% vitale Zellen nachweisbar waren.

2.5 Auswertung

Die Auswertung der Platten erfolgte nach drei Tagen Inkubation bei 37° C und 5% CO₂ mikroskopisch und mittels 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT)-Test (Mossman, 1983).

Für die Messung der Extinktion bei 550 nm verwendeten wir einen Elisa-Reader (SLT GmbH, Crailsheim, BRD).

Die Berechnung der nach Toxineinwirkung vitalen Zellen bezogen auf die jeweiligen Zellkontrollen (% vit. Zellen =

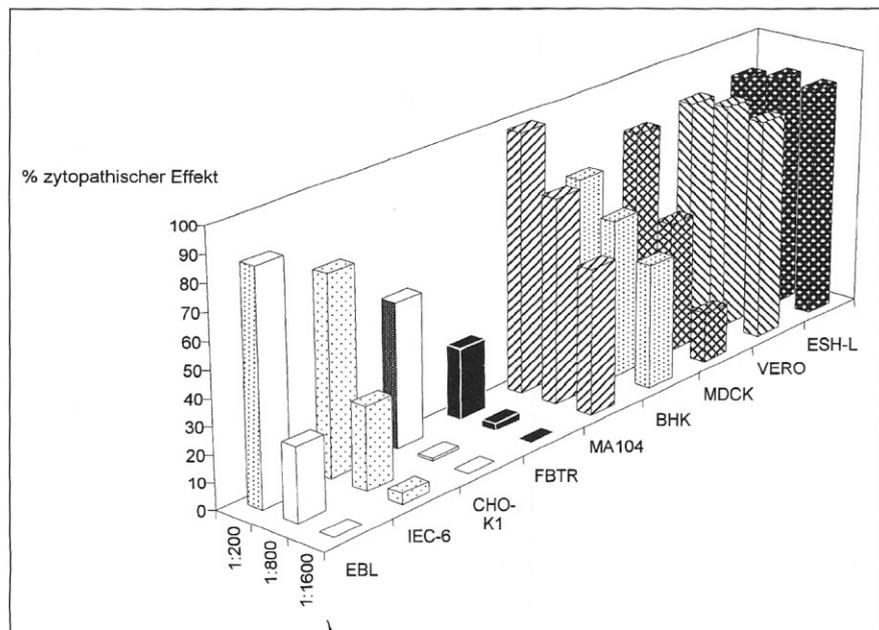


Abbildung 1: Vergleich der zytopathischen Wirkung von *C. novyi*-Typ B Alpha-Toxin auf verschiedene Zelllinien (100%-vitalen Zellen nach Toxineinwirkung)

(E_{Pt}/E_{ZK}) $\times 100$) erfolgte mit dem Auswerteprogramm der Firma SLT. Zur Berechnung wurden die jeweils gemittelten Extinktionen verwendet.

3 Ergebnisse

Der Vergleich des zytopathischen Effektes des Alpha-Toxins auf die getesteten Zelllinien ist in Abbildung 1 dargestellt. Die nach Toxineinwirkung vitalen Zellen wurden im Vergleich zu den jeweiligen Zellkontrollen (100% Vitalität) in Abhängigkeit von der verwendeten Toxinkonzentration bestimmt. Der zytopathische Effekt berechnet sich dann aus der Differenz der vitalen Zellen in % zu 100%. Das Alpha-Toxin wirkte am stärksten auf die ESH-L-Zelle. Das Zellbild zeigte in hohen Konzentrationen neben einigen lysierten Zellen völlig abgerundete Zellen. Das Zellwachstum war stark reduziert. Bei höheren Verdünnungen begannen die Zellen auszuwachsen, und es wurden neben den typischen Rundzellen auch schiffchen- und keulenförmige Zellen beobachtet. (Abb. 2-4).

Auf Grund dieser Ergebnisse wurden unter Verwendung der ESH-L-Zelle die für einen reproduzierbaren Nachweis des Toxins notwendigen Parameter bestimmt:

- Testmedium: Zellkulturmedium mit 5% FKS für Verdünnungsreihen und Durchführung der Tests.

