

- 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). Toxigenic 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, 2007-2010.
- 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). Linienpass 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. II/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

sezernierten letalen, nekrotisierenden α -Toxins. Der perakute Verlauf der Erkrankung wird auf die Wirkung des Toxins zurückgeführt. Andere Exotoxine scheinen nur eine untergeordnete Rolle im Krankheitsgeschehen zu spielen.

Das α -Toxin führt durch Ausbildung von Poren in der Membran der Wirtszellen zu deren Absterben. Das Molekulargewicht wird mit 45-48 Kd angegeben (Ballard, 1992; Cortiñas, 1997).

Bei der Wirksamkeitskontrolle von *C. septicum* α -Toxin-haltigen Impfstoffen ist nach dem Deutschen Arzneibuch (1992, 10. Ausgabe) ein Neutralisationstest in der Maus gefordert. Hierzu werden zunächst 10 Kaninchen im Abstand von 21 Tagen mit dem zu prüfenden Impfstoff immunisiert und nach weiteren 14 Tagen geblutet. Aus den gewonnenen Seren wird ein Serumpool hergestellt. Für den Neutralisationstest werden verschiedene Verdünnungen des Antiserums angelegt und mit einem Standardantigen gemischt. Mindestens zwei Mäusen pro Verdünnung wird die Mischung intravenös oder intraperitoneal injiziert. Eine Kontrollgruppe, injiziert mit einer Mischung aus Standardserum und Standardantigen, ist mitzuführen. Der Impfstoff hat die Prüfung bestanden, wenn er mindestens 2,5 I.E./ml enthält.

Der Nachweis von schützenden Antikörpern gegen das zytotoxische α -Toxin von *C. septicum* in den Seren von Versuchstieren, letztlich auch im Zieltier, soll alternativ in der Zellkultur etabliert und standardisiert werden.

Basierend auf den Erfahrungen zum Nachweis des α -Toxins von *C. perfringens* wurden Untersuchungen zur Standardisierung eines Zytotoxinhemmungstests durchgeführt.

Dazu wurden Stämme des Erregers zur Antigengewinnung ausgewählt und die Produktionsparameter für eine maximale Toxinausbeute optimiert. Weiterhin wurde eine Zelllinie selektiert, die bei guter Handhabbarkeit die größte Empfindlichkeit gegen das α -Toxin aufwies.

Die Eignung des Zytotoxinhemmungstests zum Nachweis von Antikörpern in Testseren aus der Chargenprüfung und aus einer Feldimpfung im Zieltier wurde überprüft.

2 Material und Methoden

Zur Produktion des α -Toxins wurden zwei Stämme *C. septicum* ausgewählt. Zum ei-

nen handelte es sich um den Referenzstamm 547 der *National Collection of Type Cultures* (NCTC), UK, der sich durch eine hohe Toxinproduktion auszeichnete. Zum anderen wurde ein Feldstamm, Labor-Nr. 2258, zur Toxinproduktion herangezogen. Dieser Stamm konnte aus Proben eines lokalen Ausbruchs von Geburtsrauschbrand bei Kühen isoliert werden. Zur Gewinnung des Antigens im Bioreaktor erfolgte die Optimierung der Produktionsparameter.

Die Inkubation des Referenzstammes 547 wurde in Herz-Hirn-Bouillon (HHB) bei 38° C durchgeführt, die des Feldstammes 2258 in *Reinforced Clostridia Medium* (RCM), ebenfalls bei 38° C. Das Redoxpotential in der Bakteriensuspension wurde per Durchflußelektrode verfolgt. Die Kulturen wurden nach der Ernte sofort auf 4° C heruntergekühlt und in zwei Filtrationschritten (Trenngrenzen: 1 Mio d und 30 Kd) vorgeeignet und aufkonzentriert.

Aus toxoidiertem Kulturüberstand des Feldstammes 2258 wurde ein Impfstoff hergestellt. Mit der Toxoidvakzine wurden Kühe und Kaninchen nach den Vorschriften des DAB 10 immunisiert.

Die Null- und Antiseren der geimpften Tiere wurden im entwickelten Zytotoxinhemmungstest untersucht.

Außerdem standen Seren aus der offiziellen Wirksamkeitsprüfung sechs kommerzieller Clostridienvakzinen zur Verfügung.

