

**Aus dem Institut für Pflanzenbau und Tierhygiene
in den Tropen und Subtropen
der Georg-August-Universität Göttingen**

**Methodische Untersuchungen zu
Eigenschaften, Nachweis, Reinigung und Antigenität
des α -Toxins von *Clostridium septicum***

Dissertation

**zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Agrarwissenschaften
der Georg-August-Universität Göttingen**

**vorgelegt von
Katja Jansen
geboren in London**

Göttingen, Mai 2000

D 7

1. Referent: Prof. Dr. Dr. H. Böhnel

2. Korreferent: Prof. Dr. G. Gottschalk

Tag der mündlichen Prüfung: 18.5.2000

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG.....	1
2	LITERATURÜBERSICHT	3
2.1	Clostridien und Clostridiosen	3
2.2	<i>Clostridium septicum</i> (<i>C. septicum</i>)	4
2.3	Toxine von <i>C. septicum</i>	4
2.3.1	α-Toxin.....	6
2.3.1.1	Aktivierung	7
2.3.1.2	Zytopathischer Mechanismus	7
2.3.1.3	Lokalisierung des Gens.....	8
2.3.1.4	α-Toxin und Aerolysin	8
2.3.1.5	Molekularer Mechanismus der Zellzerstörung	9
2.4	Pathogenität von <i>C. septicum</i>	11
2.4.1	Diagnose und Identifizierung	11
2.4.2	Differenzierung von <i>C. septicum</i> und <i>C. chauvoei</i>	12
2.4.3	Krankheitsverlauf	15
2.4.4	Bedeutung der Toxine im Infektionsgeschehen	15
2.4.5	Invasivität und Ätiologie	16
2.4.6	Therapie von Infektionen	17
2.5	Prophylaxe	17
2.5.1	Zusammensetzung von Vakzinen.....	18
2.5.2	Adjuvantien	18
2.5.3	Lokalspezifische Vakzinen.....	19
2.5.4	Herstellung von Toxoidvakzinen aus Kulturen des Erregerstammes	20
2.5.5	Impfstoffqualität in tropischen Regionen.....	20
2.5.6	Protektivität des α-Toxins.....	21
2.6	Bewertung von Impfstoffen.....	21
2.6.1	Ersatzmethoden für Tierversuche.....	23
2.6.2	Nachweis von humoralen Antikörpern gegen Antigene von <i>C. septicum</i>	24
3	EIGENE UNTERSUCHUNGEN	25
3.1	Charakteristik der Toxinproduktionsstämme	25
3.1.1	Morphologie	25
3.1.1.1	Material	25
3.1.1.1.1	Bakterienstämme	25
3.1.1.1.2	Nährlösungen und feste Nährböden	25
3.1.1.2	Methoden	26

3.1.1.3	Ergebnisse	26
3.1.1.3.1	Flüssigkulturen	26
3.1.1.3.2	Kolonieformen auf festen Nährböden	27
3.1.2	Gaschromatografie	27
3.1.2.1	Methode	27
3.1.2.2	Ergebnisse	28
3.1.3	Immunfluoreszenz	28
3.1.3.1	Material und Methode	28
3.1.3.2	Ergebnisse	29
3.1.4	Polymerase-Kettenreaktion	29
3.1.4.1	Material und Methoden	29
3.1.4.2	Ergebnisse	31
3.1.5	Hämolyseaktivität	31
3.1.5.1	Material	31
3.1.5.2	Methode	32
3.1.5.3	Ergebnisse	33
3.1.6	Zytolytische Aktivität	34
3.1.6.1	Material und Methode	34
3.1.6.2	Ergebnisse	34
3.2	Standardisierung eines Zytotoxizitätstests mit Mammalia-Zellkulturen	35
3.2.1	Zellkulturen	35
3.2.1.1	Material	35
3.2.1.2	Schema der Zellkultur	35
3.2.2	Aufbau des Zytotoxizitätstests	36
3.2.2.1	Material	36
3.2.2.2	Methode	36
3.2.2.3	Anfärbung der vitalen Zellen zur Auswertung	37
3.2.2.4	Kalkulation der Ergebnisse der Zytotoxizitätstests	37
3.2.3	Optimierung des Zytotoxizitätstests	38
3.2.3.1	Auswahl der sensitivsten Zelllinie	38
3.2.3.1.1	Material und Methoden	38
3.2.3.1.2	Ergebnisse	38
3.2.3.2	Auswirkung der Anzahl Passagierungen	39
3.2.3.2.1	Material und Methoden	39
3.2.3.2.2	Ergebnisse	40
3.2.3.3	Zelltoxizität von Bakterienmedien, Chromatografiepuffern, Trypsin- und Ammoniumsulfatlösungen	41
3.2.3.3.1	Material und Methoden	41
3.2.3.3.2	Ergebnisse	42
3.2.3.4	Zeitpunkt der Toxinzugabe im Zytotoxizitätstest	43
3.2.3.4.1	Material und Methoden	43
3.2.3.4.2	Ergebnisse	43
3.3	Produktion von α -Toxin: Fermentation und Filtration	43
3.3.1	Auswahl des Bakterien-Nährmediums	44
3.3.1.1	Material und Methode	44
3.3.1.2	Ergebnisse	44

3.3.2	Vergleich der Toxinproduktion in Röhren- und Fermenterkultur.....	45
3.3.2.1	Material und Methoden.....	45
3.3.2.2	Ergebnisse.....	45
3.3.3	Die Toxinproduktion im Fermenter in kontinuierlicher Kultur.....	46
3.3.3.1	Material und Methoden.....	47
3.3.3.2	Ergebnisse.....	47
3.3.4	Optimierung des Erntezeitpunktes.....	49
3.3.4.1	Material und Methoden.....	49
3.3.4.2	Ergebnisse.....	49
3.3.5	Optimierung des pH-Wertes.....	51
3.3.5.1	Material und Methoden.....	51
3.3.5.2	Ergebnisse.....	51
3.3.6	Filtration der Kulturüberstände.....	52
3.3.6.1	Material und Methoden.....	52
3.3.6.2	Ergebnisse.....	53
3.4	Eigenschaften des α -Toxins.....	53
3.4.1	Material.....	53
3.4.2	Lagerung des α -Toxins.....	54
3.4.2.1	Lagerung bei Temperaturen über 0 °C.....	54
3.4.2.1.1	Methoden.....	54
3.4.2.1.2	Ergebnisse.....	54
3.4.2.2	Lagerung bei Temperaturen unter 0 °C.....	55
3.4.2.2.1	Methoden.....	55
3.4.2.2.2	Ergebnisse.....	55
3.4.2.3	Langzeitlagerung.....	56
3.4.2.3.1	Methoden.....	56
3.4.2.3.2	Ergebnisse.....	56
3.4.2.4	Lagerung in verschiedenen Resuspensionslösungen.....	57
3.4.2.4.1	Material und Methoden.....	57
3.4.2.4.2	Ergebnisse.....	57
3.4.3	Effekt des wiederholten Auftauens und Einfrierens.....	58
3.4.3.1	Methoden.....	58
3.4.3.2	Ergebnisse.....	58
3.4.4	Lyophilisierbarkeit des α -Toxins.....	59
3.4.4.1	Material und Methoden.....	59
3.4.4.2	Ergebnisse.....	59
3.4.5	Filtrierbarkeit des α -Toxins.....	60
3.4.5.1	Material und Methoden.....	60
3.4.5.2	Ergebnisse.....	61
3.4.6	Einfluss von Trypsin auf das α -Toxin.....	61
3.4.6.1	Material und Methoden.....	62
3.4.6.2	Ergebnisse.....	62
3.5	Aufreinigung des α -Toxins von <i>Clostridium septicum</i> , Referenzstamm NC 547, mittels Niederdrucksäulenchromatographie (FPLC).....	62
3.5.1	Untersuchung der Proben während der Aufreinigungsschritte.....	63
3.5.1.1	Toxizitätsnachweis.....	63

3.5.1.2	Darstellung des Toxins in der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	63
3.5.1.2.1	Material	63
3.5.1.2.2	Methoden	63
3.5.1.3	Immunoblot	64
3.5.1.3.1	Seren	64
3.5.1.3.2	Geräte, Membranen und Lösungen	64
3.5.1.3.3	Methode	65
3.5.1.4	Quantitativer Proteinnachweis (nach LOWRY 1951)	65
3.5.2	Chromatografie	66
3.5.2.1	Material	66
3.5.2.1.1	Geräte und Säulen	66
3.5.2.1.2	Ausgangsmaterial	67
3.5.2.1.3	Chromatografiepuffer	67
3.5.2.2	Methoden	67
3.5.2.3	Ergebnisse der Vorversuche	67
3.5.3	Aufbereitung der Proben	68
3.5.3.1	Lagerung der Proben	68
3.5.3.2	Entsalzung durch Dialyse	68
3.5.3.2.1	Material und Methoden	69
3.5.3.2.2	Ergebnisse	69
3.5.3.3	Konzentrierung durch Ammoniumsulfatfällung	70
3.5.4	Hauptreinigung des α -Toxins	70
3.5.4.1	Material	70
3.5.4.2	Verfahrensbeschreibung	71
3.5.4.3	Ausbeute der Aufreinigung	71
3.5.4.4	Darstellung des Reinigungsprozesses und des Endproduktes im SDS-Polyacrylamidgel und im Immunoblot	71
3.5.5	Eigenschaften des reinen α -Toxins	72
3.5.5.1	Molekülmasse	72
3.5.5.2	Hämolyse	73
3.5.5.3	Mäuseletalität	73
3.5.5.3.1	Material und Methoden	73
3.5.5.3.2	Ergebnisse	74
3.6	Produktion und Einsatz eines lokalspezifischen Toxoidimpfstoffes des	75
3.6.1	Herstellung und Anwendung des Impfstoffes	75
3.6.1.1	Herkunft des Impfstoffproduktionsstammes	75
3.6.1.2	Kultivierung des <i>C. septicum</i> -Feldstammes 2258	75
3.6.1.3	Toxoidierung der Fermenterkultur	75
3.6.1.4	Filtration der toxoidierten Kultur	75
3.6.1.5	Applikation des stallspezifischen Impfstoffes und Entnahme von Blutproben	76
3.6.1.6	Immunisierung von Kaninchen zur Herstellung eines laborinternen Standardserums	77
3.6.2	Toxinneutralisationstest mit Zellkultur	77
3.6.2.1	Material	77
3.6.2.2	Methoden	77
3.6.2.3	Kalkulation der Ergebnisse des Toxinneutralisationstests	78

3.6.3	Ergebnisse der Neutralisationstests der Rinderseren	79
3.6.3.1	Antikörpergehalt in den Seren der Kühe vor und nach Vakzinierung	79
3.6.3.2	Antikörpergehalt in den Seren von Kälbern geimpfter Mutterkühe	80
3.6.3.3	Impferfolg im Stall.....	81
3.6.4	Toxinneutralisationsversuche mit anderen Seren.....	81
3.6.4.1	Material und Methode.....	81
3.6.4.2	Ergebnisse	82
4	DISKUSSION.....	83
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	92
6	LITERATURVERZEICHNIS	95
7	ANHANG	I

ABKÜRZUNGEN

ATCC	American Type Culture Collection
BgVV	Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin, Jena
bidest.	bidestillata
BMBF	Bundesministerium für Bildung und Forschung
BSA	Bovine Serum Albumine
CE	Zytotoxische Einheiten
Da	Dalton
DAB	Deutsches Arzneibuch
DNA	Desoxyribonucleic Acid (Desoxyribonukleinsäure)
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
HHB	Hirn-Herz-Bouillon
IU	International Units (Internationale Einheiten)
IVZ	Institut für virale Zoonosen, Potsdam
MTT	3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide
NCTC	National Collections of Type Cultures and Pathogenic Fungi (London, UK)
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerasekettenreaktion)
PEI	Paul-Ehrlich-Institut
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RNA	Ribonucleic Acid (Ribonukleinsäure)
RCM	Reinforced Clostridial Medium
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate (Natriumdodecylsulfat)
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SNE	Serumneutralisierende Einheiten
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
USDA	United States Department of Agriculture, Ames, Iowa, US
WHO	World Health Organization

1 EINLEITUNG

In der Gattung der *Clostridia* sind grampositive, aerotolerante bis streng anaerobe Mikroorganismen mit der Fähigkeit zu Sporenbildung zusammengefaßt. Es sind zahlreiche pathogene Organismen vertreten, die klinisch bedeutsame Infektionen im Menschen hervorrufen, aber auch wirtschaftliche Verluste in der Nutztierhaltung, vornehmlich bei Wiederkäuern, verursachen. Insbesondere in der extensiven Tierhaltung, die in tropischen und subtropischen Gebieten vorherrscht, führen die von verschiedenen Clostridienspezies, darunter *Clostridium septicum*, verursachten Boddenseuchen zu immer wiederkehrenden Verlusten.

C. septicum-Infektionen sind charakteristischerweise mit dem Auftreten von gasgefüllten schmerzhaften Schwellungen und einer rapiden Verschlechterung des Befindens der betroffenen Tiere verbunden. *Post mortem* breiten sich die ödematisierten Bereiche rasch aus und es kommt zur Invasion der betroffenen Regionen durch andere Mikroorganismen. Die Diagnose des Erregers wird dadurch erschwert, zumal eine Reihe weiterer Clostridienspezies in der Lage sind, ähnliche Krankheitsbilder hervorzurufen (SEIFERT 1992 und 1995). Auf Grund der Ätiologie und Symptomatik wurde *C. septicum* mit *C. chauvoei*, *C. perfringens*, *C. haemolyticum*, *C. histolyticum*, *C. novyi* und *C. sordellii* zur Gruppe der Erreger des Gasödemkomplexes zusammengefaßt (SEIFERT 1992). Der Gruppe gehören außerdem lokalspezifische Stämme an, die keiner der Spezies zuzuordnen sind.

Da Clostridieninfektionen oft fulminant verlaufen und antibakterielle Therapieformen ohne Erfolg bleiben, ist eine Vakzinierung von Nutztieren der erfolgversprechendste Weg zur Vermeidung von Verlusten. In dem Krankheitsgeschehen spielen von den Bakterien sezernierte toxische Makromoleküle eine herausragende Rolle. In Kulturüberständen von *C. septicum*-Kulturen ist das letale, nekrotische, zelltoxische α -Toxin enthalten. Impfstoffe auf Basis von toxoidiertem α -Toxin bewirken einen guten Immunschutz. *C. septicum*-Stämme verschiedener geografischer Herkunft variieren in der serologischen Struktur der produzierten Toxine (SEIFERT 1992 und 1995). Kommerzielle Vakzinen auf Basis der Antigene einiger weniger Impfstoffproduktionsstämme sind bisweilen nicht in der Lage, ausreichenden Immunschutz zu erzeugen. In solchen Fällen bietet es sich an, Toxoidvakzinen aus lokalspezifischen Erregern zu produzieren.

Toxoidvakzinen werden aus toxinhaltigen Kulturüberständen der Erreger gewonnen. Der Göttinger Bioreaktor ist ein zur Kultivierung von Bakterien unter anaeroben Bedingungen geeignetes System (BÖHNEL 1986). Die Kulturen werden, sofern an die Produktion eines Impfstoffes gedacht ist, durch Formalinisierung inaktiviert.

Eine Reinigung der Kultur zur Gewinnung der Toxine kann mit Hilfe einer Kaskaden-Cross-Flow-Filtrationsanlage durchgeführt werden, wobei in einem ersten Schritt die Bakterien vom Kulturüberstand getrennt und im zweiten Schritt die Toxine bzw. Toxoide aufkonzentriert werden.

Auf Grund der zytolytischen Eigenschaften des Letaltoxins von *C. septicum* können Tests mit sensitiven *in vitro*-Zellkulturen zum quantitativen Nachweis des α -Toxins herangezogen werden.

Bei der Wirksamkeitskontrolle von Impfstoffchargen, die Antigene von *C. septicum* enthalten, sind nach der EUROPÄISCHEN PHARMAKOPOEIA (1997) Kaninchen zu immunisieren. Der Antikörpertiter in den gepoolten Seren der Tiere ist in einem

Mäuseneutralisationstest quantitativ zu bestimmen. Insbesondere die Belastung der Mäuse im Neutralisationstest ist beträchtlich, da die Tiere ohne ausreichenden Immunschutz an der Infektion verenden. Der Ersatz des Mäuseneutralisationstests durch eine *in vitro*-Methoden ist ein zeitgemäßer Beitrag zur Reduzierung von Tierversuchen in der Qualitätskontrolle veterinärmedizinischer Produkte.

Die vorliegende Arbeit ist in das vom BMBF geförderte Projekt „Ersatz des Toxinneutralisationstests in der Maus zur Wirksamkeitskontrolle von *C. septicum*-Immunpräparaten für Tiere (DAB 10)“ eingebettet. Im Rahmen des Projektes soll ein ELISA auf der Basis des reinen α -Toxins von *C. septicum* etabliert werden.

Weiterhin soll eine Hybridomzelllinie, die monoklonale Antikörper gegen das α -Toxin produziert, kloniert werden. Die antikörperproduzierenden Zellen werden aus Mäusen präpariert, die mit reinem α -Toxin immunisiert worden waren.

Ziele der vorliegenden Arbeit waren:

- durch Kultivierung von zwei ausgewählten *C. septicum*-Stämmen das zytolytische α -Toxin zu gewinnen. Es handelte sich um den Referenzstamm NC 547 (NCTC) und um einen Feldstamm, der bei einem lokalen Ausbruch von durch *C. septicum* hervorgerufenem Geburtsrauschbrand bei Kühen in Deutschland isoliert worden war. Die Identität der beiden verwendeten Toxinproduktionsstämme sollte abgesichert und eine Differenzierung von der metabolisch und serologisch sehr ähnlichen Spezies *C. chauvoei* versucht werden;
- in Zellkulturtests eine Adhäsionszelllinie zu ermitteln, die sensitiv gegen das α -Toxin von *C. septicum* ist, und die Bedingungen für eine Durchführung der Zellkulturtests für den Nachweis und die Quantifizierung des α -Toxins von *C. septicum* zu optimieren;
- die Parameter für die Produktion des α -Toxins im Göttinger Bioreaktor zu optimieren. Der Kulturüberstand sollte von den Bakterienzellen getrennt und konzentriert werden. Die Eignung des verwendeten Kaskaden-Cross-Flow-Filtrationssystems war zu prüfen;
- den Einfluss von Lagerungsmethoden, Verdünnungslösungen und Inkubation mit Trypsin auf die zytolytische Aktivität des α -Toxins zu überprüfen;
- aus filtrierten Kulturüberständen des Referenzstammes gewonnenes α -Toxin mittels Niedrigdrucksäulenchromatografie aufzureinigen, um es für die Etablierung eines Enzymtestsystems (ELISA) und die Produktion monoklonaler Antikörper aus Maushybridomzellen im Rahmen des Projektes bereitstellen zu können;
- aus einer Kultur des lokalspezifischen *C. septicum*-Feldstammes einen Toxoidimpfstoff herzustellen und in einem Milchviehbestand einzusetzen. Die Seren der

Kühe vor und nach Vakzinierung, sowie die Seren von Kälbern, deren Muttertiere geimpft worden waren, waren in einem *in vitro*-Toxinneutralisationstest auf Basis des im Vorfeld entwickelten Zellkulturtests auf ihren Gehalt an spezifischen Antikörpern gegen das α -Toxin zu prüfen.