- Zellzahl/Well: $1,25 \times 10^4$, diese Zellzahl ergab sich aus der Forderung nach geschlossenem Zellrasen in drei Tagen und entsprach einer mit dem MTT-Test bestimmten Extinktion (550 nm) von ca. 1,0 (100% vitale Zellen).

- Alter der Zellen: 4 Tage nach Passage.
- Zellpassage: zwischen 13. und 33. Passage, danach wurden morphologische Veränderungen der Zellen beobachtet.
- Nachweis des zytotoxischen Effekts mittels MTT-Test.

Diese Parameter wurden auch für den Neutralisationstest verwendet.

Zum Nachweis der spezifischen Wirksamkeit auf die ESH-L-Zelle führten wir Neutralisationsversuche mit dem internationalen Standardantiserum für *C. novyi* auf der ESH-L-Zelllinie durch. Dabei neutralisierte das Standardantiserum noch bis zu einem Titer von 1:10000 die zytotoxische Wirkung des Alpha-Toxins, während das heterologe Antiserum (Internationales *C. perfringens*-Alpha-Antitoxin) nicht neutralisierte.

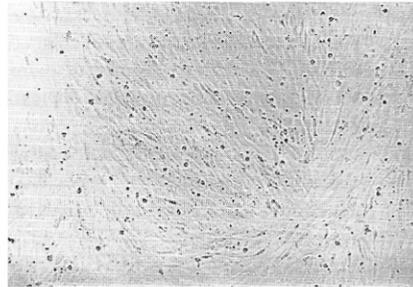


Abbildung 2: ESH-L-Zellen (embryonale Hautzelllinie vom Schaf) ohne Toxineinwirkung (Zellkontrolle): konfluenter Monolayer mit fibroblastenähnlicher Morphologie nach 3tägiger Kultivierung in 96-Kavitätenplatte ($1,25 \times 10^4$ Zellen/Kavität). Lichtmikroskopische Aufnahme: Vergrößerung 90x.

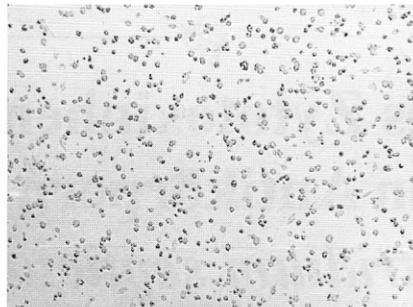


Abbildung 3: ESH-L-Zellen nach 3tägiger Kultivierung unter Einwirkung von *Clostridium novyi*-Typ B Alpha-Toxin (Titer 1:100): lysierte und abgerundete Zellen. Lichtmikroskopische Aufnahme: Vergrößerung 90x.

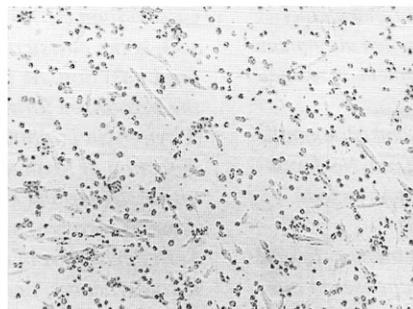


Abbildung 4: ESH-L-Zellen nach 3tägiger Kultivierung unter Einwirkung von *Clostridium novyi*-Typ B Alpha-Toxin (Titer 1:2000): Rundzellen und feine Langzellen. Lichtmikroskopische Aufnahme: Vergrößerung 90x.