Die eingesetzten Zellen stammten von den Linien BHK21-BSR/PK5/88, CHO-K1, MDCK, 3T3 und EBL. Mit dem Ziel, die sensitivste Zelllinie zu finden, wurden Zytotoxintests mit den α -Toxinen der Antigenproduktionsstämme durchgeführt.

Die Durchführung des entwickelten Zytotoxinhemmungstests erfolgte in Flachbodenmikrotiterplatten (96 Kavitäten). In Vorverdünnungsplatten wurden Titrationsstufen des zu prüfenden Serums zusammen mit α -Toxin-Lösung eine Stunde inkubiert, um die Antigen-Antikörperbindung zu ermöglichen. Die inkubierten Lösungen wurden in Zellkultur-Mikrotiterplatten übertragen und Medium (MEM-Medium, versetzt mit 10% fötalem Kälberserum) sowie Zellsuspension ($1,0 \times 10^5$ Zellen/ml) zugegeben.

Zuvor war in Zytotoxintests die Konzentration der α -Toxinlösung ausgetitriert worden, so daß noch etwa 10% lebende Zellen in einer Kavität nachgewiesen wurden.

Die zu prüfenden Seren wurden ebenfalls in Zytotoxintests auf unspezifische

Wechselwirkungen (zytotoxischer oder zellwachstumsfördernder Art) untersucht.

Auf jeder Platte wurde als Kontrolle positives und negatives Laborreferenzserum mitgeführt. Die Inkubation erfolgte 72 h bei 37° C in 5% CO₂-Atmosphäre.

Zur Auswertung der Testplatten wurden die lebenden Zellen selektiv mit MTT, einem Tetrazoliumsalz, angefärbt und die Extinktion in den Kavitäten bei 570 nm mittels eines ELISA-Readers photometrisch erfaßt.

Der Antikörpertiter eines Serums wurde in „serumneutralisierenden Einheiten (SNE/ml)“ angegeben. Es handelt sich dabei um den reziproken Wert derjenigen Verdünnungsstufe eines Serums, in welcher rechnerisch 50% der Zellen vital verbleiben.

Analog dazu wurden in den Zytotoxintests „zytotoxische Einheiten (CE/ml)“ angegeben.

3 Ergebnisse

Die Antigenproduktionsstämme (*C. septicum* Referenzstamm 547 und Feldstamm Labor-Nr. 2258) wurden im Göttinger Bioreaktor bei verschiedenen pH-Werten in Batchläufen inkubiert. Die Ernte des Kulturüberstandes erfolgte zum Ende der logarithmischen Phase des bakteriellen Wachstums, die durch ein Minimum des Redoxpotentials gekennzeichnet ist. In vorangegangenen Versuchen hatte sich gezeigt, daß dieser Erntezeitpunkt sowohl mit einer hohen Bakteriendichte, als auch mit einem optimalen α -Toxintiter korreliert.

Die Gehalte an α -Toxin in den Überständen wurden in Zytotoxintests ermittelt. Die höchste Ausbeute an α -Toxin wurde bei Inkubation mit pH 7,2 erzielt.

Weiterhin wurden α -Toxin-Ernten von Batchläufen mit Ernten aus einer kontinuierlichen Kultur über einen Zeitraum von 10 Tagen verglichen. Zu Beginn der kontinuierlichen Kultur wurden ähnlich hohe α -Toxintiter wie in der Batchkultur nachgewiesen. Nach einem Tag verringerten sich die Werte um 2/3 bis 1/2 des Ausgangstiters. In Voruntersuchungen war ein Nachlassen der toxischen Aktivität einer reinen Toxinlösung ab etwa 24 h Inkubation bei Raumtemperatur (21° C) bzw. 37° C gezeigt worden.

Nach der Vorreinigung der Kultur aus der optimierten Batchkultur konnte α -Toxin-haltiger Überstand des Referenzstammes 547 mit einem Toxintiter von 25.000

CE/ml gewonnen werden. Im Kulturüberstand des Feldstammes 2258 wurde ein durchschnittlicher Titer von 6.000 CE/ml ermittelt.

Im Zytotoxinhemmungstest mußte das Toxin des Referenzstammes 547 1:8500 verdünnt werden, das Toxin des Feldstammes 2258 1:1000.