2 LITERATURÜBERSICHT

2.1 Clostridien und Clostridiosen

Die Gattung der Clostridien umfaßt grampositive, endosporenbildende, anaerobe Mikroorganismen, die nicht in der Lage sind, Sulfat zu reduzieren (CATO *et al.* 1986, SCHLEGEL 1985). Clostridien sind ubiquitäre Bewohner des Bodens. Sie werden, nach der Aufnahme von Sporen z.B. mit der Nahrung, zudem im Intestinaltrakt vieler Tiere und des Menschen gefunden.

Neben zahlreichen apathogenen Spezies finden sich unter den Clostridien auch pathogene Spezies, die weltweit sowohl im veterinär-, als auch im humanmedizinischen Bereich schwerste Erkrankungen hervorrufen (HARBOLA und KUMAR 1990).

Auf Grund ihrer Epizootiologie werden die Clostridien im veterinärmedizinischen Bereich, gemeinsam mit der aeroben, sporenbildenden Gattung *Bacillus*, der Gruppe der Bodenseuchen zugeteilt (SEIFERT 1992, 1995).

Die durch clostridielle Erreger hervorgerufenen Erkrankungen werden in drei Gruppen differenziert, den Enterotoxämiekomplex, den Gasödemkomplex und den Toxikationskomplex (SEIFERT 1992).

Der Enterotoxämiekomplex faßt die hauptsächlich von *C. perfringens* und seinen Untertypen, sowie seltener von *C. sordellii* und *C. difficile* ausgelösten Erkrankungen, die ihren Ursprung im Intestinaltrakt nehmen, zusammen. Die Ursache sind meist abrupte Veränderungen im Darmmilieu, die auf Fütterungs- und Haltungsfehler oder klimatische Veränderungen zurückzuführen sind (HARWOOD 1996, SEIFERT 1992).

Die Symptome der Erkrankungen des Gasödemkomplexes sind hämorrhagische Veränderungen des Gewebes, oft in Zusammenhang mit charakteristischer Gasbildung. Typischerweise ist der Verlauf der Erkrankungen perakut.

Die zum Gasödemkomplex zusammengefaßte Erregergruppe ist sehr heterogen. Die Erreger sind *C. chauvoei* (früher: *C. fescer*), *C. septicum*, *C. haemolyticum*, *C. histolyticum*, *C. novyi* Typ A-C, *C. sordellii*, *C. perfringens* Typ A-F, sowie verschiedene Feldstämme (SEIFERT 1995), die die gleichen Symptome auslösen, aber keiner der angeführten Spezies zugerechnet werden konnten. Die Erkrankung auslösende Faktoren sind in erster Linie Überstockung, Futtermangel, harte ligninreiche Futterpflanzen, Läsionen der Haut und Schleimhäute und Veränderungen der Darmwandpermeabilität.

Die klassischen Erreger des Toxikationskomplexes sind *C. botulinum* Typ A-F und *C. tetani*, aber auch *C. perfringens* Typ A-F. Die Ursache des Botulismus ist die Aufnahme von Toxinen mit dem Futter, bzw. im Falle des Säuglingsbotulismus die Produktion von Toxinen durch den Erreger im Säugling. Tetanus wird durch das

Eindringen von Sporen von *C. tetani* in den Körper, z.B. bei Verletzungen, und die anschließende Produktion des Neurotoxins ausgelöst.

2.2 *Clostridium septicum* (*C. septicum*)

Die im Rahmen der Arbeit untersuchte pathogene Spezies *C. septicum* (früher: *Bacillus oedematis maligni* und *Vibrion septique*) ist dem Gasödemkomplex zugeordnet. Wie bei allen Clostridien handelt es sich auch bei *C. septicum* um ein weltweit verbreitetes, bodenbewohnendes Bakterium. Vegetative Formen persistieren insbesondere in landwirtschaftlich bearbeiteten Böden, die reich an organischem Material sind (GARCIA und McKAY 1969). Sporen hingegen finden sich angereichert in austrocknenden Böden, da nicht-sporenbildende Mikroorganismen eliminiert werden (SEIFERT 1992).

Sehr häufig wird die Spezies darüberhinaus im Gastrointestinaltrakt von Säugern und Menschen nachgewiesen (SMITH und WILLIAMS 1984, CATO *et al.* 1986). Es gibt jedoch keinen Hinweis darauf, dass sie tatsächlich zur regulären Darmflora des Menschen gehört (ATTEBERY *et al.* 1974, HOLDEMAN *et al.* 1976, KORANSKY *et al.* 1979).

Das Bakterium zeigt typischerweise sehr pleomorphe, stark von den Umgebungsbedingungen abhängende Wuchsformen (MACLENNAN 1962, GRÄSSER 1964). Auf peritonealen Oberflächen infizierter Tiere werden lange Zellketten gefunden (SCHALLEHN 1975). *C. septicum* ist peritrich begeißelt und sehr beweglich. Ältere Kulturen verhalten sich bei Anfärbung oft gramlabil (CATO *et al.* 1986).

Die Spezies stellt nur mäßige Ansprüche an ihre Umgebungsbedingungen und ist ausgesprochen aerotolerant (SMITH und HOLDEMAN 1968, HASAN und HALL 1976).

Bei Rindern und Schafen können Infektionen mit *C. septicum* zum sogenannten Pararanschbrand, Geburtsranchbrand oder zu spontanen Wundinfektionen führen.

2.3 Toxine von *C. septicum*

In den meisten Veröffentlichungen werden α -, β -, δ - und γ -Toxin, sowie eine Sialidase als die bedeutsamsten von *C. septicum* sezernierten Proteine beschrieben.

Das α -Toxin ist das Letaltoxin von *C. septicum*, oft als das Haupttoxin bezeichnet. Es spielt eine zentrale Rolle im Infektionsgeschehen und in der Immunogenität. Ihm werden letale, zytotoxische, nekrotische und auch hämolytische Eigenschaften zugeordnet.

Das β -Toxin von *C. septicum* ist eine thermostabile Desoxyribonuklease. SWIATEK *et al.* zeigten 1987, dass es sich um ein Protein von ca. 45 kDa handelt, welches in großen Mengen im Überstand von *C. septicum*-Kulturen zu finden ist. Die reichliche Produktion wurde nur für *C. septicum* gezeigt. MÜLLER (1970) dokumentierte für die Desoxyribonuklease eine leukozytische Wirkung.

Bei dem δ -Toxin handelt es sich um ein sauerstofflabiles, thiolabhängiges Hämolysin (STEVENS *et al.* 1990, BALLARD *et al.* 1992, CORTIÑAS *et al.* 1997). Das Toxin wird nach MOUSSA (1958) nicht von allen Stämmen konstant produziert. Es ist nach BALLARD *et al.* (1992) nur für 5 % der hämolytischen Aktivität in Kultur-

überständen verantwortlich. Bei der Inkubation von Erythrozyten mit δ -Toxin setzt die Hämolyse sofort ein, es handelt sich um eine „schnelle“ Hämolyse. Die Tatsache, dass auch das α -Toxin hämolytische Eigenschaften hat, machte die Differenzierung des α - und δ -Toxins schwierig, solange es noch keine geeigneten Methoden zur Auftrennung von Proteinen gab.

Das γ -Toxin ist eine hitzelabile Hyaluronidase, die den Abbau von Hyaluronsäure katalysiert. Die Hyaluronsäure ist ein Glykosaminglykan, welches vorwiegend im extrazellulären Raum von Bindegewebe vorliegt (ALBERTS *et al.* 1990).

Sialidasen werden von Clostridien, Pilzen, Protozoen und Viren produziert. Sie sind auch in Eukaryonten zu finden (GADALLA und COLLEE 1968, SCHAUER *et al.* 1979), dort an den Wänden von Blutgefäßen lokalisiert (STRYER 1990). In vielen Arbeiten findet sich für das Enzym ursprünglich die Bezeichnung Neuraminidase, sie sollte jedoch nicht verwendet werden, da das eigentliche Substrat Sialinsäuren sind (SCHAUER 1982). Sialidasen katalysieren die Hydrolyse von α -glykosidisch gebundenen Sialinsäureresten, die häufig terminale Bestandteile von Oligosacchariden, Glykoproteinen und Glykolipiden sind (ALBERTS *et al.* 1990). Die genannten Molekülgruppen wiederum sind oft integrale Bestandteile der Zellwand von Prokaryonten und Eukaryonten und spielen eine Rolle in der interzellulären Kommunikation (STRYER 1990).

Die Sialidase von *C. septicum* wurde kloniert. Das Gen ließ auf ein Protein von ca. 110 kDa (ROTHER *et al.* 1991) schließen, dessen Gensequenz sich deutlich von den Sialidasegenen anderer Spezies unterscheidet. BERRY *et al.* beschrieben 1996 eine begrenzte Homologie zum Gen einer der Sialidasen von *Streptococcus pneumoniae*. ZENZ *et al.* wiesen 1993 für das reife Protein eine Masse von 125 kDa nach.

Außerdem werden von *C. septicum* noch weitere extrazelluläre Toxine produziert. MACLENNAN (1962) und RIDDELL *et al.* (1993) beschrieben ein Fibrinolytin. SHIMIZU *et al.* wiesen 1979 ein hämorrhagisches Prinzip nach, welches nicht identisch war mit dem α -Toxin. HASHIM und HASSAN (1991) beschrieben die Existenz einer Immunglobulin A-Protease mit selektiver Spezifität für IgA1-Moleküle. JONES und WILSON (1993) erwähnten eine Gelatinase.

SMITH und HOLDEMAN (1968) und GRÄSSER (1964) verneinten die Produktion von extrazellulären Proteasen. BALLARD *et al.* (1993) hingegen postulierten eine bakterienbürtige Protease, da die Gegenwart von Proteaseinhibitoren eine Abspaltung des carboxyterminalen Peptids des α -Toxins verhindern konnte.

Nach McBAIN und MACFARLANE (1998) sezerniert *C. septicum* die Enzyme Azoreduktase und Nitratreduktase.

Darüberhinaus produziert die Spezies *C. septicum* Bakteriozine (SCHALLEHN 1975, SCHALLEHN und KRÄMER 1975), bzw. phagenartige Substanzen, die das Wachstum anderer Bakterienstämme inhibieren (CATO *et al.* 1986).

C. septicum produziert zudem intrazelluläre speziestypische Substanzen wie das Hämagglutinin, welches von GADALLA und COLLEE (1968) beschrieben wurde.

In der Arbeit von BÖHNEL (1988) findet sich ein Überblick über die ca. 50 bis zu dem Zeitpunkt beschriebenen Proteine.

2.3.1 α -Toxin

BERNHEIMER (1944) untersuchte die hämolytische und die letale Aktivität von *C. septicum*-Kulturüberständen und kam zu dem Schluß, dass beide Aktivitäten einer Entität zugeordnet werden konnten, die eine „langsame“ Hämolyse vermittelte. Auf Grund technischer Voraussetzungen war er nicht in der Lage, die Aktivitäten voneinander zu trennen.

Oxidation mit Wasserstoffperoxid führte zu irreversiblen Aktivitätsverlusten.

In im Jahre 1958 durchgeführten Untersuchungen wurde eine thermostabile, sauerstoffunempfindliche hämolytische Aktivität gefunden, die eine „langsame“ Hämolyse vermittelte, sowie ein letales Nekrotoxin, welches bei 4 °C rasch an Aktivität verlor. Die Titer beider Aktivitäten zeigten Parallelität und die hämolytische und die letale Aktivität wurden auf ein einziges Prinzip zurückgeführt und als α -Toxin bezeichnet (MOUSSA 1958). Darüberhinaus wurde eine weitere hämolytische Aktivität nachgewiesen, die sich durch Oxidation in Gegenwart von Sauerstoff reversibel inaktivieren ließ. Die durch letztere Aktivität vermittelte Hämolyse trat bereits in den ersten Minuten der Inkubation mit Erythrozyten ein, sie wurde als δ -Toxin bezeichnet (MOUSSA 1958).

TAKANO und KONDO (1987) wiesen durch chromatografische Auftrennung ebenfalls zwei verschiedene hämolytische Aktivitäten verschiedener Intensität nach. Die eine, L-Fraktion genannte, war Trägerin des größeren Anteils der hämolytischen Aktivität und hitzelabil. Über eine Inkubationsdauer von 5 h stieg die Zahl lysierter Erythrozyten kontinuierlich an. Die andere, als H-Fraktion bezeichnete, hämolytische Aktivität war eher unempfindlich gegen Erwärmung auf 37 °C. Sie erreichte bereits nach zwei Stunden die größte hämolytische Aktivität, die sich auch nach fünfstündiger Inkubation nicht weiter erhöhte. TAKANO und KONDO (1987) zeigten auf, dass die Art und Weise der Durchführung eines Hämolysetests sorgfältig standardisiert werden muss, um vergleichbare Ergebnisse zu erzielen. Sie deuteten an, dass die Uneinigkeit, die bezüglich der hämolytischen Eigenschaften von Kulturüberständen von *C. septicum* bestand, auf Diskrepanzen in der Versuchsanordnung und -durchführung bei verschiedenen Autoren zurückzuführen sei.

SHIMIZU *et al.* (1979) ordneten die nekrotisierende Aktivität, die auch letale, hämolytische und im Kaninchenhauttest permeabilitätssteigernde Wirkung hatte, dem α -Toxin von *C. septicum* zu.

Seit die Proteinnatur der verschiedenen, von *C. septicum* sezernierten Toxine erkannt wurde und Möglichkeiten bestehen, Proteinkomponenten in Lösungen voneinander zu trennen, beispielsweise durch chromatografische Verfahren, oder durch isoelektrische Fokussierung, ist als gesichert anzusehen, dass das α -Toxin von *C. septicum* sowohl zelltoxische als auch hämolytische Eigenschaften hat.

BALLARD *et al.* (1992) reinigten das α -Toxin in mehreren chromatografischen Schritten und machten so erstmalig Aussagen möglich, die eindeutig als Eigenschaften des α -Toxins gewertet werden konnten. Es wurde identifiziert als die einzige letale Aktivität, die in den Kulturüberständen des verwendeten Stammes vorlag. Die Einzigartigkeit eines letalen Agens unter den Exoproteinen von *C. septicum* war bereits von BERNHEIMER (1944) postuliert und 1997 von GORDON *et al.* bestätigt worden. Das α -Toxin zeigte in den Untersuchungen von BALLARD *et al.* (1992) auch hämolytische Aktivität und war verantwortlich für mehr als 95 % der insgesamt vorgefundenen Hämolyseaktivität. Die vermittelte Hämolyse war frühestens nach 3-6 h komplett, eine „kalte“ Hämolyse wurde nicht nachgewiesen.

Die Molekülmasse des α -Toxins wird in verschiedenen Veröffentlichungen mit gewissen Abweichungen angegeben.

BERNHEIMER (1970) hatte per Gelfiltration zwei hämolytische Proteine von 15 kDa bzw. von 64 kDa gefunden.

IMAGAWA *et al.* (1994), die das Gen des α -Toxins kloniert hatten, schlossen von den genetischen Daten auf eine Molekülmasse von 48 kDa. BALLARD *et al.* (1995) nannten ein Protein von 48 kDa und eine häufig auftretende weitere Form von 44 kDa. GORDON *et al.* (1997) hingegen gaben die Molekülmasse mit 46,5 kDa bzw. 41,3 kDa für die kleinere Form an. Alle drei Arbeitsgruppen arbeiteten mit rekombinantem α -Toxin. Das von IMAGAWA *et al.* (1994) klonierte Gen war aus dem Stamm *C. septicum* NCTC 547 gewonnen worden, die anderen Gruppen arbeiteten mit dem α -Toxin-Gen eines Stammes mit dem Namen BX96. Jede Gruppe arbeitete mit eigenen Expressionsvektoren. Die Determinierung der Molekülmasse erfolgte in SDS-Polyacrylamidgelen an Hand von Markerproteinen.

BALLARD *et al.* (1995) fanden in hochkonzentrierten Proteinlösungen (> 2 mg/ml) Aggregate von > 210 kDa Molekülmasse.

2.3.1.1 Aktivierung

Das Auftreten von zwei verschiedenen Formen des Toxins wurde zur Formulierung einer Aktivierungshypothese herangezogen. Das Differenz-Peptid wurde am Carboxyterminus des Proteins lokalisiert und eine Größe von etwa 3,7 kDa ermittelt (BALLARD *et al.* 1993 und 1995). GORDON *et al.* (1997) ordneten dem Peptid eine Größe von 5,1 kDa zu. BALLARD *et al.* (1995) versetzten Lösungen mit der größeren Variante des Toxins mit Proteaseinhibitoren. Die kleinere Form wurde daraufhin nicht nachgewiesen und, was entscheidend war, es trat keine hämolytische Aktivität auf. Die Autoren schlossen daraus, dass es eine inaktive, schwerere Form des α -Toxins gäbe, die durch Abspaltung eines kleinen Peptids aktiviert werden könne.

2.3.1.2 Zytopathischer Mechanismus

Der Mechanismus, der die Letalität vermittelte, gleicht nicht den für andere Clostridientoxine bekannten Mechanismen. Häufig sind Clostridientoxine thiolaktivierte Enzyme (TWETEN 1995), nicht aber das α -Toxin von *C. septicum*.

Für das Enterotoxin von *C. perfringens* ist bekannt, dass es in höherem Maße aktiv gegen wachsende als gegen ruhende Zellen ist. Das θ -Toxin von *C. perfringens* interagiert mit den Cholesterolanteilen in der Zielzellmembran (McCLANE und McDONNEL 1980) und aggregiert dort in linearer Anordnung (HARRIS *et al.* 1991).

Das α -Toxin von *C. septicum* hingegen bewirkte einen K^+ -Ausstrom und, in nicht osmotisch stabilisierten Erythrozyten, eine Lysis (BALLARD *et al.* 1993). Es zeigt mechanistische Ähnlichkeiten mit den Toxinen von *Staphylococcus aureus* und dem Aerolysin des gramnegativen Bakteriums *Aeromonas hydrophila* (BALLARD *et al.* 1993 und 1995). Es handelt sich dabei jeweils um Proteine, die oligomere Komplexe bilden, welche in die Membran von Zielzellen inserieren und dort zur Ausbildung von Poren führen.

Insbesondere die Ähnlichkeit zum Aerolysin ist bestechend (BALLARD *et al.* 1993, BALLARD *et al.* 1995, GORDON *et al.* 1997). *Aeromonas spp.* sind gramnegative, fakultativ anaerobe Erreger von Darm- und Wundinfektionen (ROSSJOHN *et al.*

1998). Das von den Bakterien produzierte Aerolysin hat eine Masse von ca. 51 kDa. Es ist hämolytisch, mäuseletal und verliert bei Temperaturen über 0 °C an Aktivität (BERNHEIMER und AVIGAD 1974, BUCKLEY *et al.* 1981), Eigenschaften, die es mit dem α -Toxin von *C. septicum* teilt.

Die C-terminalen und N-terminalen Proteinsequenzen der beiden Toxine weisen keine ausgeprägte Ähnlichkeit auf (BALLARD *et al.* 1993), aber charakteristische Muster in der Proteinsequenz, unter anderem an den carboxyterminalen Schnittstellen, zeigen Homologie (BALLARD *et al.* 1995).

Beide Proteine werden in Form eines inaktiven Protoxins sezerniert, welches zur Aktivierung der proteolytischen Abspaltung eines kleinen C-terminalen Peptids bedarf (HOWARD und BUCKLEY 1985).

Beide Toxine finden nach Aktivierung zu einem oligomeren Komplex zusammen, der in der Membran von Zielzellen Poren bildet. An dem Komplex sind die abgespaltenen Peptide nicht mehr beteiligt (GOOT *et al.* 1994, SELLMAN *et al.* 1997).