4 Diskussion

Der standardisierte und spezifische Nachweis des Alpha-Toxins auf ESH-L-Zellen schuf die Voraussetzung für den Aufbau eines Zellkulturassays (Neutralisations-

test) zur quantitativen Bestimmung von Antikörpertitern in Seren unter standardisierten Bedingungen. Unter den von uns getesteten Zellen reagierte die ESH-L-Zelle am stärksten auf das Alpha-Toxin. Die beobachteten Zellveränderungen stimmen mit den in der Literatur beschriebenen überein (Donelli und Fiorentini, 1994; Eichel-Streiber et al., 1996). In hohen Konzentrationen kommt es teilweise zur Zellyse (zytotoxische Wirkung) neben komplett abgerundeten Zellen (zytotoxischer Effekt). Das Alpha-Toxin besitzt enzymatische Aktivität (Monoglycosyltransferase) und bewirkt durch die Glykosylierung von zellulären Proteinen den Umbau des Actinskeletts. Diese Wirkung auf das Actinskelett führt zu den typischen irreversiblen Zellveränderungen und zu einer Reduktion der Zellteilung. Die morphologischen Veränderungen wurden bei allen getesteten Zellen beobachtet, jedoch reagierte die ESH-L-Zelle noch bis zu einem Titer von 1:100.000 (56% vitale Zellen) auf das von uns verwendete Toxin. Am empfindlichsten gegenüber der Wirkung des Toxins reagierten Zellkulturen 4 Tage nach Passagieren. Die ESH-L-Zelllinie wird als begrenzt wachsend eingeordnet (Riebe, 1997) und konnte daher nur bis zur 33. Passage verwendet werden. Danach veränderten sich das Wachstum und die Morphologie der Zellen.

Die Ergebnisse zeigen, daß für das Alpha-Toxin ein geeignetes Zellsystem für den spezifischen Nachweis der zytotoxischen bzw. zytotoxischen Wirkung gefunden wurde. Die Möglichkeit zur Ablösung von Tierversuchen bei der Wirksamkeitsprüfung von Clostridien-Impfstoffen durch die Einführung eines Zellkulturassays ist somit als erfolgversprechend einzuschätzen.

Literatur

- Ball, D. W., Tassell, R. L. V., Roberts, H. D., Hahn, P. E., Lyerly, D. M. and Wilkins, T. D. (1993). Purification and characterization of alpha-toxin produced by *Clostridium novyi* type A. *Infect. Immun.* 61, 2912-2918.
- Bette, P., Frevert, J., Mauler, F., Suttrop, N. and Habermann, E. (1989). Pharmacological and biochemical studies of cytotoxicity of *Clostridium novyi* type A alpha-toxin. *Infect. Immun.* 57, 2507-2513.
- Deutsches Arzneibuch, 10. Ausgabe (1992). Monographie: *Clostridium novyi*-Alpha-An-



titoxin für Tiere, Monographie: Clostridium-novyi-(Typ B)-Impfstoff für Tiere.
 Donelli, G. and Fiorentini, C. (1994). Bacterial protein toxins acting on the cell cytoskeleton. *Microbiologica*, 17, 345-362.
 Eichel-Streiber, C., Boquet, P., Sauerborn, M. and Thelestam, M. (1996). Large clostridial cytotoxins - a family of glycosyltransferases modifying small GTP-binding proteins. *Trends in Microbiology*, 4, 375-382.
 Hatheway, C. L. (1990). Toxicogenic clostridia. *Clin. Mic. Rev.* 3, 66-98.
 Kimberling, v., C. (1988). Diseases of the digestive system. In: *Jensen and Swift's diseases of sheep* (255-257), Philadelphia: Lea & Febiger-Verlag.
 Knight, P. A., Burnett, C., Whitaker, A. M. and Queminet, J. (1986). The titration of clostridial toxoids and antisera in cell culture. *Develop. Biol. Standard.* 64, 129-136.

Müller, H., Eichel-Streiber, C. and Habermann, E. (1992). Morphological changes of cultured endothelial cells after microinjection of toxins that act on the cytoskeleton. *Infect. Immun.* 60, 2007-3010.
 Mossmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Meth.*, 65, 55-63.
 Riebe, R. (1997). Linienspass der ESH-L-Zelllinie, Zellbank der BfA f. Viruskrankheiten der Tiere, Insel Riems.
 Schallehn, M. und Wolf, H. (1988). Morphologische Veränderungen humaner embryonaler Lungenfibroblasten durch Cytotoxine verschiedener Clostridium-Spezies. *Zbl. Bakt. Hyg. A* 267, 367-378.
 Seifert, H. S. H. (1995). Gasödem-Komplex. In: H. Blobel, Th. Schließer (Hrsg.), *Handbuch der bakteriellen Infektionen bei Tieren*, Bd.