In Zytotoxintests mit verschiedenen Zelllinien erwies sich die Zelllinie BHK21-BSR/PK5/88 aus Hamsternieren als die empfindlichste Linie gegen das α -Toxin sowohl des Feld- als auch des Referenzstammes.

Eine Vorverdünnung der Prüf- und Kontrollseren von 1:16 schloß unspezifische Wechselwirkungen aus.

In dem entwickelten Zytotoxinhemmungstest wurden zunächst die Null- und Antiseren von 22 Kühen getestet. Die Tiere waren mit Toxoidimpfstoff von Feldstamm 2258 geimpft worden. Als laborinternes Referenzserum für alle folgenden Tests wurde das Serum eines der mit demselben Impfstoff immunisierten Kaninchen verwendet. Das Laborreferenzserum zeigte im Test einen Titer von 350 SNE/ml. Getestet wurde jeweils gegen das α -Toxin des Antigenproduktionsstammes 2258 (Abb. 1).

Es wurden bis zu 5 Wiederholungen eines Tests durchgeführt; alle Ergebnisse waren reproduzierbar. Die individuellen Unterschiede waren stark ausgeprägt. Bezüglich des Antikörpergehaltes in den Seren bzw. der Reaktion auf Vakzinierung kristallisierten sich drei Varianten heraus: 16 Kühe (Gruppe 2 und 3), fast 2/3 der Tiere, reagierten auf die Impfung mit einer starken bis sehr starken Erhöhung des Antikörpertiters (100% und mehr). Von diesen Tieren zeigte die Hälfte (Gruppe 2) bereits vor der Impfung einen nachweisbaren Antikörpertiter im Serum. In Seren von Tieren aus Gruppe 3 wurden wenig bis keine Antikörper im Nullserum nachgewiesen. Tiere aus Gruppe 2 zeigten auch im Antiserum sehr hohe Titer von 1000-5500 SNE/ml. In Antiseren aus Gruppe 3 fanden sich geringere Titer bis etwa 500 SNE/ml.

Die übrigen 6 Tiere (Gruppe 1) reagierten nach der Impfung kaum oder gar nicht mit einer Erhöhung des Antikörpertiters.

Die Seren aus der Wirksamkeitsprüfung sechs verschiedener Clostridienimmunpräparate wurden sowohl gegen α -Toxin des Impfstoffproduktionsstammes als auch des Referenzstammes *C. septicum* 547 getestet (Abb. 2).

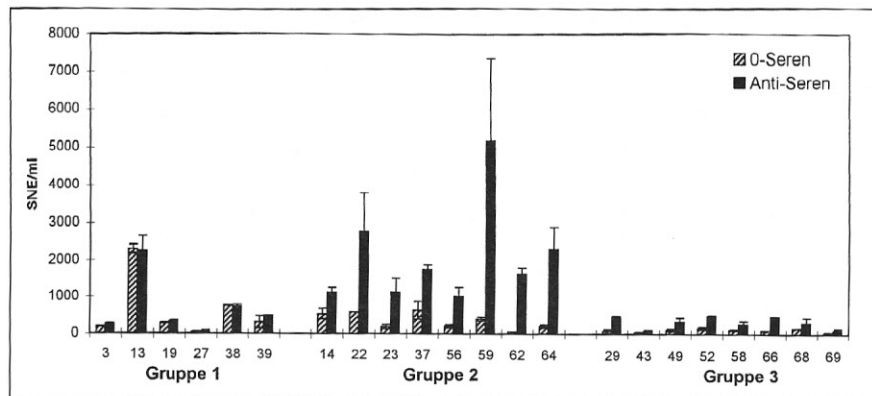


Abbildung 1: Antikörpertiter in Null- und Antiseren von Kühen, geimpft mit *C. septicum* 2258-Toxoidimpfstoff