Durch die von *C. septicum* α -Toxin gebildeten Poren in der Membran mit einem Durchmesser von 1,3-1,6 nm (BALLARD *et al.* 1993) können Ionen hindurchtreten. Die Zielzellen können den physiologischen osmotischen Druck nicht länger aufrechterhalten und gehen zu Grunde.

Experimentell wurde eine leichte Präferenz der Poren für Anionen nachgewiesen. Bei experimentell erzeugten Transmembranspannungen von größer als +150 mV bzw. kleiner als -150 mV (BALLARD *et al.* 1993) schlossen sich die Poren.

Die Durchlässigkeit der Poren war temperaturunabhängig (SELLMAN *et al.* 1997).

2.3.1.3 Lokalisierung des Gens

Virulenzfaktoren von pathogenen Mikroorganismen können auf extrachromosomalen Genabschnitten codiert sein. So ist beispielsweise das Gen des von *C. tetani* produzierten Neurotoxins plasmidassoziiert (LAIRD *et al.* 1980), dasselbe gilt für verschiedene Toxine von *Escherichia coli* und von *Staphylococcus aureus* (ELWELL und SHIPLEY 1980). CHAUDHURI *et al.* (1995) wiesen die Existenz von 5 Plasmiden in dem von ihnen untersuchten *C. septicum*-Stamm nach, ohne jedoch ihre Aufgabe näher spezifizieren zu können. Ein Hinweis für die Lokalisation eines Toxingens auf einem Plasmid ist die Existenz von virulenten und avirulenten Varianten einer Spezies. BERNHEIMER (1970) beobachtete nach Inkubation von *C. septicum* in chemisch definierten Medien, dass die Kulturen ihre Toxizität verloren. Letztlich muss der konkrete Nachweis einer interzellulären Übertragbarkeit des Virulenzfaktors erbracht werden (ELWELL und SHIPLEY 1980).

Erst nachdem das α -Toxin-Gen von IMAGAWA *et al.* (1994) und BALLARD *et al.* (1995) kloniert worden war, konnte mit Sicherheit festgestellt werden, dass das Gen des α -Toxins von *C. septicum* auf dem Bakterienchromosom lokalisiert ist.

2.3.1.4 α -Toxin und Aerolysin

Das von BALLARD *et al.* (1995) klonierte Gen des α -Toxins eines Stammes von *C. septicum* und das in *C. septicum* exprimierte Protein gleichen sich hinsichtlich ihrer Aktivität und ihres Aktivierungsmechanismus. Die Klonierung ermöglicht vertiefte Einblicke in die Struktur des Gens und des Proteins.

So konnte gezeigt werden, dass das α -Toxin keine ausgeprägten hydrophoben Regionen aufweist, was seine Natur als Exoprotein bestätigt (BALLARD *et al.* 1995).

Die strukturelle Ähnlichkeit zum Aerolysin konnte auf genetischer Ebene belegt werden. Die Gensequenz beider Proteine weist 27 % Identität und 72 % Ähnlichkeit auf. Ein solches Ausmaß an Ähnlichkeit zwischen Toxinen von grampositiven und gramnegativen Mikroorganismen ist bis dato nicht beobachtet worden (BALLARD *et al.* 1995). In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, dass IMAGAWA *et al.* (1994) überraschenderweise keinerlei Ähnlichkeiten zwischen dem α -Toxingen und anderen bereits sequenzierten Genen fanden, obwohl die Sequenzdatendaten für Aerolysin zu dem Zeitpunkt bereits veröffentlicht worden waren (TUCKER *et al.* 1990).

Die Schnittstellen des α -Toxins und des Aerolysins für die aktivierende Protease sind ebenfalls ähnlich. Es handelt sich um eine Aminosäuresequenz, die charakteristisch für Schnittstellen der eukaryotischen Protease Furin ist.

Furin ist ein ubiquitäres Enzym aus der Gruppe der Serinproteasen (GORDON *et al.* 1997), die eine Rolle bei der Prozessierung von Proproteinen spielen. Eukaryotische Zellen enthalten Furin vorwiegend im Golgi-Apparat, es tritt jedoch auch in der Plasmamembran verankert auf. BALLARD *et al.* (1995) hatten gezeigt, dass die Aktivierung des α -Toxins durch Trypsin erfolgen könne, und auch GORDON *et al.* (1997) konstatierten, dass Furin nicht das einzige Enzym sei, welches das α -Toxin durch carboxyterminale Spaltung aktivieren kann.

Die Ähnlichkeit von α -Toxin und Aerolysin veranlaßte GORDON *et al.* (1997), aus den von PARKER *et al.* (1994) ermittelten röntgenkristallografischen Daten für das Aerolysin, Rückschlüsse auf die Struktur der Aktivierungsschnittstelle des α -Toxins zu ziehen. Die Schnittstelle des Aerolysins liegt auf einer flexiblen, nach außen präsentierten Schlaufe in der Aminosäuresequenz, die für andere Moleküle leicht zugänglich ist. Eine solche Schlaufe wäre auch für das α -Toxin denkbar.

HOWARD und BUCKLEY (1982) konnten in ihren Experimenten die Bindung von Aerolysin an Zielzellen durch eine Behandlung der Zellen mit Trypsin reduzieren. Trypsin entfernte eine spezifische Gruppe von Glykoproteinen von der Zellmembran. Die Autoren vermuteten in dem Glykoprotein den Rezeptor des Aerolysins. Glykoproteine haben auf Grund der Diversität ihrer Zuckerreste eine hohe Spezifität. Falls es sich auch bei dem Rezeptor des α -Toxins auf der Zielzellmembran um ein Glykoprotein handelt, kann die unterschiedliche Aktivität auf Erythrozyten bzw. Zellkulturen verschiedener Herkunft (SMITH und HOLDEMAN 1968) erklärt werden.

PARKER *et al.* (1994) fanden, dass Aerolysin in Lösung in der Regel als Dimer vorliegt. Für α -Toxin ist von einem solchen Zustand bislang nicht berichtet worden. Das würde jedoch auch nicht erwartet werden, denn die Strukturen der beiden Proteine weichen insbesondere im aminoterminalen Bereich voneinander ab. Der Bereich bildet beim Aerolysin eine eigene Domäne, die den dimeren Zustand stabilisiert. Eine solche Domäne fehlt dem α -Toxin. Die Hauptstruktur beider Toxine, die sich durch die Gegenwart zahlreicher gestaltgebender β -Faltblatt-Anteile auszeichnet, ist ein längliches, gestrecktes Molekül.

Beide Toxine sind, abgesehen von der carboxyterminalen Schnittstelle, gegen Angriffe durch Proteasen weitgehend unempfindlich. Der hohe Anteil von β -Faltblättern könnte maßgeblich dafür verantwortlich sein (ROSSJOHN *et al.* 1998).

2.3.1.5 Molekularer Mechanismus der Zellzerstörung

Nach den Untersuchungen verschiedener Arbeitsgruppen kann ein Mechanismus der Aktivität des α -Toxins von *C. septicum* postuliert werden, der eine enzymatische

Aktivierung des Pro- α -Toxins an der Zielzelle, vermutlich durch eukaryotische Furine oder andere Proteasen, beinhaltet. Das Protoxin kann in der inaktiven Form an Rezeptoren der Zielzelle binden und wird dort aktiviert (SELLMAN *et al.* 1997). Somit wären die Bakterienzellen selbst gegen eine Wirkung des zelleigenen Toxins während der Expression und des Transportes aus der Zelle geschützt (EDER und FERSHT 1995). In sehr hohen Konzentrationen, die bei der Expression rekombinanter α -Toxingene mit starken Promotoren erreicht werden können, ist das α -Toxin nachweislich toxisch für den produzierenden Mikroorganismus (SELLMAN *et al.* 1997).

Die Aktivierung erfolgt durch Abspaltung eines Peptides vorwiegend, aber nicht ausschließlich, an einer spezifischen, carboxyterminalen Schnittstelle (GORDON *et al.* 1997). Bemerkenswert ist, dass nicht etwa eine Spaltung des Protoxins in zwei eigenständige funktionale Untereinheiten erfolgt. Das sogenannte „A-B“-Prinzip wird häufig für Protein-Toxine, die funktionale Störungen von Membranen bewirken, beschrieben (FREER 1986).

Das abgespaltene Peptid verbleibt zunächst am Toxinmolekül, bis es zur Oligomerisierung und Bildung des Prä-Porenkomplexes kommt (GOOT *et al.* 1994, SELLMAN und TWETEN 1997). In der weiteren zytotoxischen Aktivität des Toxins spielt das Peptid keine Rolle mehr. Seine Funktion kommt derjenigen nahe, die von STRYER (1990) und HENDRICK und HARTL (1993) für Signalsequenzen von Proteinen beschrieben wurde. Solche Signalsequenzen sind von entscheidender Bedeutung bei der Faltung und Zielsteuerung von Proteinen. Typischerweise sind die Signalsequenzen aminoterminal oder intramolekular lokalisiert, seltener carboxyterminal (EDER und FERSHT 1995). Sie sind zudem nur etwa 20 Aminosäurereste lang, was einer Molekülmasse von ca. 2,2 kDa entspräche, also deutlich kleiner, als das Peptid am α -Toxin mit 3,7-5,1 kDa.

Nach der Aktivierung bildet sich ein Oligokomplex, ein Hexa- oder Heptamer aus Toxinmolekülen (TWETEN 1995), der Prä-Porenkomplex. Für Aerolysin ist ein Heptamer nachgewiesen (PARKER *et al.* 1996). Der Komplex ist in der Lage, in die Plasmamembran der Zielzelle zu inserieren und durch seine porenartige Struktur einen Austritt von osmotisch wirksamen Ionen aus der Zelle zu bewirken.

Die Insertion ist ein temperaturabhängiger Schritt, der bei physiologischen Temperaturen schneller abläuft, je höher die Temperatur ist (SELLMAN *et al.* 1997).

Die Insertion kann vermutlich nur dann erfolgen, wenn sich der Oligokomplex erst an der Membran der Zielzelle bildet. Komplexe, die nach einer Aktivierung in Lösung gebildet werden, haben keine toxische Aktivität (GORDON *et al.* 1997, SELLMAN und TWETEN 1997). In diesem Zusammenhang ist es bedeutsam, dass die wichtigsten aktivierenden Enzyme auf der Membranoberfläche der Zielzellen lokalisiert sind.

Zu erklären bleibt, wie ein Komplex aus anerkanntermaßen hydrophilen Proteinen in der Lage ist, in das hydrophobe Milieu von Membranen einzudringen. Wie bereits erwähnt, hatten PARKER *et al.* (1994) die röntgenkristallografische Struktur des Aerolysins und verschiedener Aggregate des Proteins aufgeklärt. Die Fähigkeit der Komplexe in Membranen zu inserieren ließe sich durch die Annahme erklären, dass das abzuspaltende carboxyterminale Peptid einen hydrophoben Bereich maskiert. Nach Oligomerisierung würden durch das Abdissoziieren des Peptids hydrophobe Regionen aller beteiligter Moleküle exponiert. Die Moleküle sind im Oligomer längs faßartig parallel in einheitlicher Ausrichtung aneinandergelagert. Durch die räumliche Nähe der lipophilen Regionen entstünde ein hydrophober Bereich, der in der Lage wäre, in die Membran zu inserieren.

2.4 Pathogenität von *C. septicum*

C. septicum gilt als Erreger des malignen Ödems (SMITH and WILLIAMS 1984) und des Geburtsrauschbrandes bei Rindern, des Labmagenrauschbrandes (nordischer Bradsot) und Braxy bei Schafen, des Pararausbrandes (GRÄSSER 1964) und des Gasgangrāns bei Menschen und Tieren (SCHAUER *et al.* 1985).

Andere Bakterienspezies werden teils als Auslöser der gleichen Krankheitsbilder erwähnt. So nannte KUHNERT *et al.* (1997) *Clostridium novyi* als Erreger des malignen Ödems. Andere Autoren führten neben *C. septicum* auch *C. perfringens* (EVANS 1945, BULLEN 1967, ROOD 1983), *C. sordellii* (ROGGENTIN *et al.* 1988) und *C. novyi* (JOHNSON 1997) als Auslöser von Gasgangrān an.

Es ist daher besser, *C. septicum* als einen Erreger des Gasödemkomplexes zu bezeichnen (SEIFERT 1992), da insbesondere bei Feldinfektionen eine schlüssige Zuordnung von Symptomen zu Erregern nicht möglich ist.

Die Erkrankung wurde in verschiedenen Tieren (CATO *et al.* 1986) gefunden, am empfänglichsten sind Wiederkāuer. Meerschweinchen, Hamster und Mäuse können infiziert werden und eignen sich als Versuchstiere (SEIFERT 1992). Die Isolation von *C. septicum* wurde darüberhinaus in Hühnern (SHIRASAKA und BENNO 1982), in einem neugeborenen Fohlen (JONES und WILSON 1993) und im Gehirn eines Kalbes (SEIMIYA *et al.* 1992) beschrieben.

2.4.1 Diagnose und Identifizierung

Die diagnostische Determinierung von *C. septicum* als Erreger einer Infektion muss stets in Bezug auf die vorgefundenen Symptome vorgenommen werden. Die Gegenwart einer Clostridienspezies in Proben infizierter Tiere oder Menschen ist kein sicherer Hinweis auf die Urheberschaft des klinischen Erscheinungsbildes (SMITH und DOWELL 1980). *C. septicum* wird in der Regel bei schwerwiegenden, meist tödlichen Infektionen isoliert.

Die Diagnose in Tierkadavern wird dadurch erschwert, dass sich schon bald nach Eintreten des Todes auch an der Pathogenese nicht beteiligte Mikroorganismen stark vermehren können (SEIFERT 1992, SONGER 1996). *C. septicum* selbst breitet sich im Kadaver sehr schnell aus und kann andere, metabolisch anspruchsvollere Mikroorganismen überwachsen (BATTY und WALKER 1963, KENNEDY 1976).

Zur Identifizierung von *C. septicum* und *C. chauvoei* in Reinkulturen wurden gaschromatografische Analysen der Stoffwechselprodukte durchgeführt (BROOKS *et al.* 1976, SEIFERT 1981, GIERCKE-SYGUSCH 1987). Auf Grund charakteristischer Muster der Produktion von Alkoholen und Säuren gelang eine reproduzierbare Einteilung der untersuchten Stämme in Gruppen, jedoch keine zuverlässige Unterscheidung aller Stämme von *C. septicum* und *C. chauvoei*.

Auch HEITEFUSS (1991) interpretierte seine Ergebnisse der gaschromatografischen Analyse der langkettigen zellwandständigen Fettsäuren von *C. septicum* dahingehend, dass eine eindeutige Differenzierung der Spezies von *Clostridium chauvoei* nicht möglich sei. Letztere Spezies ist *C. septicum* bezüglich morphologischer, metabolischer und teils auch serologischer Aspekte sehr ähnlich (MACLENNAN 1962, HATHEWAY 1990).

2.4.2 Differenzierung von *C. septicum* und *C. chauvoei*

Es existiert die These, dass es möglich sei, *C. septicum* und *C. chauvoei* als zwei Unterspezies A und B einer systematischen Art zu bezeichnen (MOUSSA 1959, PRINCEWILL und OAKLEY 1976, SEIFERT 1992).

Das Substratspektrum gleicht sich weitgehend. *C. chauvoei* kann Saccharose verwerten, *C. septicum* nicht (HOLDEMAN *et al.* 1977, CATO *et al.* 1986). AL-KHATIB (1969) wies allerdings darauf hin, dass eine Differenzierung nach der Verwertung von Saccharose zu falschen Ergebnissen führen könne.

Manche Autoren (CATO *et al.* 1986, SEIFERT 1995) beschreiben für *C. septicum* die Fähigkeit, bis 44 °C Inkubationstemperatur gut zu wachsen, wohingegen *C. chauvoei* bei 44 °C kein Wachstum aufweist. Die Untersuchungen von CORTIÑAS *et al.* (1994) belegten jedoch ausgezeichnetes Wachstum von *C. chauvoei* bei 44 °C. KOCH *et al.* (1978) versuchten eine Unterscheidung verschiedener Clostridienkulturen an Hand der Wuchsform der Kolonien auf Membranfiltern, die jedoch mißlang. Auf Grund dessen sind konventionelle bakteriologische Methoden zur Diagnose und Differenzierung von *C. septicum* und *C. chauvoei* in der Regel unzuverlässig.

Das Wachstum von *C. septicum* wird durch Bacteriocine, die von verschiedenen Enterokokkenspezies produziert werden, gehemmt. Es wurde vorgeschlagen, die Sensitivität gegen spezifische Bacteriocine zur Diagnose von *C. septicum* heranzuziehen (KRÄMER und SCHALLEHN 1974).

Die von den beiden Spezies *C. septicum* und *C. chauvoei* produzierten β - und γ -Exotoxine (Desoxyribonuklease und Hyaluronidase) sind serologisch verwandt (SEIFERT 1995), wenn auch nicht identisch (PRINCEWILL and OAKLEY 1976).

Die Angaben zur α -Toxinproduktion durch *C. chauvoei* und zur serologischen Spezifität sind widersprüchlich (HATHEWAY 1990). α -Toxin wird von *C. chauvoei* in geringeren Titern produziert als von *C. septicum* (HATHEWAY 1990). Das α -Toxin beider Spezies konnte mit *C. septicum*-Antiseren neutralisiert werden (SEIFERT 1995, AL-KHATIB 1968 und 1969).

Dem steht entgegen, dass für das letale, nekrotische, *C. septicum*-spezifische α -Toxin (MOUSSA 1958) in Immunoblots keine Kreuzreaktion zwischen affinitätsgereinigten Antikörpern gegen das α -Toxin von *C. septicum* und Kulturüberstand von *C. chauvoei* (BALLARD *et al.* 1992) nachgewiesen werden konnte. Auch in Toxinneutralisationstests auf Basis von Zellkulturen wurden keine Kreuzreaktionen zwischen *C. septicum*-Antigenen und Seren gegen *C. chauvoei* nachgewiesen (ROTH *et al.* 1999).

Die serologischen Eigenschaften eines anderen Enzyms, der Sialidase, sind nach SCHAUER *et al.* (1985) und ROGGENTIN *et al.* (1988) stammspezifisch und können in immunologischen Tests (ELISA und Inhibitionstest) als Indikator für eine *C. septicum*-Infektion genutzt werden. Solche Tests können sehr schnell durchgeführt werden, da der Sialidasespiegel in clostridieninfizierten Geweben bereits kurz nach Ausbruch der Erkrankung ausreichend hoch ist. Eine schnelle Diagnose räumt angesichts des perakuten Verlaufes der Infektionen wertvolle Zeit für die Therapie ein. Die Autoren schlossen allerdings *C. chauvoei* nicht in ihre Untersuchungen ein, obwohl die Spezies auch Sialidase in niedrigen Titern (FRASER 1978) produziert (MÜLLER 1976). ZENZ *et al.* (1993) untersuchten die Sialidasen von *C. septicum*

und *C. chauvoei* und fanden Unterschiede in der Struktur und in der Sensitivität gegen Kupfer- und Quecksilberionen. Sie führten jedoch keine immunologischen Experimente durch.

Die Plasmide eines *C. septicum*-Stammes wiesen einen hohen Grad an Homologie zu den Plasmiden eines von CHAUDHURI *et al.* (1995) untersuchten *C. chauvoei*-Stammes auf.