III/4. Clostridiosen. (47-70). Jena, Stuttgart: Gustav Fischer Verlag.

Danksagung

Die Arbeiten wurden mit Unterstützung des Bundesministeriums für Bildung, Wissenschaft, Forschung und Technologie durchgeführt.

Korrespondenzadresse

Dr. Erika Borrmann, Dr. habil. Frank Schulze
 Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin
 Fachbereich 4,
 Naumburger Str. 96 a,
 D-07743 Jena



Entwicklung eines Zytotoxinhemmungstests zum Nachweis von Antikörpern gegen das α -Toxin von *Clostridium septicum* in Seren

Katja Jansen, Frauke Roth und Sören Petzke

Institut für Pflanzenbau und Tierproduktion in den Tropen und Subtropen, Bereich Tierhygiene, D-Göttingen

Zusammenfassung

Clostridium (C.) septicum, ein sporenbildender Bewohner des Bodens, ist der klassische Erreger des Pararanschbrandes, einer Erkrankung mit perakutem Verlauf. Impfstoffe enthalten als immunogenes Agens das lösliche α -Toxin, ein letales Exoprotein, in toxoidierter Form.

Als Ersatzmethode für den nach DAB 10 zur Wirksamkeitskontrolle vorgeschriebenen Mäusenneutralisationstest (MNT) zum Nachweis von toxinneutralisierenden Antikörpern wird ein Zytotoxinhemmungstest auf der Basis von Zellkulturen vorgestellt.

Untersucht wurden Seren von Kühen, die mit einem α -Toxoid-Impfstoff vakziniert worden waren, und Kaninchenserum aus der offiziellen Wirksamkeitsprüfung sechs kommerzieller Clostridienimpfstoffe.

Mit der *in vitro* Methode konnten Antikörper in den Seren der Kühe und der Prüfchargen reproduzierbar detektiert werden.

*Summary: Development of a cytotoxin inhibition test for the detection of serum antibodies against the α -toxin of Clostridium septicum Clostridium (C.) septicum, a spore-forming bacterium of the soil, is the classical causative agent of malignant oedema, a fatal infection. As immunogenic compound, vaccines contain the toxoidized form of the soluble α -toxin, a lethal exoprotein. A cytotoxin inhibition test based upon cell culture for the detection of toxin neutralizing antibodies was developed as an alternative to the neutralisation test in mice, which has to be done as measure of quality control according to DAB 10. Sera derived from cattle that had been vaccinated with α -toxoid-vaccine, and sera from rabbits, from the official quality control of six different clostridial vaccines, were tested. The *in vitro* method was able to detect antibodies in the sera of the cows as well as in the sera of the rabbits. The results were reproducible.*

Keywords: clostridium septicum, α -toxin, quality control of vaccines, detection of antibodies, cell culture

1 Einleitung und Fragestellung

Clostridium (C.) septicum ist ein sporenbildender, weltweit verbreiteter Bewohner des Bodens und über die Nahrungsaufnahme auch der Darmflora. Im veterinärmedizinischen Bereich gilt *C. septicum* als

der klassische Erreger des Pararanschbrandes, speziell des Geburtsranchbrandes und des nordischen Bradsot. *C. septicum* ist auch humanpathogen.

Gelangen an einem infizierten Standort vegetative Erreger oder Sporen in Wunden, so kommt es in kurzer Zeit zu einem

Ausbruch der Krankheit mit meist tödlichem Ausgang.

Die Bekämpfung erfolgt durch eine gezielte Impfprophylaxe der Tiere mit einem Toxoidimpfstoff (Gräber, 1964). Dabei ist die Wirksamkeit des Impfstoffes abhängig vom Gehalt des von den Bakterien