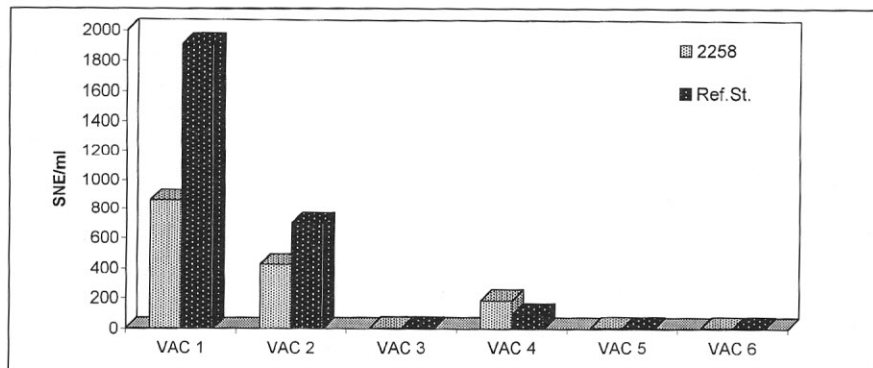


Abbildung 2: Antikörper in Seren aus der Wirksamkeitsprüfung kommerzieller Impfstoffe

Antikörper in den Testseren von VAC 1, 2 und 4 waren in der Lage, das α -Toxin beider eingesetzter Stämme *C. septicum* zu neutralisieren. Für VAC 1 ergab sich jeweils der höchste, für VAC 2 ein mittlerer und für VAC 4 ein niedriger Antikörperspiegel, unabhängig vom eingesetzten α -Toxin.

In den Testseren der Impfstoffe 3, 5 und 6 wurden keine Antikörper gegen *C. septicum* 547 oder 2258 gefunden.

Bei VAC 3 handelte es sich um eine monovalente *C. chauvoei*-Vakzine. So entspricht der ermittelte Antikörpertiter von 0 SNE/ml den Erwartungen.

4 Diskussion

Die ersten Ergebnisse, die mit dem neuen Zytotoxinhemmungstest erarbeitet worden sind, deuten darauf hin, daß es sich um eine Methode handelt, die sich durch Empfindlichkeit, Reproduzierbarkeit und einfache Handhabbarkeit auszeichnet.

Bei der Optimierung der Produktionsparameter im Bioreaktor wurde nicht in kontinuierlicher Kultur inkubiert, da sich über Zeiträume von länger als einem Tag Toxinverluste ergaben. Möglicherweise

verursachen die Bedingungen der kontinuierlichen Kultur eine Änderung im Stoffwechsel der Bakterien dahingehend, daß weniger α -Toxin produziert wird. Oder aber der Anteil an aktivem α -Toxin in der Gesamtbakteriensuspension und damit in dem kontinuierlich geernteten Anteil sinkt mit steigendem Alter der Kultur.

Bei den Untersuchungen der höhertitrierten Kuhseren traten vergleichsweise hohe Standardabweichungen auf. Dies hängt mit dem Verdünnungssystem in 1:2-Schritten zusammen. In den kritischen Bereichen sollten solche Seren in engeren Verdünnungsstufen geprüft werden.

Im Nullserum der mit Toxoidimpfstoff von Feldstamm 2258 geimpften Kuh Nr.13 wurde ein sehr hoher Antikörpertiter gefunden. Da es sich um einen Feldversuch handelte, ist zu vermuten, daß das Tier bereits vor der Impfung Kontakt mit dem Antigen hatte. Dies wäre denkbar bei einer vorangegangenen, nicht dokumentierten Impfung oder einer unbemerkt gebliebenen Infektion.

Nach einer weiteren Optimierung der *in vitro* Methode erfolgt die Erarbeitung einer Standard Operating Procedure (SOP)

für den Zytotoxinhemmungstest. Ebenso wird ein Abgleich der ermittelten Werte, angegeben in SNE/ml, mit dem internationalen Standardserum durchgeführt. Um die Gleichwertigkeit der *in vitro* Methode zu demonstrieren, ist des weiteren ein direkter Vergleich zwischen dem Neutralisationstest in der Maus und der Ersatzmethode geplant.

Die Untersuchungen werden im Rahmen eines vom BMBF geförderten Projektes durchgeführt.

Literatur

- Ballard, J., Bryant, A., Stevens, D. and Tweten, R. K. (1992). Purification and characterization of the lethal Toxin (α -Toxin) of *Clostridium septicum*. *Infection and Immunity* 60 (3); 784-790.
- Cortiñas, T. I., Mattar, M. A. and Stefani de Guzmán, A. M. (1997). α -Toxin Production by *Clostridium septicum* at different Culture Conditions. *Anaerobe* 3 (2-3); 199-202.
- Deutsches Arzneibuch (1992). *Monographie: Pararauschbrandimpfstoffe für*

Tiere. 10. Ausgabe. Stuttgart: Deutscher Arzneibuchverlag.