MOUSSA (1958, 1959) betonte, dass *C. septicum* und *C. chauvoei* ein gemeinsames hitzelabiles Sporenantigen teilen und strich die serologische Verwandtschaft der Toxine beider Spezies heraus.

C. chauvoei wird als der Erreger von Blackquarter bzw. Blackleg in Schafen und Rindern beschrieben (PRINCEWILL und OAKLEY 1976, CORTIÑAS *et al.* 1994). Die Erkrankungen sind mit einer hohen Mortalität verbunden (KUHNERT *et al.* 1997). In der Praxis ist eine diagnostische Differenzierung nicht aufrechtzuerhalten. *C. chauvoei* und *C. septicum* gehören zur Gruppe der Erreger des Gasödemkomplexes (SEIFERT 1992).

Trotz der Ähnlichkeit zwischen *C. septicum* und *C. chauvoei* existieren serologische Eigenheiten.

WILLIS und WILLIAMS (1972) beschrieben eine sehr einfache Methode, Mischkulturen von *C. septicum* und *C. chauvoei* zu trennen. Sie inkubierten die Mischkulturen auf Blutagar, der *C. septicum*-Antiserum enthielt. Es handelte sich um Antiserum gegen die O-Antigene. Das Antiserum schränkte die Mobilität von *C. septicum* stark ein, so dass ein Schwärmen auf der Agarplatte verhindert wurde. Das bakterielle Wachstum jedoch wurde nicht inhibiert. Einzelne Kolonien konnten leicht selektiert werden. Die Autoren vermuteten, dass der Effekt auf einer Agglutinierung der Bakterienzellen beruhte, denn auf Grund der Präparationsweise der Seren war es unwahrscheinlich, dass Antikörper gegen Flagellen (H-Antigene) vorlagen.

Die spezifische Bindung von Antikörpern konnte darüberhinaus mittels der von STERNBERGER *et al.* (1970) erstmals dargestellten Peroxidase-Antiperoxidase (PAP)-Technik zur Differenzierung genutzt werden. GUSTAFSSON *et al.* (1988) und UZAL *et al.* (1992) gelangen eindeutige Zuordnungen in Gewebepräparaten infizierter Tiere. Die Anwendbarkeit des Verfahrens zur Differenzialdiagnose von *C. septicum* und *C. chauvoei* wurde von VANNELLI und UZAL (1996) bestätigt.

BATTY und WALKER (1963), SCHALLEHN (1985), ARDEHALI *et al.* (1988), GUZMAN und MICALIZZI (1992) und PINTO und ABREU (1992) erzielten mit dem Einsatz fluoreszenzmarkierter Antikörper zur Unterscheidung von *C. septicum* und *C. chauvoei* an Hand der somatischen Antigene zufriedenstellende Ergebnisse.

HAMAOKA *et al.* (1994) allerdings verwiesen darauf, dass es zu Kreuzreaktionen kommen kann. Zudem erkennen kommerziell erhältliche markierte Antiseren die Antigene von im Feld isolierten *C. septicum*-Stämmen oft nicht (SEIFERT 1995), bzw. die Signale werden schwächer und damit schwieriger zu interpretieren (WONG GONZÁLEZ 2000).

In der indirekten Immunfluoreszenztechnik werden die Mikroorganismen zunächst mit eigens präparierten spezifischen Antiseren gebunden, dann erst erfolgt die Zugabe markierter Anti-Antikörper. So können zwar auch untypische Stammvarianten bei Vorhandensein der entsprechenden Seren erfaßt werden, die Variante führt jedoch ebenfalls zu einer schwächlichen Ausprägung der Signale (BATTY und WALKER 1963).

ROGGENTIN *et al.* führten 1991 Experimente mit ELISA zum spezifischen Nachweis von Sialidasen verschiedener clostridieller Erreger durch. Es wurde keine gute Übereinstimmung zwischen den bakteriologischen Untersuchungen und den serologischen Tests für *C. septicum* gefunden. GRYAZNOVA *et al.* (1998) hingegen gelang der differenzierende Nachweis von *C. septicum* im ELISA. Die Arbeitsgruppe verwendete Antikörper gegen die Exotoxine der untersuchten Clostridienspezies.

Dank Fortschritten in der Neu- und Weiterentwicklung verschiedener Techniken können Clostridien nach nicht-serologischen Merkmalen charakterisiert werden.

HERDING-SOTZECK (1998) beschrieb Versuche, Clostridien mittels der Fourier-Transform-Infrarotspektroskopie zu differenzieren. Die Technik beruht auf der molekülstrukturspezifischen Absorption von Licht und ist auch für biologische Systeme anwendbar. Für viele Spezies konnten zufriedenstellende Ergebnisse erzielt werden, die Unterscheidung von *C. septicum* und *C. chauvoei* jedoch war unsicher, insbesondere *C. chauvoei*-Stämme wurden fehlidentifiziert.

Neue Kenntnisse auf Basis der Genomanalyse haben zu neuen Erkenntnissen bezüglich des phylogenetischen Verwandtschaftsgrades verschiedener Spezies geführt. Die Interpretation wird kontrovers diskutiert, insbesondere wenn Diskrepanzen zu den nach konventionellen, auch neueren, Methoden ermittelten Verhältnissen auftreten. Die Verhältnisse innerhalb des Genus *Clostridia* sind ausgesprochen inkohärent wie an Hand der Sequenz des 16S rRNA-Gens, die für zahlreiche Bakterien bekannt ist, gezeigt wurde (COLLINS *et al.* 1994). Für verschiedene aerobe Sporenbildner und nicht-sporenbildende Spezies wurde eine nahe Verwandtschaft zu Clostridien nachgewiesen. Zugleich wurden einige Clostridienspezies phylogenetisch weit entfernt vom Hauptcluster des Genus *Clostridia* platziert. Die Arbeitsgruppe zeigte, dass Merkmale wie Pathogenität, oder die Fähigkeit zur Sporenbildung, nicht geeignet sind, die Zugehörigkeit zu einem phylogenetischen Taxon zu klären. In diese Untersuchungen war *C. septicum* nicht einbezogen worden.

KUHNERT und seine Mitarbeiter unternahmen 1996 als erste den Versuch, die Unterscheidung der beiden Spezies *C. septicum* und *C. chauvoei* auf Grund der Struktur des 16S rRNA-Gens vorzunehmen. Die Genabschnitte wurden mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion amplifiziert. Die Technik der Polymerase-Kettenreaktion hat neben der diagnostischen Sicherheit den Vorteil, schnell und vergleichsweise einfach durchführbar zu sein.

Zwischen der 16S rRNA-Sequenz von *C. septicum* und *C. chauvoei* konnte eine ausgeprägte Ähnlichkeit (99,3 %) nachgewiesen werden, dennoch war die Differenzierung möglich. Nach der Analyse der Sequenz des 16S rRNA-Gens handelt es sich bei *C. septicum* und *C. chauvoei* um zwei distinkte Spezies.

In der weiteren Arbeit von KUHNERT *et al.* 1997 wurden die Versuche auf mehrere *C. chauvoei*-Feldstämme in Gewebeproben ausgedehnt und die diagnostische Verwendbarkeit der Methode bestätigt.

1994 klonierten und exprimierten IMAGAWA *et al.* das Gen des α -Toxins in einem Plasmidvektor in *Escherichia coli*. Die Sequenz wurde bestimmt und mit ihrer Hilfe stellten TAKEUCHI *et al.* (1997) Primer für eine Polymerase-Kettenreaktion her.

WONG GONZÁLEZ (2000) zeigte, dass mittels der Polymerasekettenreaktion Referenzstämme und Feldstämme der beiden Spezies *C. septicum* und *C. chauvoei* an Hand des Hämolysin-Gens von *C. septicum* und des 16S rRNA-Gens von *C. chauvoei* sicher differenziert werden konnten.

Auf dem Gebiet der Immunologie haben Fortschritte die komplexen Verhältnisse transparenter gemacht und müssen zu einer neuen Betrachtung serologischer Fragestellungen in früheren Arbeiten führen.

Gentechnologische Methoden lassen die Differenzierung von *C. septicum* und *C. chauvoei* in zwei distinkte Spezies zu.

In den letzten Jahren ist kein weiterer Versuch unternommen worden, *C. septicum* und *C. chauvoei* taxonomisch zu einer Spezies zusammenzufassen.

2.4.3 Krankheitsverlauf

Generell ist der Verlauf von Infektionen mit *C. septicum* fulminant. HATHEWAY (1990) und CORTIÑAS *et al.* (1997) geben den Zeitraum zwischen dem Auftreten der ersten Symptome und dem Eintreten des Todes mit ein bis zwei Tagen für das maligne Ödem in Rindern, bzw. einigen Stunden bei Infektion von Schafen mit Braxy an.

KEIM (1983) nennt eine Inkubationszeit von 1-3 Tagen für die Gasgangräninfektion beim Menschen. Die Mortalität bei Menschen ist mit 50–70 % nach KATLIC *et al.* (1981) bzw. 67–100 % nach STEVENS *et al.* (1990) sehr hoch. Unbehandelt führt eine Infektion mit *C. septicum* bei Mensch und Tier in der Regel zum Tod (BALLARD *et al.* 1992).

Das Krankheitsbild manifestiert sich durch das Auftreten von starken Schmerzen um den Infektionsherd, das Austreten hämorrhagischer Flüssigkeiten mit Gasbildung und eine dunkelrote Verfärbung betroffener Muskulatur (SMITH und HOLDEMAN 1968). Als weitere Symptome wurden von KORANSKY *et al.* (1979) Fieber und Schmerzen im Abdominalbereich und von JOHNSON (1997) Myonekrosen beschrieben. STEVENS *et al.* (1990) konstatierte ein weitgehendes Fehlen von entzündlicher Aktivität.

2.4.4 Bedeutung der Toxine im Infektionsgeschehen

Den von *C. septicum* sezernierten Toxinen kommt eine zentrale Bedeutung im Infektionsgeschehen zu (LARSON und PRICE 1977). Kulturüberstände von *C. septicum* führten in experimentell erzeugten Kaninchendarmschlaufen zu Flüssigkeitsansammlung und histopathologischen Veränderungen (RIDELL *et al.* 1993). Die Toxine erhöhen die Permeabilität von Gefäßen, bewirken Myonekrose und sind an der Ausbreitung der bakteriellen Infektion in den Wirtsorganismen beteiligt (SONGER 1996). BÖHNEL (1986) und später GINSBURG *et al.* (1999) sprachen von einem synergistischen, die Infektion fördernden Effekt des Zusammenspiels der Wirkung verschiedener zellschädigender Toxine.

Am intensivsten diskutiert ist die Rolle des letalen, nekrotischen α -Toxins.

TAKANO und KONDO (1987) führen das α -Toxin als zentrales Agens im Infektionsgeschehen an. BALLARD *et al.* (1995) beschrieben einen ausgeprägten Stress-Effekt auf das Kreislaufsystem und die Atmung von Mäusen, welchen gereinigtes α -Toxin injiziert worden war. Die Symptome glichen denen eines Schocks.

JONES und WILSON (1993) räumten der Desoxyribonuklease (β -Toxin), der Hyaluronidase (γ -Toxin) und einer Gelatinase einen Anteil an der Gewebeschädigung ein. Sialidasen wurden lange Zeit als apathogene Faktoren betrachtet. MÜLLER zeigte jedoch 1970 und 1976 auf, dass Sialidasen verschiedener Herkunft in regulatorische Mechanismen eingreifen, indem sie an die Sialinsäurereste von Glykoproteinen, die

Rezeptoren für andere Enzyme darstellen, binden. Sie ändern so die Oberflächenstruktur von Zielzellen (GADALLA und COLLEE 1968).

Sialidasen erleichtern die Ausbreitung des Erregers im Wirtsgewebe (SMITH UND HOLDEMAN 1968). Erwähnt sei auch die Agglutininierung von Erythrozyten und die damit in Zusammenhang stehende Erhöhung der Blutviskosität, Faktoren, die eine Belastung des Kreislaufes bewirken. Die pathogene Rolle der Sialidasen wurde von ZENZ *et al.* (1993) bestätigt.

2.4.5 Invasivität und Ätiologie

C. septicum hat, obschon im Vergleich zu anderen Clostridien außergewöhnlich invasiv (ROBERTSON und FELIX 1930, KEIM 1983), in gesunden Wirten mit unbeschädigten Schleimhäuten eine geringe Tendenz, das klinische Krankheitsbild zu verursachen. In intakten Geweben wird ein positives Redoxpotenzial aufrechterhalten, das dem Wachstum von Anaerobiern inhibierend entgegensteht. Hinzu kommt eine bakteriostatische Wirkung von normalem Serum, die BULLEN (1967) auf die Wirkung des im Serum enthaltenen Transferrins zurückführt.

Erst durch das Eintreten von begünstigenden Faktoren kann sich das Bakterium vermehren und bei Übertritt in die Blutbahn aggressiv in weitere Gewebe vordringen (HJERPE 1990, ZENZ *et al.* 1993). Solche Bedingungen konnten von BULLEN und CUSHNIE (1962) experimentell durch Injektion infektiöser Keime von *Clostridium perfringens* zusammen mit CaCl₂ oder Adrenalin erzeugt werden.

Die intramuskuläre Injektion von Prostaglandinen begünstigte am Injektionsort den Ausbruch von durch *C. septicum* verursachtem Gasödem in Kühen (SEIFERT 1992). Bei den im Feld häufig auftretenden Mischinfektionen kann das Wachstum eines Keimes das Redoxpotenzial lokal absenken und so wegbereitend für die Vermehrung einer anderen Spezies wirken (FILDES 1929, NORD 1982). Das erniedrigte Redoxpotenzial bewirkt zudem eine Steigerung der Toxinproduktion durch *C. septicum* (SCHALLEHN und BRANDIS 1985), wobei die erhöhte Toxinmenge auch eine direkte Folge der erhöhten Keimzahl sein kann. Bei Menschen gelten insbesondere Kolonkarzinome, postoperative Läsionen der Darmwände (KORANSKY *et al.* 1979) oder Leukämie (KATLIC *et al.* 1981), seltener Diabetes mellitus (REICHMANN *et al.* 1973, SCHALLEHN und BRANDIS 1985), als prädisponierende Faktoren für den Ausbruch von Gasgangrän. Auch sekundäre Immunsuppression in den Wirtorganismen (KATLIC *et al.* 1981) begünstigt die Ausbreitung von Infektionskeimen. McBAIN und MACFARLANE 1998 diskutierten die genotoxische Rolle der Enzyme Azoreduktase und Nitratreduktase, die von *C. septicum* und anderen, den unteren Intestinaltrakt bewohnenden, Mikroorganismen sezerniert werden. Die Ätiologie von Darmkarzinomen ist noch nicht vollständig geklärt, jedoch könnten Produkte der Enzymaktivität an der Pathogenese beteiligt sein.

Bei Tieren sind Mikroläsionen in den Schleimhäuten des Intestinaltraktes nach Aufnahme gefrorenen Futters (SONGER 1996) oder sehr harter, spitzer Futterpflanzen prädisponierende Faktoren. Äußere Einwirkung, wie Schläge, Kastration oder Wunden durch die Schafschur, oder der Geburtsvorgang können den Ausbruch der Krankheit fördern (SEIFERT 1992). Es kommt auch zu Gasödemem durch iatrogene Mikroinjektion von Keimen.

2.4.6 Therapie von Infektionen

Auf Grund des akuten Verlaufes der Infektionen mit *C. septicum* bleibt eine Therapie mit Antibiotika und die Applikation spezifischer Antikörper oder Immunsereen oft erfolglos, obschon sich alle von GABAY *et al.* (1981), BRAZIER *et al.* (1985) und SONGER (1996) getesteten *C. septicum*-Stämme als sensitiv gegen Penicillin, Tetracyclin, Chloramphenicol und andere Antibiotika erwiesen.

Der Einsatz hyperbaren Sauerstoffes ist wegen der ausgeprägten Aerotoleranz von *C. septicum* nur bedingt wirksam. Bei Menschen sind chirurgische Eingriffe in Form einer Öffnung der Ödeme ein letzter Ausweg (SCHAUER *et al.* 1985, HAWKINS und RILEY 1997).

2.5 Prophylaxe

SEIFERT (1992, 1995), BÖHNEL (1986), ARDEHALI *et al.* (1988) und KNIGHT *et al.* (1990) und viele andere stellten die veterinärmedizinische Bedeutung von *C. septicum*-Infektionen in der Nutztierhaltung heraus. Bedingt durch den Ausbreitungsmodus von Bodenseuchen, der eine Aufnahme des Erregers durch das individuelle Tier erfordert und eine Übertragung von Tier zu Tier weitgehend ausschließt, kommt es nicht zu flächendeckenden Verlusten. Lokal begrenzt jedoch können die Verluste hoch sein. Der Erreger persistiert auf Grund seiner Fähigkeit zur Versporung im Boden, so dass die Erkrankung an einem Ort immer wieder auftreten kann.

Tropische Standorte, insbesondere aride oder semiaride Gebiete weisen eine besonders hohe Inzidenz an Bodenseuchen auf. Am Höhepunkt und zum Ende der Trockenzeit sind die Tiere auf stark abgeweideten Flächen gezwungen, die Futterpflanzen bis unmittelbar an den Boden abzugrasen. Auf kontaminierten Flächen ist die Aufnahme von Bodenpartikeln und damit Sporen der Erreger dann unvermeidbar.

Tatsächlich ist das erhöhte Aufkommen an Verlusten zum Ende der Trockenzeit von MUNANG'ANDU *et al.* (1996) für Zambia und von SEIFERT (1992) für viele andere aride Gebiete dokumentiert.

Zu einem gewissen Teil ist Verlusten durch *C. septicum*-Infektionen in der Tierproduktion durch ein nach hygienischen Gesichtspunkten durchdachtes Management der Tierhaltung (SEIFERT 1992) beizukommen.

Gerade in tropischen und subtropischen Gebieten jedoch sind der Durchführung von Maßnahmen, die die Risikofaktoren minimieren sollen, bedingt durch die extensive Form der Viehhaltung, Grenzen gesetzt.

Im veterinärmedizinischen Bereich ist von daher eine Schutzimpfung der erfolgversprechendste Weg, die Krankheit zu bekämpfen (GRÄSSER 1964, SONGER 1998). KENNEDY (1976) schätzte das Ausmaß der Verluste in den meisten Regionen, in welchen Nutztierhaltung betrieben wird, so hoch ein, dass eine Prophylaxe durch Immunisierung wirtschaftlich lohnend und geboten sei.

In Europa spielen Verluste durch *C. septicum*-Infektionen bei Nutztieren, wiewohl Veröffentlichungen immer wieder von auftretenden Fällen zeugen (VETERINARY INVESTIGATION DIAGNOSIS ANALYSIS III 1995, SONGER 1996), tierzuchtlich keine entscheidende Rolle, was auf die in der intensiven Tierhaltung vereinfachte Überwachung der Lebensbedingungen der Tiere zurückzuführen ist. HJERPE

berichtete 1990, dass das Maligne Ödem eine in den USA selten auftretende Krankheit sei. Er belegte auch die hohe Wirksamkeit der vorhandenen Vakzinen. In tropischen Regionen wäre eine Ausweitung der Impfprogramme ein erfolgversprechender Weg, die Verluste einzudämmen, wie BÖHNEL (1986), SEIFERT (1992), IDRISSEI *et al.* (1992) für Marokko und MUNANG'-ANDU *et al.* 1996 für Zambia darstellten.

2.5.1 Zusammensetzung von Vakzinen

Konventionelle Bakterienvakzinen setzen sich aus inaktivierten Erreger-Kulturen und/oder Kulturüberständen und geeigneten Adjuvantien zusammen (KENNEDY 1976, SONGER 1996).

Moderne Techniken, insbesondere DNA-Rekombinationsverfahren, gestatten die selektive Produktion von immunogenen Komponenten, beispielsweise Toxinen oder Pili, in Fremdvektoren (HODGSON und RADFORD 1993).

Attenuation von Bakterien- oder Virenstämmen für Lebendimpfstoffe, die sich durch eine hohe Wirksamkeit auszeichnen, und von Toxinantigenen (LINDBERG und PILLAI 1996) kann durch gezielte Mutation von Genorten, die für die Infektiosität eine Rolle spielen (HODGSON und RADFORD 1993), bewirkt werden.

Clostridienvakzinen sind in Deutschland in der Regel polyvalente, konventionell produzierte Kombinationstoxoidimpfstoffe. Nach POTTER und BABIUK 1993 werden zweifach- (*C. septicum* und *C. chauvoei*), 7fach- (*C. septicum*, *C. chauvoei*, *C. perfringens* Typ C und Typ D, *C. sordellii* und *C. novyi* und *C. tetani*) und 8fach-Vakzinen (wie 7fach plus *C. haemolyticum*) kommerziell angeboten.

Impfstoffe gegen die meisten clostridiellen Erreger, inklusive *C. septicum*, enthalten toxoidierte Kulturüberstände. Gegen *C. chauvoei*-Infektionen werden Bakterine produziert.

Die Produktion der Impfstoffe erfolgt in der Regel mit Kulturen von Impfstoffproduktionsstämmen.

Der Aufwand, die löslichen Komponenten durch rekombinante Toxine zu ersetzen, die eine schwache Immunogenität haben, wäre hoch und ist weder immunologisch noch wirtschaftlich sinnvoll. Bei Clostridieninfektionen spielen zudem lokalspezifische Erreger eine Rolle, deren Antigene durch unspezifische Seren nicht neutralisiert werden.

2.5.2 Adjuvantien

Die Adjuvantien in der Impfstoffformulierung haben die Aufgabe, die immunogene Wirksamkeit der Antigene zu erhöhen, ohne selbst eine schädliche Wirkung, lokal oder systemisch, hervorzurufen. Gute Adjuvantien können auf Grund einer Depotwirkung eine verzögerte Abgabe des immunogenen Agens bewirken und einen langanhaltenden Immunschutz bewirken.

Als besonders geeignete Adjuvantien haben sich Ölformulierungen erwiesen (BARNETT *et al.* 1996, LAWRENCE *et al.* 1997, ELLIOT *et al.* 1999, HERRERA *et al.* 1999). Sie wurden in Rindern, Schweinen, Kaninchen, Meerschweinchen und Mäusen getestet. Ihre Überlegenheit gegenüber Formulierungen mit Aluminiumhydroxid war apparent. RAYA *et al.* (1999) spezifizierten die Überlegenheit für die initialisierende Impfung. Boosterimpfungen in Kaninchen mit Aluminiumhydroxidgel und

Öladjuvans erbrachten gleichwertige Titer bei geringerer Belastung durch das Aluminiumhydroxidgel.

Der Einsatz von Freund's Adjuvans, der zwar einen guten Antikörpertiter bewirkte, ist heute verboten, da es zu unerwünschten heftigen pathologischen Reaktionen in den Impfungen kam (LEENAARS *et al.* 1998).

2.5.3 Lokalspezifische Vakzinen

SHIRASAKA *et al.* fanden 1983 in Agglutinationstests mit verschiedenen *C. septicum*-Stämmen, teils isoliert aus Proben infizierter Kühe und Hühner, die aus verschiedenen Regionen Japans stammten, teils Referenzstämmen, unterschiedliche serologische Typen. Die Gruppierung deckte sich nicht mit der von MOUSSA (1959) vorgeschlagenen. Jedoch zeichneten sich serologische Ähnlichkeiten in den Stämmen der gleichen geografischen Herkunft ab.

Die Lokalspezifität von Bakterienstämmen beruht auf einer Änderung der Zelloberflächenantigene. So können Immunreaktionen der Wirtsorganismen umgangen und eine ideale Anpassung an die Verhältnisse am Infektionsort erreicht werden (FUSSENEGGER 1997).

CEBULA und LECLERC zeigten 1997, dass Bakterienstämme der Spezies *Escherichia coli* in der Natur hinsichtlich einer hohen Mutationsrate positiv selektiert werden. Die Autoren betonten allerdings, dass ein Austausch von Genmaterial von Zelle zu Zelle per Konjugation oder Transduktion die Ausbildung neuer Eigenschaften deutlich schneller als spontane Mutationen alleine bewirken würde. Bekannt ist, dass Gene innerhalb einer Bakterienzelle von einem genetischen Element auf ein anderes übertragen werden können (MAAS 1977).

Nach FINLAY und FALKOW (1997) führt interzellulärer Genaustausch dazu, dass sich immer neue Varianten von Pathogenen herausbilden. Pathogene Organismen sind, mehr als andere Bakterienstämme, einem ständigen Selektionsdruck durch die Aktivität der Immunsysteme ihrer Wirte ausgesetzt.

Es wurden keine Hinweise gefunden, dass *C. septicum* nicht in der Lage wäre, genetisches Material interzellulär zu transferieren.

Der Phänotyp eines Bakteriums kann zudem durch eine Vielzahl von Mechanismen variiert werden, die keinen genetischen Umbau erfordern. GOLOVLEV (1998) bezeichnete die Summe der Erscheinungen als phänotypische Metastabilität. Sie wird erreicht durch alternative Regulierung der Expression einzelner Gene, oder kleiner Gruppen von Genen, durch Abweichungen in der Proteinsynthese auf Transkriptionsebene und durch konservative Frame-Shift-Mutationen. Die Fähigkeit zu diesen Veränderungen, die eine Anpassung an die Umgebungsbedingungen darstellen, ist eine genetisch festgelegte Eigenschaft. Durch Selektion werden Mikroorganismen favorisiert, die ausgeprägte phänotypische Metastabilität aufweisen.

Insbesondere in tropischen Regionen erweisen sich Impfungen mit kommerziellen Impfstoffformulierungen immer wieder als ineffektiv (SEIFERT 1992). Einerseits besteht die Möglichkeit, dass polyvalente Vakzinen auf Grund der Vielzahl gebotener Antigene keinen ausreichenden Immunschutz gegen einzelne oder mehrere Komponenten bilden. Andererseits muss die Heterogenität der Antigene in Betracht gezogen werden (BÖHNEL 1986, SCHAPER 1991). Lokale Varianten einer Spezies weisen spezifische Antigene auf. Es ist von daher geboten, Impfstoffe aus lokalspezifischen

Kulturen zu produzieren. Solche Vakzinen wurden hergestellt und mit Erfolg eingesetzt (BÖHNEL 1986, SEIFERT 1992, CYGAN 1990).

2.5.4 Herstellung von Toxoidvakzinen aus Kulturen des Erregerstammes

Die Produktion von *C. septicum*-Antigenen kann in Fermenterkulturen erfolgen. Das Göttinger Bioreaktor-System (BÖHNEL 1986) ist ein Fermentationssystem, welches zur Kultivierung verschiedener Organismen geeignet ist. Es wurde zur Produktion von Viren (NISSLEIN 1993, ELIZONDO HERRERA 1993, ULLRICH 1994) in Zellkulturen verwendet, zur Inkubation von Aerobier- und Anaerobierkulturen (DEUBLER 1982, ROTH 1986, BABIKER 1991, SCHAPER 1991, SONNENBERG 1992, ELBASHIR 1993, GESSLER 1994) und zur Kultivierung von Mykoplasmen (HÄUSSER 1989).

Die produzierten löslichen Antigene können per Kaskadenfiltration von den Bakterienzellen abgetrennt und aufkonzentriert werden (ROTH 1986, SCHAPER 1991, ELIZONDO HERRERA 1993).

Das Göttinger Bioreaktor-System hat sich auch an tropischen Standorten als zur Produktion von Antigenen geeignet und der herkömmlichen Anzucht von Kulturen in Flaschen als überlegen erwiesen (BÖHNEL 1986, ROTH 1986, BABIKER 1991, ELBASHIR 1993).

Somit können lokalspezifische Erreger schnell und vergleichsweise einfach kultiviert und aus den Antigenen Impfstoffe hergestellt werden.

2.5.5 Impfstoffqualität in tropischen Regionen

Wie bereits erwähnt, sind Verluste durch *C. septicum*-Infektionen besonders an tropischen Standorten bedeutsam. Umwelteinflüsse spielen für die Produktion, die Qualitätskontrolle (MILSTIEN und DELLEPIANE 1999) und die Haltbarkeit von Vakzinen (SCHOUB und CAMERON 1996) eine bedeutsame Rolle. Die speziellen klimatischen und infrastrukturellen Bedingungen erfordern besondere Maßnahmen zur Sicherung des Impferfolges. Die Stabilität von Impfstoffen von der Produktion bis zur Applikation im Zieltier muss gewährleistet werden (FAWTHROP 1996, FENYVES 1996).

Die Einhaltung einer Kühlkette ist eine Möglichkeit, die jedoch an technische Grenzen stoßen kann und deren Überwachung schwierig ist (SCHOUB und CAMERON 1996). So erweist es sich als günstiger, thermostabile Vakzinen zu produzieren (TULASNE *et al.* 1996, ZAFFRAN 1996).

Techniken zur Produktion und Wirksamkeitskontrolle von Clostridienimpfstoffen, die auch zur Durchführung an tropischen Standorten geeignet sind, wurden von DEUBLER (1982), BÖHNEL (1986), ROTH (1986), BABIKER 1991, SCHAPER (1991) und EBERT (1998) vorgestellt.

Die Inaktivierung von *C. septicum* α -Toxin oder Vollkulturen durch Versetzen mit Formaldehyd bewirkt nicht nur eine Inaktivierung der Toxizität, sondern zugleich eine Stabilisierung des Toxinmoleküls (CORBEL 1996) unter Wahrung der Antigenität (PETRE *et al.* 1996). *C. septicum*- α -Toxoid-Vakzinen sind für einen Einsatz auch in tropischen Regionen in besonderer Weise geeignet, da die Formalinisierung die Temperatursensitivität der Vakzine herabsetzt.

2.5.6 Protektivitaet des α -Toxins

ROBERTSON und FELIX (1930) zeigten, dass in Experimenten mit passiver Immunisierung mit Meerschweinchenserum vorwiegend Antikörper gegen O-Antigene (somatische Antigene) von *C. septicum* schützend wirken und ein hoher Titer an Antikörpern gegen H-Antigene (Flagellen-Antigene) keinen nennenswerten Schutz gegen Ausbruch der Krankheit bei Infektion mit Kultur bot.

1935 führte HENDERSON Experimente mit Kaninchen durch. Er immunisierte sie aktiv vor einem Challenge-Versuch mit *C. septicum*-Sporen. Seine Resultate deuteten darauf hin, dass ausschließlich gegen O-Antigene gerichtete Antikörper für den Immunschutz von Bedeutung seien. Seren gegen formalinisierte, nicht erhitzte Kultur von *C. septicum* konnten einen noch besseren Schutz bieten. Die Differenz stand nicht mit der antitoxischen Aktivität im Serum in Zusammenhang. Toxoidvakzinen waren nicht in der Lage, den Ausbruch der Erkrankung in Kaninchen nach Verabreichung einer Sporenchallengedosis zu verhindern. Im Vergleich zu nicht geimpften Kontrolltieren konnte lediglich eine Verzögerung der Zeit bis zum Eintritt des Todes um 12-18 Stunden nachgewiesen werden. In weiterführenden Untersuchungen zeigte HENDERSON (1937), dass es ein Flagellenantigen mit schutzinduzierender Kapazität gebe.

In jüngerer Zeit schätzten nur noch CLAUS und KOLBE, die 1979 Experimente mit Meerschweinchen durchgeführt hatten, die schützende Wirkung des Antitoxins als gering ein.

Nach GRÄSSER (1964) ist die Verwendung von Toxoidvakzinen dem Einsatz von Vollkulturimpfstoffen vorzuziehen. PRANTER *et al.* (1971) konstatierten eine durch das Toxoid induzierbare, belastbare Immunität, die einen meßbaren Ausdruck im Titer der humoralen Antikörper fand. CARDELLA und KOLBE führten 1976 Versuche mit Bakterinen und Toxoidimpfstoffen in Kaninchen durch und führten die bessere Qualität einiger getesteter Impfstoffe auf die Gegenwart von löslichen Antigenen zurück. KENNEDY 1976 belegte die hohe protektive Wirksamkeit von *C. septicum*-Toxoidvakzinen in Kaninchen. BALLARD *et al.* zeigten schließlich 1992, dass Mäuse, die mit gereinigtem α -Toxin immunisiert worden waren, eine deutlich höhere Überlebensrate aufwiesen, als nicht immunisierte Tiere, wenn sie mit gewaschenen Bakterienzellen infiziert wurden.

JOHNSON *et al.* (1994) fanden in den Seren von menschlichen Patienten, die *C. septicum*-Infektionen überlebt hatten, Antikörper der IgG-Klasse gegen das α -Toxin. Gegen andere lösliche Antigene wurden Antikörper nur in sehr geringem Umfang nachgewiesen.

GRÄSSER (1964), PRANTER *et al.* (1971), KENNEDY (1976), HNÁTKOVÁ *et al.* (1986) und CORTIÑAS *et al.* (1997) bestätigten die Einschätzung von HENDERSON 1935, dass das Toxoid ein wirksames, aber schwaches Antigen sei und entsprechend hohe Titer im Impfstoff vorliegen müssten.

2.6 Bewertung von Impfstoffen

Ein Impfstoff soll die aktive Produktion von schützenden Antikörpern bewirken und hat in erster Linie die Aufgabe, im vakzinierten Organismus den Ausbruch der spezifischen Krankheit oder Krankheiten zu verhindern oder die Symptome zu mildern.

Bei der Neuentwicklung eines Impfstoffes muss zunächst die Wirksamkeit im Ziel-tier durch Vakzinierung und Challenge belegt werden.

Bevor eine Impfstoffproduktionscharge im Feld eingesetzt werden kann, muss sie nach der EUROPEAN PHARMACOPOEIA (1997) auf ihre Identität und Reinheit getestet werden. Letzterer Aspekt beinhaltet Prüfungen auf Unschädlichkeit, auf Rest-Toxizität und auf Sterilität. Außerdem ist ein Nachweis der Wirksamkeit erforderlich.

Die Vorschriften sollen nach KREEFTENBERG (1999) ein Produkt gewährleisten, das in der Zielpopulation klinisch effektiv und sicher ist.

Im Rahmen der Wirksamkeitsprüfung von Impfstoffchargen mit *C. septicum*-Komponenten müssen Kaninchen immunisiert und geblutet werden. Kaninchen haben sich als geeignetes Modell für die Immunreaktion gegen Clostridienantigene in Schafen erwiesen (FRERICHS und GRAY 1975).

Enthält eine Vakzine mehrere Komponenten, so muss gegen alle Antigene ein für den Immunschutz ausreichender Antikörpertiter ausgebildet und nachgewiesen werden.

In den Seren der immunisierten Kaninchen kann der Impferfolg, gemessen am vorliegenden Titer spezifischer Antikörper gegen das Toxin, quantifiziert werden. Das geschieht derzeit nach DAB (1992) mittels eines Mäuseneutralisationstests. Der Test muss für jede Komponente des Impfstoffes gesondert durchgeführt werden. Für die Titration der *C. septicum*-Komponente einer einzigen Impfstoffcharge sind bis zu 100 Mäuse nötig.

Der Impfstoff gilt bezüglich der *C. septicum*-Komponente als wirksam, wenn der Antikörpertiter des Serums mehr als 2,5 IU/ml in Bezug auf das internationale Standardserum aufweist.

Für die Qualität eines Impfstoffes sind die Menge und die Immunogenität der Antigene, die Auswahl des Adjuvans (BOSE *et al.* 1993, BARNETT *et al.* 1996) und der pH der Vakzine (HEPPLE 1967, KENNEDY 1976) von Bedeutung. Die Wirksamkeit der Vakzine hängt darüberhinaus vom Ort der Impfstoffapplikation (GUPTA 1980, BÖHNEL 1986, MORGAN *et al.* 1987, BARNETT *et al.* 1996, LINDBERG und PILLAI 1996), von den zeitlichen Abständen zwischen den Applikationen (CLAUS und KOLBE 1979) und der zu vakzinierenden Spezies (PRANTER *et al.* 1971, CARDELLA und KOLBE 1976) ab.

Nicht zuletzt spielt auch der Umgang mit dem Material bei Transport und Applikation eine Rolle bei der Effektivität einer Impfung (ZAFFRAN 1995, KREEFTENBERG 1999).

Für eine Qualitätskontrolle von Impfstoffen im Tierversuch sind eine Reihe wichtiger Aspekte im Auge zu behalten.

Faktoren wie ein unterschiedlicher individueller Immunstatus der Versuchstiere und eine Varianz in der belastenden Dosis müssen ausgeschlossen werden.

Die Ausprägung von *C. septicum*-Infektionen unterscheidet sich in verschiedenen Tierarten erheblich. HENDERSON (1935) beobachtete in Kaninchen, die an experimentell induzierter *C. septicum*-Infektion verendeten, keine Anzeichen eines fulminanten Gaskangräs und keine hämorrhagischen Ödeme, beides typische Bilder für *C. septicum*-Infektionen in Meerschweinchen.

Das Ausmaß der Immunreaktion, gemessen am Antikörpertiter nach Agglutinationstest, unterscheidet sich von Tierart zu Tierart. Bei Kaninchen wies HENDERSON (1935) sogar Abweichungen von Rasse zu Rasse nach. FESTING forderte 1999 die

Verwendung von genetisch definierten Hybridmäusen in Laboruntersuchungen, um individuelle Abweichungen zu minimieren.

Auf Grund der zahlreichen Faktoren, die die Immunantwort beeinflussen, ist es bislang nicht möglich, die Immunogenität einer Vakzine ohne Tierversuch vorauszusagen (KNIGHT *et al.* 1990).

2.6.1 Ersatzmethoden für Tierversuche

In Anbetracht der oben beschriebenen Verschiedenheit der Immunreaktionen einzelner Tierarten wäre es sinnvoll, die notwendige Überprüfung der Immunogenität von *C. septicum*-Vakzinen statt in Kaninchen direkt im Zieltier vorzunehmen.

Die Immunsereen könnten von den vakzinierten Zieltieren in größerem Umfang gewonnen werden, ohne das Tier stark zu belasten, denn in der Regel werden Clostridienvakzinen für größere Nutztiere konzipiert, insbesondere Rinder und kleine Wiederkäuer.

Die Messung des Antikörpertiters in den Seren erfolgt, wie bislang vorgeschrieben, im Mäuseneutralisationstest.

Aus ethischen und tierschützerischen Gründen wäre es wünschenswert, Ersatzmethoden für die in großer Anzahl durchgeführten Routinetests zu entwickeln.

Die Korrelation zwischen dem gemessenen Antikörpertiter und der protektiven Wirkung im Zieltier muss ermittelt werden. In einer solchen Titration wird ein Schwellenwert für den Antikörpertiter ermittelt, der Immunschutz bedeutet. Die Tests müssen nicht für jede Impfstoffcharge einzeln durchgeführt werden.