Gräßer, A. (1964). Probleme der Toxin-gewinnung aus *Clostridium-septicum*-Kulturen. *Archiv experimenteller Veterinärmedizin* 19 (1); 307-310

Korrespondenzadresse

Dipl.-Biol. Katja Jansen
Institut für Pflanzenbau und Tierproduktion in den Tropen und Subtropen
Bereich Tierhygiene
Kellnerweg 6
D-37077 Göttingen



Entwicklung und Prävalidierung von Alternativmethoden zur Wirksamkeitsprüfung von *Clostridium perfringens*-Impfstoffen

Elvira Ebert, Volker Öppling, Esther Werner und Klaus Cußler
Paul-Ehrlich-Institut, D- Langen

Zusammenfassung

Die Wirksamkeit von *Clostridium* (*C.*) *perfringens*-Impfstoffen wird nach der Monographie 363 der Europäischen Pharmakopöe in einem Tierversuch geprüft. Als Ersatz für die nach Arzneibuch geforderten Mäuse-Neutralisations-Tests (MNT) für Clostridientoxine wurde ein Capture-ELISA zum Nachweis von Betaantitoxin sowie ein Competitive-ELISA zum Nachweis von Epsilonantitoxin entwickelt. Beide Testsysteme arbeiten mit monoklonalen Antikörpern zur quantitativen Bestimmung der zu überprüfenden Antitoxine.

Der Beta- und Epsilonantitoxingehalt von insgesamt 523 Proben wurde parallel zur Routinechargenkontrolle im MNT mit den ELISA-Methoden geprüft. Beide ELISAs erwiesen sich als sehr spezifische, reproduzierbare und geeignete Methoden, um den geforderten MNT ersetzen zu können. Im Rahmen einer Prävalidierungsstudie wurde die Anwendbarkeit der Standardarbeitsanweisungen sowie die Übertragbarkeit der ELISA-Methoden in andere Laboratorien überprüft. Die Studie konnte die Eignung beider ELISAs als Ersatzmethoden zum MNT für die Chargenprüfung von beta- und epsilontoxoidhaltigen Veterinärimpfstoffen bestätigen.

Keywords: *C. perfringens*, potency testing, alternative methods, ELISA, prevalidation

Summary: Development and prevalidation of alternative methods for the potency testing of *C. perfringens* vaccines

The requirements for the quality control of *C. perfringens* vaccines for veterinary use are described in the monograph 363 of the European Pharmacopoeia (Ph. Eur.). In the current used potency test neutralising antibodies against *C. perfringens* beta- and epsilontoxin are determined in a mouse neutralisation test (MNT). Two ELISA methods were developed for the replacement of the MNT. Both methods use monoclonal antibodies to determine the quantity of specific antibodies against beta toxin (Capture-ELISA) and epsilon toxin (Competitive-ELISA) *in vitro*. In parallel to the routine batch potency test in mice, the beta- and epsilonantitoxin levels in 523 samples were estimated in the ELISA procedures. A high specificity and a good reproducibility are evident for both test systems. An interlaboratory prevalidation study was carried out to evaluate the relevance and the transferability of the ELISA procedures. It is concluded that both ELISA systems seems to be suitable alternative methods for assessing the potency of beta- and epsilontoxoid in batches of vaccines for veterinary use.

1 Einleitung

Für die Wirksamkeitsprüfung von *C. perfringens* beta- und epsilontoxoidhaltigen Veterinärimpfstoffen ist in der Monographie „*Clostridium perfringens* vaccine for veterinary use“ der Europäischen Pharma-

kopöe (Ph. Eur.) ein zweigeteilter Tierversuch vorgeschrieben. Zunächst werden 10 Kaninchen mit dem zu prüfenden Impfstoff immunisiert. Der Pool aus den gewonnenen Kaninchenserum wird danach in einem Mäuse-Neutralisations-Test (MNT) auf seinen Gehalt an Antitoxinen unter-

sucht. Es ist davon auszugehen, daß allein für die Prüfung der in Deutschland zugelassenen Clostridien-Immunpräparate mindestens 16.300 Mäuse pro Jahr eingesetzt werden (Weißer und Hechler, 1997). Das Ziel der vorgestellten Untersuchungen war es, den stark belastenden MNT