Aus dem Bestreben heraus, Tierversuche in den Qualitätskontrollen von human- und veterinärmedizinischen Arzneimitteln zu reduzieren, wurde Mitte der achtziger Jahre eine europäische Konvention zum Schutz von Wirbeltieren, die für experimentelle und andere wissenschaftliche Zwecke verwendet werden, herausgegeben. Die Konvention war bis 1999 von 15 Ländern und der Europäischen Kommission selbst unterzeichnet worden (ARTIGES 1999). Erklärtes Ziel der Konvention ist unter anderem eine Forcierung der Anwendung des Konzeptes der „drei R“, welches 1959 erstmalig von RUSSEL und BURCH vorgestellt worden war. Die drei R stehen für Replacement (Ersatz), Reduction (Reduzierung) und Refinement (Verfeinerung) von Tierversuchen. CUSSLER (1999) wies darauf hin, dass auf der Basis neuer Forschungsergebnisse und der Einführung von GMP (Good Manufacturing Practice) (WHO 1992) eine erneute Betrachtung der vorhandenen Vorschriften notwendig sei, denn manche könnten sich als überflüssig erweisen. Er fügte den drei R ein weiteres, viertes R für Reassessment (Neubewertung) hinzu.

Eine sehr einfache Methode, Tierversuche zu reduzieren, ist eine Harmonisierung von Regulationen und Gesetzen zur Qualitätskontrolle von Impfpräparaten auf internationaler Ebene (HAASE 1996). Produkte, die grenzüberschreitend eingesetzt werden sollen, müssten dann nicht mehrfach nach den Vorschriften des jeweiligen Landes geprüft werden.

Wenn vertiefte Kenntnisse über die molekulare Struktur von Antigenen vorliegen, könnten Veränderungen der Struktur, die nachweislich die Qualität einer Vakzine

beeinflussen, mittels biochemischer Methoden nachgewiesen werden (LEMERCINIER *et al.* 1999, VOLKIN *et al.* 1996).

Sind experimentelle Ersatzmethoden gefunden, so ist ein besonderes Augenmerk auf eine korrekt durchgeführte Standardisierung und Validierung zu richten (LUCKEN 1999).

Standardisierte Ersatzmethoden können den ursprünglichen Tierversuchen überlegen sein. Zellkultursysteme sind, einmal etabliert, nicht selten empfindlicher und einfacher und schneller durchzuführen als ihre Pendanten unter Einsatz von Tieren. Zudem ist die Tierhaltung teuer.

Von daher können Alternativmethoden in der Qualitätskontrolle von Impfstoffen auch in sich entwickelnden Ländern von großem Wert sein und eingesetzt werden (HONG und HENDRIKS 1999, MILSTIEN und DELLEPIANE 1999).

2.6.2 Nachweis von humoralen Antikörpern gegen Antigene von *C. septicum*

Die Toxintitrationen (LD₅₀) in Mäusen ist systemimmanent einer Fehlerquote von 50-100 % (BERNHEIMER 1944) unterworfen und nicht zuverlässig reproduzierbar (OAKLEY 1970).

GLENNY *et al.* stellten 1931 für *C. septicum* eine Methode vor, Toxin-Antitoxin-Titrationen in Mäusen durch Hauttests mit Meerschweinchen zu ersetzen. In einem einzigen Tier können mehrere Titrationen vorgenommen werden. Die Methode bewährte sich in den Untersuchungen von KNIGHT *et al.* (1990). Ihr Einsatz gestattete eine Reduzierung der Anzahl der benötigten Tiere und ihrer individuellen Belastung. Außer in Tierversuchen können Antikörper auf Grund ihrer physikalischen Bindungskapazität nachgewiesen werden, insbesondere seien hier die verschiedenen Formen des ELISA erwähnt, die WOOD (1991) und WINSNES *et al.* (1999) erfolgreich zum Nachweis von verschiedenen Antikörpern gegen Clostridienantigene, unter anderem von *C. septicum*, verwendeten.

Viele Veröffentlichungen, insbesondere älteren Datums determinieren die Aktivität der Kulturüberstände von *C. septicum* und der Antitoxine auf Basis von Hämolyse-Tests. Letztere sind nach BERNHEIMER (1944) mit einer vernachlässigbaren Fehlerquote behaftet.

Eine weitere Möglichkeit der Toxizitätsmessung und der Antitoxintitration bietet der Einsatz von Zellkulturen, sofern das untersuchte Antigen eine meßbare Einwirkung auf die Zellen hat. Zahlreiche Kulturlinien mit verschiedenen Eigenschaften stehen zur Verfügung und können ohne erheblichen Aufwand in Laboratorien gezüchtet werden. Verschiedenste toxische Agenzien wurden bereits in Tests mit Säugerzellkulturen titriert und die Resultate mit entsprechend in Tierversuchen ermittelten Ergebnissen verglichen. MIYAMURA *et al.* (1974 a, 1974 b) fanden eine gute Korrelation zwischen einem Kaninchenhauttest und einem Zellkulturtest mit Zellen der VERO-Linie für die Titration von Diphtherie-Toxin. ANDERSSON *et al.* (1997) verwendeten Wildschweinspermatozoen und Katzenfötenlungenzellkulturen zum Nachweis von Bakterien- und Pilztoxinen.

Für die Qualitätskontrolle von Toxoidvakzinen gegen Kulturüberstände von *C. septicum* kann die antikörpervermittelte Inaktivierung der zytotoxischen und hämolytischen Kompetenz des toxischen Kulturüberstandes oder des reinen α -Toxins zu Nachweis und Quantifizierung der Antikörper genutzt werden. Das α -Toxin

wurde bereits als das zentrale toxische und letale Prinzip und die anti- α -Toxine als Indikatoren des Immunschutzes herausgestellt (PRANTER *et al.* 1971). KNIGHT *et al.* (1986, 1990) verwendeten VERO-Zellkulturen zur Titration von Antikörpern gegen *C. septicum* α -Toxin und fanden Abweichungen von maximal +8 % bis -22 % zwischen *in vivo* und *in vitro*-Experimenten. Sie betonten auch die im Vergleich zu den Mäusetests wesentlich höhere Sensitivität der Zellkulturen gegen das α -Toxin.

3 EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Eigenschaften des α -Toxins von *C. septicum* zu untersuchen. Folgende Untersuchungen wurden durchgeführt:

- Zwei Stämme *C. septicum* wurden ausgewählt und die Bedingungen zur Produktion des α -Toxins optimiert.
- Die zytotoxische Aktivität der Überstände der Bakteriensuspensionen wurde in einem optimierten Testverfahren mit sensitiven Säugerzellkulturen nachgewiesen.
- Die toxischen Eigenschaften von Kulturüberstand und gereinigtem α -Toxin unter verschiedenen Einflüssen wurde untersucht und optimale Bedingungen für Lagerung und Bearbeitung toxinhaltigen Materials herausgearbeitet.
- Das α -Toxin des Referenzstammes wurde durch Ionenaustauschchromatografie in einem Niederdrucksystem gereinigt.
- Zum Nachweis von spezifischen Antikörpern gegen Toxin von *C. septicum* wurde ein Toxinneutralisationstestsystem entwickelt und optimiert, ebenfalls auf Basis von Zellkulturen.

3.1 Charakteristik der Toxinproduktionsstämme

3.1.1 Morphologie

3.1.1.1 Material

3.1.1.1.1 Bakterienstämme

Für die Untersuchungen wurden der *C. septicum*-Referenzstamm NC 547 der NCTC, (entspricht dem Stamm Nr. 12464 der ATCC) und ein Feldstamm der Spezies *C. septicum* (Labornummer 2258) als toxinproduzierende Kulturen ausgewählt.

Der untersuchte Feldstamm war aus Proben von Kühen gewonnen worden, die bei einem lokalen Ausbruch in einem Milchviehbetrieb bei Raesfeld (Münsterland) an Geburtsrauschbrand erkrankt und daran gestorben waren.

3.1.1.1.2 Nährlösungen und feste Nährböden

C. septicum ist hinsichtlich seiner Wachstumsbedingungen nur mäßig anspruchsvoll. Benötigt werden neben anorganischen Salzen und einer Kohlenstoffquelle, hier Glu-

cose, Aminosäuren (zur Biosynthese; Energiegewinnung aus Aminosäuren ist für *C. septicum* nicht möglich (SMITH und WILLIAMS 1984)), Vitamine und Wachstumsfaktoren (HASAN und HALL 1976).

Auf Grund bereits vorliegender Laborerfahrungen wurden zwei Medien mit den im Anhang (S. I) aufgeführten Zusammensetzungen als Wachstums- und Toxinproduktionsmedium getestet. Es handelte sich um Reinforced Clostridia Medium (RCM), ein bereits von KOCH *et al.* (1978) und BÖHNEL (1986) für Clostridienkulturen verwendetes, nach Rezept im Labor hergestelltes Medium. In diesem Medium ist Cysteiniumchlorid als reduzierende Substanz enthalten. Ein niedriges Redoxpotenzial wird als ein begünstigender Faktor für das Wachstum von Clostridien betrachtet.

Die verwendeten Substanzen wurden, soweit nicht anders angegeben, von der Firma MERCK bezogen.

Außerdem wurde ein Fertigmedium, Hirn-Herz-Bouillon (HHB) verwendet (SCHALLEHN 1975, HOLDEMAN *et al.* 1977).

Das Wachstum auf festen Nährböden wurde auf einem Humanblutagar auf Basis von RCM und auf einem Agarnährboden DST der Firma OXOID getestet (Anhang, S. I, II).

3.1.1.2 Methoden

Beide *C. septicum*-Stämme wurden in 10-ml-Röhrchen mit 5 ml RCM angezogen. Die Inkubation erfolgte anaerob bei 37 °C für 20 h. Von den Kulturen wurden Präparate auf Objektträgern angefertigt und anschließend gramgefärbt (nach HUCKER 1979).

Die beiden untersuchten *C. septicum* Stämme wurden außerdem auf Humanblut-RCM-Agar ausgestrichen und 24 h bei 37 °C im Anaerobentopf bebrütet. Die anaerobe Gasatmosphäre von 90 % N₂, 5 % H₂ und 5 % CO₂ wurde mittels des *Anoxomat*®-Systems (MART) computergesteuert eingestellt.

Zur Kontrolle auf aerobes Wachstum wurden die Stämme auf Humanblut-Agar und dem Nährboden DST ausgestrichen und inkubiert.

3.1.1.3 Ergebnisse

3.1.1.3.1 Flüssigkulturen

Verschiedene Grampräparate eines Bakterienstammes variierten erheblich in der Morphologie. Unterschiede zwischen den beiden Stämmen *C. septicum* waren nicht eindeutig zu definieren.

Die Kultur des Referenzstammes *C. septicum* NC 547 präsentierte ein pleomorphes Erscheinungsbild. Es traten kurze Stäbchen, einzeln oder doppelt, Ketten von Stäbchen und filamentartige Fäden auf. Die Gramfärbung variierte von deutlich positiv vor allem für kräftigere Stäbchen bis negativ bei Fäden und Zellen von unregelmäßiger Gestalt.

Zahlreiche Sporen wurden gefunden. Sie lagen frei in der Kultur vor, zentralständig in der Bakterienzelle, oder sie blähten die Bakterienzelle auf (Zitronenform).

Das Erscheinungsbild des Feldstammes *C. septicum* 2258 war ebenfalls deutlich pleomorph. Es wurden einzelne und doppelte Stäbchen gefunden, die sich in Länge und Dicke stark voneinander unterschieden; lange Fäden konnten ebenfalls beobachtet werden. Die Bakterien waren vorwiegend gramnegativ oder insgesamt schwach angefärbt. Freie Sporen und zitronenförmige Zellen mit zentralständigen Sporen waren vorhanden.

3.1.1.3.2 Koloniefornen auf festen Nährböden

Auf Blutagarplatten bildet der Referenzstamm NC 547 kleine, beigefarbene, glänzende Kolonien. Die Organismen schwärmten auf dem Nährboden. Große Bereiche der Platten waren mit einem feinen hellgrauen Film überzogen.

Es trat eine β -Hämolyse auf, mit klar begrenzten hämolytischen Höfen um die Kolonien. Häufig war die Toxinbildung so ausgeprägt, dass die hämolytischen Höfe vollständig transparent erschienen.

Die mit dem Feldstamm 2258 beimpften Platten wiesen ebenfalls kleine, beigefarbene, glänzende Kolonien auf. Im Vergleich zum Referenzstamm schwärmten die Bakterien des Feldstammes weniger stark. Hämolyse konnte nur selten und in geringem Ausmaß beobachtet werden (Kap. 3.1.5.3).

3.1.2 Gaschromatografie

3.1.2.1 Methode

5 ml von 24 h-Röhrchen-Kulturen beider Stämme *C. septicum* in RCM wurden in 20 ml RCM überimpft und 48 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Aufarbeitung und Untersuchung der Proben für die gaschromatografische Analyse der in den Zellen enthaltenen langkettigen Fettsäuren nach HEITEFUSS (1991).

Zur Feststellung der Übereinstimmung zwischen den Meßwerten eines untersuchten Stammes und den bereits zur Verrechnung vorliegenden Daten anderer Stämme wurde die lineare Korrelation (*Bravais-Pearson-Koeffizient* r) ermittelt. Die Ergebnisse der Messungen wurden mit Hilfe des Identifizierungsprogramm *BIS* verrechnet und mit Chromatogrammen anderer Stämme verglichen. Unter den zu vergleichenden Chromatogrammen befanden sich auch solche von früheren Ansätzen beider Stämme.

Die Fettsäure-Retentionsmuster für beide Stämme wurden zunächst mit den gespeicherten Retentionsmustern aller Clostridien-Referenzstämme der Datenbank des Instituts verglichen. Danach erfolgte ein Vergleich mit den Mustern aller insgesamt im Labor mit der Methode untersuchten anaeroben Feld- und Referenzstämme.

Für die Auswertung wurden jeweils 10 Stämme betrachtet, deren Bravais-Pearson-Koeffizienten r die größte Ähnlichkeit zum untersuchten Stamm aufwiesen.

3.1.2.2 Ergebnisse

In den Tabellen A-1 bis A-4 (Anhang S. II-III) sind die vom Verrechnungsprogramm ermittelten Daten wiedergegeben.

Für den Referenzstamm NC 547 bestand zu keinem der zur Verrechnung vorhandenen anderen Referenzstämmen eine Ähnlichkeit von mehr als 89,2 % (*C. novyi* IRP 190). Für zwei Stämme *C. botulinum* (Typ E (4611) und G (ATCC 27322)) fanden sich Koeffizienten von 86,4 % resp. 86,2 %. Alle anderen Stämme wiesen weniger als 85 % Ähnlichkeit auf.

Mit dem ursprünglichen Retentionsmuster desselben Stammes zu einem früheren Zeitpunkt wurden 98,9 %, 98,2 % und 84,9 % Übereinstimmung gefunden.

Wurde das Chromatogramm mit allen bisher verrechneten Stämmen verglichen, so zeigte sich Ähnlichkeit zu Referenz- und Feldstämmen von *C. septicum* und *C. chauvoei*. Diese beiden Spezies heben sich deutlich als Gruppe von den anderen Clostridienarten ab, können aber durch die gaschromatografische Untersuchung der langkettigen Zellwandfettsäuren und der leicht- und schwerflüchtigen Gärungsprodukte nicht sicher voneinander unterschieden werden (GIERCKE-SYGUSCH 1987, HEITEFUSS 1991).

Der Feldstamm 2258 zeigte im Vergleich mit den Referenzstämmen die größte Ähnlichkeit zum Referenzstamm NC 547 (98,7 %). Wie zu erwarten (HEITEFUSS 1991, KUHNERT 1997), bestand weiterhin mit 98,2 % und 96,3 % große Ähnlichkeit zu *C. chauvoei* (IRP 206 resp. NCTC 8596). Hohe Koeffizienten wurden darüberhinaus für *C. botulinum*, Typ A (62 A, 4997) und C (5295, 003-9, 468 C) und für je einen Stamm der Spezies *C. parabotulinum* (ATCC 17863) und *C. lentoputrescens* (ATCC 17794) gefunden.

Im Vergleich mit allen bisher von Anaerobiern zur Verfügung stehenden Chromatogrammen wurden Ähnlichkeiten mit Stämmen der Spezies *C. septicum* und *C. chauvoei* nachgewiesen.

3.1.3 Immunfluoreszenz¹

3.1.3.1 Material und Methode

Die Rezepte der verwendeten Pufferlösungen sind im Anhang (S. IV) aufgeführt. Es wurden mit Fluoreszenzfarbstoff konjugierte Antikörper gegen *C. septicum* und *C. chauvoei* aus Hyperimmunserum (VMRD INC.) verwendet.

Zur Vorbereitung wurden Suspensionen beider Stämme auf Blut-RCM-Agarplatten ausgestrichen und 24 h bei 37 °C unter anaeroben Bedingungen inkubiert.

Mittels einer Impföse wurde aus den Kolonien Bakterienmaterial auf Objektträger übertragen und für 20 min bei Raumtemperatur getrocknet. 75 µl Konjugat wurden auf das getrocknete Präparat aufgetragen und der Objektträger dann 30 min in einer Feuchtekammer inkubiert. Danach wurde vorsichtig mit Puffer FA gewaschen und 10 min im selben Puffer imprägniert. Schließlich wurden die Objektträger getrocknet und mit der Glycerollösung (Puffer FA) beschickt. Zur Auswertung wurden die Präparate im Fluoreszenzmikroskop betrachtet.

¹ Die Arbeiten wurden dankenswerterweise von Dr. A. Wong González (WONG GONZÁLEZ 2000) durchgeführt.

3.1.3.2 Ergebnisse

Der Referenzstamm NC 547 zeigte mit Anti-*C. septicum*-Konjugat eine deutlich positive Reaktion. Die Zellen wurden mit Fluoreszenzfarbstoff vollständig angefärbt. Mit Anti-*C. chauvoei*-Konjugat konnte keine Fluoreszenz nachgewiesen werden.

Die Anfärbung der Proben des Feldstammes 2258 mit Anti-*C. septicum*-Konjugat war schwach. Auch hier wurde mit Anti-*C. chauvoei*-Konjugat keine Fluoreszenz nachgewiesen.

3.1.4 Polymerase-Kettenreaktion¹

3.1.4.1 Material und Methoden

Die DNA wurde aus anaerob bei 37 °C in RCM inkubierten 24-h-Kulturen gewonnen. Je 1 ml der Bakteriensuspensionen beider Stämme wurde 10 min bei 7500 U min⁻¹ (ca. 8400 g) zentrifugiert. Die Sedimente wurden anschließend in 180 µl Lysispuffer wiederaufgenommen und 30 min bei 37 °C inkubiert. Danach wurden 25 µl der Proteinase K-Lösung hinzugegeben und auf einem *Vortex-Genie* gut gemischt. Das Gemisch wurde bis zur vollständigen Lyse der Zellen bei 55 °C im Wasserbad inkubiert. Die Isolierung der DNA erfolgte nach Anweisungen des kommerziellen *Nucleo Spin Nucleic Acid Purification Kits* (MACHEREY-NAGEL). Die Zusammensetzung der Pufferlösungen ist im Anhang (S. IV) angegeben.

Primer für:

16S rRNA –Gen von *C. chauvoei* (nach KUHNERT 1997):

CC16S-L 5' GTCGAGCGAGGAGAGTTC 3' (nt 54-71) und
CC16S-R 5' TCATCCTGTCTCCGAAGA 3' (nt 1013-996)

Hämolysin-Gen von *C. septicum* (nach TAKEUCHI *et al.* 1997)

5' AATTCAGTGTGCGGCAGTAG- 3' und
5' CCT GCCCCAACCTTCTCTTTT- 3'

Sialidase-Gen von *C. sordellii*

5' CTTCAGACTTTGGCAGATGG 3' und
5' TTCCATCTTCAGGGTATGGG 3'

16S rRNA-Gen von *C. sordellii*

5' CGGGATAACATATGAGAG 3' und
5' ACTCAAGTCCTACAGTTCC 3'

Zytotoxin-Gen von *C. sordelli*

5' CTGGAAGGAATAAAGCC 3' und
5' ATATATCAGAAGCAGCAG 3'

Die Primer für die Gene von *C. sordellii* wurden nach den Angaben zur Nucleotidsequenz des Sialidase-Gens von ROTHE *et al.* (1989), des 16S rRNA-Gens von WOESE (1987) und des Zytotoxingens von NAKAMURA *et al.* (1983) ermittelt.

Für die Durchführung der Polymerase-Kettenreaktion wurden 25 µl Reaktionsgemisch angesetzt, bestehend jeweils aus 2 µl isolierter DNA, je 2 µl sense- und antisense-Primer und 19 µl H₂O bidest..

Die Amplifikation der ausgewählten Genabschnitte erfolgte mit Hilfe von *ready-to-go PCR Beads* (AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH) im Thermocycler *Primus 25 / 96* (MWG BIOTECH) nach den folgenden Protokollen:

16S rRNA –Gen von *C. chauvoei*:

Initiationsschritt:	3 min	94 °C
35 Zyklen:	30 sec	94 °C
	30 sec	58 °C
	60 sec	72 °C
Endschritt:	7 min	72 °C

Hämolysin-Gen von *C. septicum*:

35 Zyklen:	5 min	94 °C
	60 sec	55 °C
	60 sec	72 °C
Endschritt:	7 min	72 °C

Sialidase-Gen von *C. sordellii*:

Initiationsschritt:	5 min	94 °C
30 Zyklen:	60 sec	94 °C
	60 sec	50 °C
	80 sec	72 °C
Endschritt:	7 min	72 °C

16S rRNA-Gen von *C. sordellii*:

Initiationsschritt:	5 min	94 °C
30 Zyklen:	60 sec	94 °C
	60 sec	50 °C
	60 sec	72 °C
Endschritt:	7 min	72 °C

Zytotoxin-Gen von *C. sordellii*:

Initiationsschritt:	5 min	94 °C
30 Zyklen:	60 sec	94 °C
	60 sec	60 °C
	60 sec	72 °C
Endschritt:	7 min	72 °C

Die amplifizierten Proben wurden einer Elektrophorese in einem Agarosegel (1 %, 0,4 A, 120 min) mit anschließender Ethidiumbromidfärbung unterworfen (Anhang, S. IV).

3.1.4.2 Ergebnisse

Nach der Amplifikation von isolierter DNA des Referenzstammes NC 547 und des Feldstammes 2258 mit Primern, die für das Hämolysin-Gen von *C. septicum* spezifisch waren, konnten deutliche Banden in dem Agarosegel nachgewiesen werden (Abb. 1).

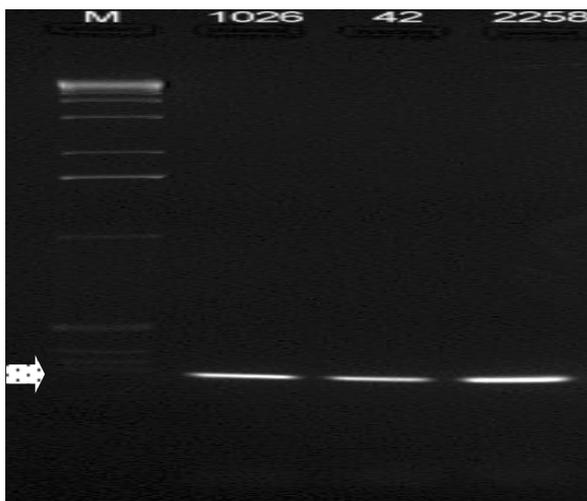


Abb. 1: Nachweis der Amplifikationsprodukte des Hämolysingens von *C. septicum* nach PCR im Agarosegel nach Ethidiumbromidfärbung.

1026 = *C. septicum* Referenzstamm NC 547

42 = *C. septicum* Referenzstamm

2258 = *C. septicum* Feldstamm

Alle drei untersuchten Stämme zeigten eine positive Reaktion für das Hämolysin-Gen (Pfeil). Spezifische Primer für das 16S rRNA-Gen von *C. chauvoei* und die ausgewählten Gene von *C. sordellii* führten nicht zu DNA-Replikation und erbrachten eine negative Reaktion im Agarosegel.

3.1.5 Hämolyseaktivität

C. septicum produziert eine Reihe von Exotoxinen, deren Bezeichnungen und Eigenschaften in der Bibliografie dargestellt wurden. Neben dem von *C. septicum* produzierten α -Toxin hat auch das δ -Toxin hämolytische Eigenschaften.

3.1.5.1 Material

α -toxinhaltige Fermenterkulturüberstände von *C. septicum* Referenzstamm NC 547 (Batch 97 FS-2; filtriert und konzentriert), sowie von Feldstamm 2258 (Batch 96 FS-

3, filtriert) wurden auf die hämolytische Aktivität getestet. Außerdem wurde Überstand von einer Röhrenkultur *C. chauvoei* (IRP 206, USDA) eingesetzt. Die Überstände waren bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert worden. Sie wurden in einer Mikro-Zentrifuge (Typ 00912, HERAEUS CHRIST) 10 min bei 10000 min^{-1} (ca. 8400 g) abzentrifugiert.

Nach TAKANO und KONDO (1987) reagiert menschliches defribiniertes Blut sensibler gegen das α -Toxin als defribiniertes Blut vom Schaf. Dennoch werden Schaferythrozyten von verschiedenen Autoren (MOUSSA 1958, AL-KHATIB 1964 und 1968) für Tests mit *C. septicum*-Toxinen eingesetzt.

Zur Herstellung einer 1-%igen Erythrozytensuspension wurden ca. 20 ml defribinierten Blutes in ein 50 ml Zentrifugationsröhrchen gegeben und gewaschen:

Die Erythrozyten wurden in ca. 30 ml PBS (Anhang, S. VII) vorsichtig aufgeschüttelt und anschließend 15 min bei 3500 U min^{-1} (ca 1900 g) zentrifugiert (*Universal 30 RF*; Rotor: 1424 A, HETTICH). Der Überstand wurde abgezogen und die Prozedur wiederholt, bis der Überstand klar war.

250 μl des Erythrozytenpellets wurden mit 24,75 ml PBS zu einer 1-%igen Erythrozytensuspension vereinigt.

Das Humanblut stammte von defribinierten Blutkonserven (Konserven des Klinikums Göttingen, deren Verfallsdatum überschritten war), das Schafblut war einem Schaf (Fleischrasse) aus der Halsvene steril entnommen und durch Schwenken mit Glasperlen defribiniert worden.

Aus Voruntersuchungen war bekannt, dass die hämolytische Aktivität für keine der Proben einen Wert von 100 HE/ml überschritt, so dass auf eine Vorverdünnung verzichtet wurde.

3.1.5.2 Methode

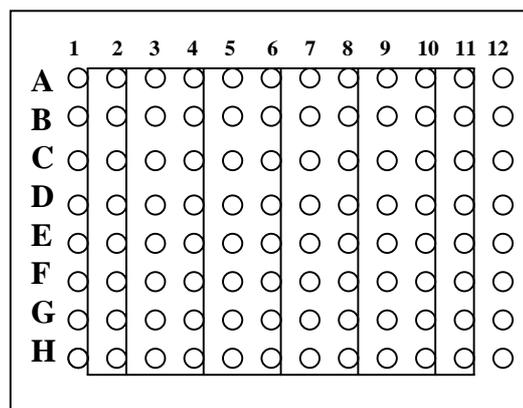


Abb. 2: Schema der Plattenbelegung für den Hämolysetest

Ansatz der Testplatten:

- In V-Boden-Mikrotiterplatten (96 Kavitäten, SARSTEDT) wurden 100 μl PBS in die Kavitäten A2 bis H10 einpipettiert; in Spalte 11 wurde H_2O bidest als positive Kontrolle (100 % Hämolyse) vorgelegt.

- In Zeile A wurden von Kavität A 3 bis A 10 in Doppelbestimmung je 100 µl Probe (Kulturüberstand) gegeben; Kavität A2 verblieb als negative Kontrolle (0 % Hämolyse), Kavität A 11 als positive Kontrolle (100 % Hämolyse) ohne Probe.
- Das Probenmaterial in den Kavitäten der Zeile A wurde 6 x mit einer elektronischen 8-Kanal-Pipette durchmischt und dann 100 µl des Gemisches in die nächste Zeile gegeben und so fort bis Zeile H; die letzten 100 µl aus Zeile H wurden verworfen.
- 100 µl Erythrozytensuspension (1 %) wurde hinzugegeben.
- Die Inkubation erfolgte für 4 h bei 37 °C.
- Nach der Inkubation wurden die Platten bei 1000 U min⁻¹ (ca. 160 g) 10 min lang zentrifugiert (*Varifuge*). Danach wurden 80 µl des Überstandes in eine Flachbodenmikrotiterplatte (96 Kavitäten, SARSTEDT) übertragen und im ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 540 nm photometrisch gemessen. Das Programm *DIGIWIN* (Vers. 2.40, ASYS HITECH) lieferte eine Matrixexportdatei, die direkt in das Tabellenkalkulationsprogramm *MICROSOFT EXCEL* eingelesen werden konnte.
- Die Berechnung der hämolytischen Aktivität in hämolytischen Einheiten pro ml (HE/ml) erfolgte analog zur Kalkulation der zytotoxischen Einheiten (Kap. 3.2.2.4).
- Alle Ausgangsplatten wurden nach drei Tagen Lagerung im Kühlschrank (+8 °C) ein weiteres Mal betrachtet (keine photometrische Messung).

3.1.5.3 Ergebnisse

In Tab. 1 sind die Ergebnisse der Hämolysetests und der Zytotoxizitätstests (Kap. 3.1.6) aufgeführt. Es sind der Mittelwert und die Standardabweichung von drei durchgeführten Testansätzen mit den gleichen Proben (je frisch aufgetaut) angegeben.

Tab. 1: Hämolytische und zytolytische Aktivität von Proben zweier Stämme *C. septicum* und eines Stammes *C. chauvoei*; Einsatz von Human- und Schaferythrozyten im Hämolysetest

ÜBERSTAND VOM STAMM		<i>C. septicum</i>		<i>C. chauvoei</i>	
TEST		NC 547		2258	IRP 206
		Voll-überst.	Reines Toxin	Voll-überst.	Voll-überstand
Zytotoxizitätstest (CE/ml)	Mittelwert	41698	1399	1118	0
	Stdabw.	10130	155	319	0
Hämolysetest: Schaferythrozyten (HE/ml)	Mittelwert	5,5	0	6,0	59,8
	Stdabw.	1,3	0	2,2	3,5
Hämolysetest: Human-erythrozyten (HE/ml)	Mittelwert	70	4,4	0	12
	Stdabw.	27	1,8	0	3

In Schafblut wurden für den Kulturüberstand von *C. chauvoei* ca. 60 HE/ml ermittelt. Die Titer für beide Stämme *C. septicum* lagen bei ca. 1/10 des Wertes für *C. chauvoei*.

Bei der Hämolyse in Humanblut ergaben sich die höchsten Titer (ca. 70 HE/ml) für den Referenzstamm *C. septicum*, *C. chauvoei* zeigte nachweisbare Hämolyse. Für den Feldstamm konnte keine hämolytische Aktivität gezeigt werden.

Menschliche Erythrozyten waren empfindlicher gegen die hämolytische Aktivität des Referenzstammes *C. septicum* NC 547 als Schaferythrozyten. Hingegen war eine hämolytische Aktivität des Feldstammes 2258 überhaupt nur mit Schafblut nachweisbar.

Das gereinigte α -Toxin des Stammes NC 547 zeigte mit Schafblut keine Hämolyse, mit Humanblut wurden durchschnittlich 4,4 HE/ml nachgewiesen.

Die Betrachtung der Testplatten nach drei Tagen gekühlter Lagerung zeigte, dass eine weitere Hämolyse stattfand. Der Titer erhöhte sich für Kulturüberstand und reines Toxin des Stammes NC 547 in beiden Blutsorten um jeweils 2-3 Verdünnungsstufen. Dieser Effekt war in etwas geringerem Ausmaß auch für Stamm 2258 zu beobachten, hier stärker mit Humanblut als mit Schafblut.

In Humanblut steigerte sich auch für *C. chauvoei* die hämolytische Aktivität noch nach der vierstündigen Inkubation. In Schafblut konnte dieser Effekt nicht beobachtet werden.

3.1.6 Zytolytische Aktivität

Das α -Toxin von *C. septicum* hat zytotoxische Eigenschaften. Mammalia-Zellen in *in vitro*-Kulturen lysieren in Gegenwart des Toxins.

3.1.6.1 Material und Methode

Es wurden dieselben Proben verwendet wie in den Hämolysetests in Kap. 3.1.5. Das Testverfahren ist in Kap. 3.2 ausführlich beschrieben.

3.1.6.2 Ergebnisse

Die Ergebnisse der Zytotoxizitätstests sind in Tab. 1 dargestellt. Es sind der Mittelwert und die Standardabweichung von drei durchgeführten Testansätzen mit den gleichen Proben (je frisch aufgetaut) angegeben.

Für den Referenzstamm *C. septicum* NC 547 wurden im Mittel 41698 CE/ml gefunden. Die ausgewählte Probe des Feldstammes 2258 enthielt 1118 CE/ml.

In der Probe von *C. chauvoei* konnte keine zytotoxische Aktivität gegen die Babyhamsternierenzelllinie nachgewiesen werden.

3.2 Standardisierung eines Zytotoxizitätstests mit Mammalia-Zellkulturen

3.2.1 Zellkulturen

3.2.1.1 Material

Gewebekulturen stellen hohe Ansprüche an das Nährmedium. Je nach Zelllinie sind spezifische Zusammensetzungen erforderlich.

Die für die Zelllinien jeweils verwendeten Medien und die zur Kultivierung benötigten Pufferlösungen sind im Anhang (S. V + VI) aufgeführt.

Der pH-Wert wurde bei allen Medien auf 7,2 eingestellt und das Medium anschließend sterilfiltriert. Die Filtration erfolgte durch ein autoklaviertes Sandwichsystem aus zwei Celluloseacetatmembranen der Firma SARTORIUS (0,45 µm und 0,2 µm Porendurchmesser) mit einem Glasfaser-Vorfilter.

3.2.1.2 Schema der Zellkultur

Alle Zellen wurden in Monolayer-Zellkultur-Flaschen (SARSTEDT) bei 37 °C in 5 % CO₂-Atmosphäre inkubiert. Die Ernte und der Einsatz der Zellen in den Zytotoxizitätstests erfolgten nach folgendem Schema:

Tag	ANLEGEN VON KULTURFLASCHEN FÜR		EINSATZ IM ZYTOTOXIZITÄTSTEST: ZELLEN VON
	KULTUR	TEST	
Tag 1	Tag 4	Tag 5	Tag 4
Tag 2			Tag 5
Tag 4	Tag 1	Tag 1	
Tag 5		Tag 2	Tag 1

Abb. 3: Schema für Zucht und Ernte von Zellkulturen

Das Schema gewährleistete, dass für Tests dreimal wöchentlich Zellen zur Verfügung standen, die vier Tage in der Flasche gewachsen waren.

Bei der Ernte wurden die Zellen zunächst in der Kulturflasche mit GKN gewaschen und danach mit Trypsin-EDTA-Lösung von der Wachstumsunterlage gelöst. Nach 5-10 min Trypsinierung wurde mit 2 ml Zellmedium gestoppt und die abgelösten Zellen für 5 min bei 2000 U min⁻¹ (ca. 760 g) zentrifugiert (Zentrifuge: *Typ U III*, HERAEUS CHRIST). Danach wurde der trypsinhaltige Überstand abgenommen und das Zellpellet in 2 ml Zellmedium resuspendiert.

Die Zellsuspension wurde entweder zur Fortführung der Kultur in neue Zellkulturflaschen mit Medium passagiert oder nach Verdünnung in Zytotoxizitätstests eingesetzt.

3.2.2 Aufbau des Zytotoxizitätstests

Der zu standardisierende Zytotoxizitätstest musste reproduzierbar sein und eine hohe Empfindlichkeit im Nachweis des α -Toxins und in der Abstufung verschiedener Proben untereinander ermöglichen.

3.2.2.1 Material

- Zellkultur-Mikrotiterplatten (96 Kavitäten, SARSTEDT; Abb. 2)
- Zellkulturmedien (S. V) mit Zusatz von Antibiotika:
 - Penicillin 100 IU/ml
 - Streptomycin 100 μ g/ml
- Probenmaterial, 10 min abzentrifugiert (10000 U/min (ca. 8400 g) in der Mikro-Hämatokritzentrifuge) oder filtriert; gegebenenfalls vorverdünnt
- Zellen aus 4-Tage-Kulturen
- MTT-Lösung (Anhang, S. VI)
- HCl-Isopropanol-SDS-Lösung (Anhang, S. VI)

3.2.2.2 Methode

- Alle Kavitäten von B 1 bis G 12 wurden zunächst mit 50 μ l Zellkulturmedium befüllt.
- In Spalte 2 wurden je 50 μ l der (evtl. bereits vorverdünnten) Proben bzw. des laborinternen Toxinstandards in Doppelbestimmung hinzupipettiert. Spalte 12 diente als negative Kontrolle (kein Zellwachstum), Spalte 11 als positive Kontrolle (100 % Zellwachstum).
- Das Material in den Kavitäten der Spalte 2 wurde 6 x mit der elektronischen 8-Kanal-Pipette durchmischt und anschließend 50 μ l des Gemisches in die nächste Spalte gegeben. Der Vorgang wurde bis Spalte 10 fortgeführt; von dem Material wurden nach Mischen 50 μ l verworfen.
- In alle belegten Kavitäten wurden erneut 50 μ l Zellkulturmedium gegeben.
- Es wurde eine Zellsuspension mit einer definierten Konzentration an Zellen, Menge je nach Zelllinie und Wachstum (Tab. 2) angesetzt. Die Zellen waren zuvor von den Kulturflaschen abtrypsiniert und anschließend in einer Neubauer-Zählkammer (LINDL und BAUER, 1987) gezählt worden. Sie wurden bis zur gewünschten Konzentration mit antibiotikahaltigem Zellkulturmedium verdünnt; von dieser Zellsuspension wurden je 50 μ l in alle belegten Kavitäten gegeben.
- Auf allen Platten wurde eine Probe von laborinternem Toxinstandard sowie eine toxische Zellwachstumskontrolle (Spalte 11) und eine zellfreie Mediumkontrolle (Spalte 12) mitgeführt.
- Die Platten wurden für 72 h bei 37 °C in 5 % CO₂-Atmosphäre inkubiert.

3.2.2.3 Anfärbung der vitalen Zellen zur Auswertung

- Nach der Inkubation wurden 25 µl MTT-Reagenz (Anhang, S. VI) in alle belegten Kavitäten einpipettiert und die Platten für weitere 4 h bei 37 °C in 5 % CO₂-Atmosphäre inkubiert.
- Anschließend wurde der gesamte Überstand durch Auflegen der umgedrehten Platten auf einen saugfähigen Untergrund vorsichtig entfernt. Die Zugabe von 120 µl einer HCl-Isopropanol-SDS-Lösung (Anhang, S. VI) in jede belegte Kavität führte zur Ablösung der Zellen vom Untergrund und zur Lösung des Farbstoffkomplexes. Das Reagenz reagiert mit aktiven Komponenten der Atmungskette und färbt so selektiv vitale Zellen an.
- Die Extinktionen der gefärbten Lösungen wurden in einem ELISA-Reader (ASYS HITECH Digiscan) bei einer Wellenlänge von 570 nm photometrisch erfasst. Das Programm *DIGIWIN (Vers. 2.40)* lieferte Matrixexportdateien, die direkt in das Tabellenkalkulationsprogramm *MICROSOFT EXCEL* eingelesen werden konnten.

3.2.2.4 Kalkulation der Ergebnisse der Zytotoxizitätstests

Es wurde für jede gemessene Mikrotiterplatte ein Mittelwert für die Extinktion bei 100 % (Zellkontrolle) bzw. bei 0 % Zellwachstum ermittelt. Diejenige Verdünnungsstufe des α-Toxins, bei welcher genau 50 % überlebende Zellen nachgewiesen werden konnten, wurde definiert als die toxische Aktivität der Probe in zytotoxischen Einheiten pro ml (CE/ml).

Der Wert wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\left(\frac{P - E_k}{E_g - E_k} \right) \cdot D_V + D_V = A_P$$

A_P = errechnete Verdünnungsstufe des Toxins, bei der genau 50 % der Zellen vital verbleiben = Toxizität in CE/ml

P = errechnete Extinktion bei 50 % vital verbliebenen Zellen
($P = (E_{100\%} - E_{0\%}) / 2$)

E_k = Extinktion bei der im Vergleich zu P nächstkleineren gemessenen Verdünnungsstufe

E_g = Extinktion bei der im Vergleich zu P nächstgrößeren gemessenen Verdünnungsstufe

D_V = Differenz zwischen der nächstkleineren und der nächstgrößeren Verdünnungsstufe

Besonders in den höheren Verdünnungsstufen manifestierte sich ein Unterschied von nur einer Verdünnungsstufe als ein hoher Zahlenwert.

3.2.3 Optimierung des Zytotoxizitätstests

3.2.3.1 Auswahl der sensitivsten Zelllinie

3.2.3.1.1 Material und Methoden

Zur Optimierung des Zytotoxizitätstests wurden sechs Zelllinien auf ihre Empfindlichkeit gegen das α -Toxin getestet.

Tab. 2: Im Zytotoxizitätstest eingesetzte Zelllinien und -konzentrationen

ZELLINIE	HERKUNFT	TYP	Einsatz Zellen/ml
BHK21-BSR/PK5/88	IVZ, Kat.Nr. 194	Baby hamster kidney	$1,0 \cdot 10^5$
CHO-K1	DSMZ, Acc. No. 110	Chinese hamster ovary	$1,0 \cdot 10^5$
EBL	DSMZ, Acc. No. 192	Embryonic bovine lung	$1,0 \cdot 10^5$
MDCK	BgVV, Jena	Canine kidney	$0,8 \cdot 10^5$
Vero	PEI, Langen	African green monkey kidney	$1,5 \cdot 10^5$
3T3	DSMZ, Acc. No. 173	Swiss albino mouse fibroblasts	$1,5 \cdot 10^5$

Für den Test war es notwendig, dass in den Kavitäten mit Zellkontrollen (100 % Wachstum) nach der Inkubation ein Zellrasen vorlag, der den Boden zu 90-95 % bedeckte. Die einzusäende Menge an Zellen war abhängig von der Qualität des Wachstums der verschiedenen Linien.

Die Zelllinien wurden in Zytotoxizitätstests mit vier Wiederholungen an verschiedenen Tagen untersucht.

Verwendet wurde α -toxinhaltiger Überstand des Referenzstammes NC 547 aus dem Produktionslauf 97 FS-2 T5 und des Feldstammes 2258 aus dem Produktionslauf 96 FS-8.

3.2.3.1.2 Ergebnisse

In Abb. 4 sind für beide Stämme die Mittelwerte und Standardabweichungen von vier Wiederholungen einer jeweils frisch aufgetauten Probe dargestellt.

Mit Zellen der BHK21-BSR/PK5/88-Linie wurden für das α -Toxin des Referenzstammes NC 547 über 25000 CE/ml gemessen. Zellen der Vero-Linie ergaben Titer von ca. 20000 CE/ml, der 3T3-Linie von ca. 10000 CE/ml und für die übrigen Linien wurden 5000 und weniger CE/ml gemessen.

Auch das α -Toxin des Feldstammes 2258 schädigte die Zelllinie BHK21-BSR/PK5/88 stark (ca. 5000 CE/ml). Die anderen Linien, außer Vero, ergaben Titer von unter 2500 CE/ml. Zellen der Vero-Linie waren in geringem Maße empfindlicher als BHK21-BSR/PK5/88-Zellen.

Da Vero-Zellen generell ein sehr schwaches Wachstum aufwiesen, was zu einer geringen Intensität bei Anfärbung mit MTT und starken Abweichungen zwischen den Testergebnissen führte, kam die Vero-Linie für die weiteren Untersuchungen nicht in Betracht.

Im Folgenden wurden zur Bestimmung der toxischen Aktivität Zellen der Linie BHK21-BSR/PK5/88 eingesetzt.

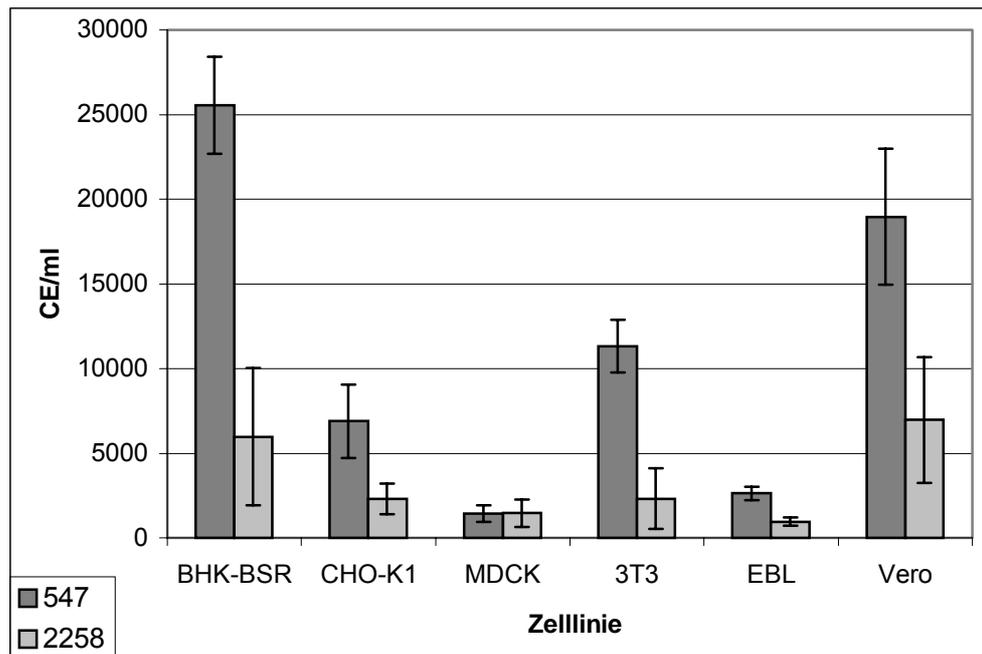


Abb. 4: Zytotoxische Aktivität von Überständen von *C. septicum*, Referenzstamm NC 547 und Feldstamm 2258, auf sechs verschiedenen Zellkulturlinien

3.2.3.2 Auswirkung der Anzahl Passagierungen

Wachstum und Eigenschaften von Zellen sind abhängig vom Alter der Zellkultur. Hierbei spielen die Dauer der Lagerung der Zellen, sowie die Anzahl der Passagierungen in Kultur eine Rolle (LINDL und BAUER 1987).

3.2.3.2.1 Material und Methoden

Das Ausgangsmaterial der Zellkulturen waren Zellen der BHK21-BSR/PK5/88-Linie der 30. Passage, die bei -192 °C gelagert worden waren.

Fünf verschiedene Chargen der ausgewählten Zelllinie wurden mit Kulturüberständen des Referenzstammes NC 547 über 5-35 Passagierungen hinweg getestet. Chargen eins bis vier wurden mit Toxin aus dem Batch 97 FS-2 T5 getestet, Charge fünf mit Toxin aus dem Batch 99 FS-7/B T5P (Kap. 3.3.6).

Für die Tests mit Toxin des Referenzstammes aus der Fermenterproduktionscharge 99 FS-7/B T5P wurde als Maßgabe für die Reproduzierbarkeit nach folgender Formel ein Variationskoeffizient v berechnet:

$$v = \left(\frac{\text{Standardabweichung} \cdot 100}{\text{Mittelwert}} \right)$$

3.2.3.2.2 Ergebnisse

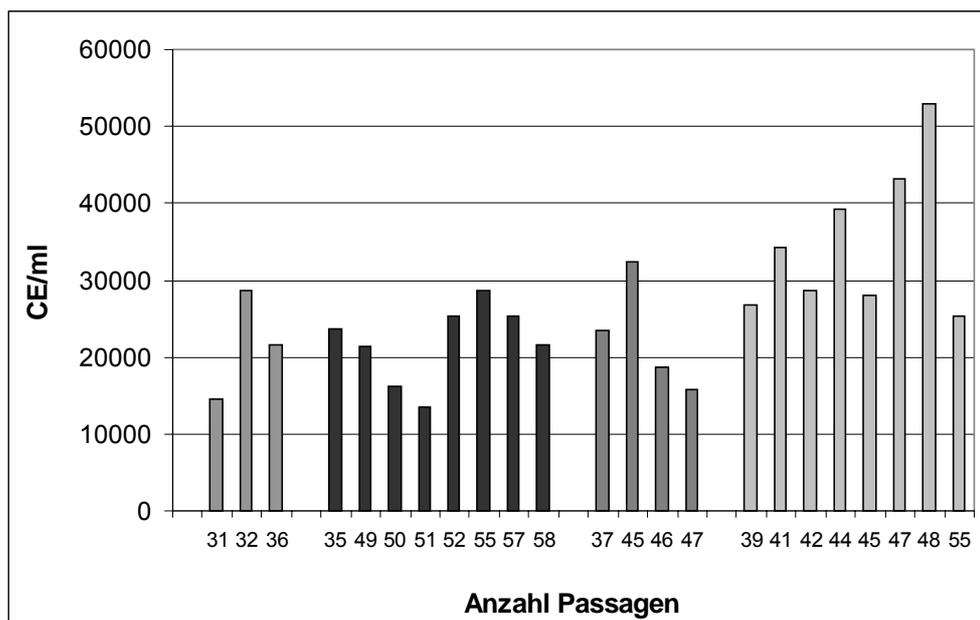


Abb. 5: Sensitivität von vier Chargen der Zelllinie BHK21-BSR/PK5/88 in Abhängigkeit von der Anzahl der Passagierungen Kulturüberstand des Referenzstammes *C. septicum* NC 547, Batch 97 FS-2

Die vier verschiedenen Zellchargen waren in unterschiedlichem Maße empfindlich gegen die zytotoxische Aktivität der Proben. Chargen 1-3 zeigten ähnliche Empfindlichkeiten (20000 CE/ml), mit Charge 4 wurden höhere Toxintiter ermittelt (25000 CE/ml).

Innerhalb der Chargen variierten die Titer deutlich (um bis 100 %), aber ohne eindeutige Tendenz zu Zu- oder Abnahme der Empfindlichkeit zwischen der 31. und der 58. Passage.

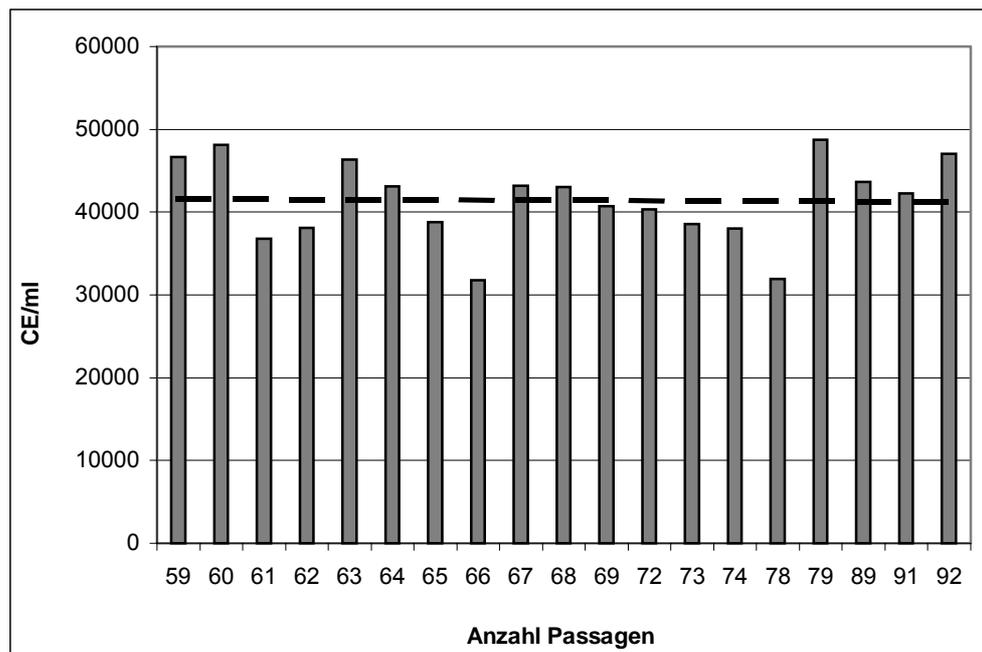


Abb. 6: Sensitivität der Zelllinie BHK21-BSR/PK5/88 in Abhängigkeit von der Anzahl der Passagierungen gegen Kulturüberstand des Referenzstammes *C. septicum* NC 547, Batch 99 FS-7/B T5P, mit Trendlinie

In Abb. 6 sind die Toxizitäten von Proben des Referenzstammes, Batch 99 FS-7/B T5P, gegen die Anzahl Passagierungen einer weiteren Charge Zellen aufgetragen. Hier wurden Zellen der gleichen Linie zwischen 59. und 92. Passage verwendet. Auch hier wurde keine Tendenz zum Nachlassen oder Ansteigen der Empfindlichkeit der Zellen beobachtet.

Der Variationskoeffizient für die Tests mit dem Toxin des Batch 99 FS-7/B T5P betrug

$$v = 11,93.$$

Konstante Bedingungen bei der Inkubation der Zellen spielten eine wichtige Rolle für das zelluläre Wachstum und die Empfindlichkeit in den Tests. Fiel der CO₂-Partialdruck in der Brutschrankatmosphäre ab, so wurden geringere Toxizitäten gemessen. Die Zellen wuchsen langsamer und zeigten eine untypische Morphologie.

3.2.3.3 Zelltoxizität von Bakterienmedien, Chromatografiepuffern, Trypsin- und Ammoniumsulfatlösungen

3.2.3.3.1 Material und Methoden

Die Komponenten der Suspensionen, in welchen das α -Toxin bei Einsatz im Zytotoxizitätstest gelöst war, mussten auf zytotoxische Eigenschaften überprüft werden. Kulturüberstände, Filtrate und Konzentrate enthielten Bestandteile der Bakterienmedien RCM oder HHB.

Während der chromatografischen Reinigung befand sich das Zytotoxin gelöst in den

Puffern des jeweiligen chromatografischen Reinigungsschrittes.

Verwendet wurden:

- ein Diethanolaminpuffer (20 mM, pH 8,9; mit und ohne 0,5 M NaCl)
- ein HEPES-Puffer (50 mM, pH 7,8; mit und ohne 0,5 M NaCl)
- ein Tris-Base-Pufferansatz (20 mM, pH 7,8; mit und ohne 0,5 M NaCl)

Die Rezepturen der Puffer sind im Anhang (S. XIII+XIV) aufgeführt. Die Chromatografiepuffer wurden unverdünnt in Zytotoxizitätstests überprüft.

Bereits gereinigtes α -toxinhaltiges Material wurde in hochkonzentrierten Ammoniumsulfatlösungen gefällt (Kap. 3.5.3.3). Zur Überprüfung der Zelltoxizität von Ammoniumsulfatlösungen wurden 3,2 M, 4 M und 5 M Ammoniumsulfatlösungen getestet.

In Kap. 3.4.6 sind Versuche zur Aktivierung des α -Toxins mit Trypsin beschrieben. Testansätze mit 0,00005 %, 0,00025 %, 0,0005 %, 0,1 %, 0,5 % und 1,0 % Anteil einer 0,05-%igen Trypsinlösung (Anhang, S. VI) wurden in auf ihre zytolytische Wirkung geprüft.

3.2.3.3.2 Ergebnisse

Tab. 3: Zelltoxische Wirkung verschiedener bei den Arbeiten verwendeter Lösungen (-/- = keine Toxizität nachgewiesen)

Substanz	Konzentration	CE/ml
Chromatografie-Puffer		
Diethanolamin A	20 mM	6
Diethanolamin B	20 mM + 0,5 M NaCl	5
HEPES A	50 mM	-/-
HEPES B	50 mM + 0,5 M NaCl	-/-
Tris-Base A	20 mM	3
Tris-Base B	20 mM + 0,5 M NaCl	-/-
Bakterienmedien		
HHB	Anhang (S. I)	2
RCM	Anhang (S. I)	-/-
Ammoniumsulfat		
	5 M	330
	4 M	179
	3,2 M	201
Trypsin		
	0,00005 %	-/-
	0,00025 %	-/-
	0,0005 %	-/-
	0,5 %	-/-
	1,0 %	-/-

In Tab. 3 sind die Zytotoxizitäten der Medien und Puffer zusammengefaßt.

Die Chromatografiepuffer und die Bakterienmedien hatten keine zytotoxische Wirkung auf Zellen der Linie BHK21-BSR/PK5/88. Die ermittelten Zytotoxizitäten lagen immer unter 7 CE/ml und waren damit vernachlässigbar.

Auch die 0,05-%ige Trypsinlösung hatte in Konzentrationen von 0,00005 %, 0,00025 %, 0,0005 %, 0,1 % und 0,5 % keine nachweisbare zytotoxische Wirkung. In den Kavitäten mit Trypsinlösung wurde eine höhere Extinktion bei 570 nm gemessen, als in Kavitäten mit den regulären Zellkontrollen.

Die Ammoniumsulfatlösungen hatten bei 3-5 molarer Konzentration eine deutlich zellschädigende Wirkung von 180-330 CE/ml.

3.2.3.4 Zeitpunkt der Toxinzugabe im Zytotoxizitätstest

MIYAMURA *et al.* (1974 a) führten die Zytotoxizitätstests mit einer simultanen Zugabe von Toxinlösung und Zellsuspension, wie oben dargestellt, durch. In den folgenden Tests sollte ermittelt werden, ob die Zugabe des Toxins in der gleichen Konzentration, aber zwei Tage nach Anwachsen der Zellen in der Testplatte, eine Änderung der ermittelten Zytotoxizitäten erbrächte.

3.2.3.4.1 Material und Methoden

In einer Testplatte wurde nach dem Standardprotokoll eine Dreifachbestimmung mit Toxinverdünnung (Referenzstamm NC 547, Batch 97 FS-2 T5) und Zellen pipettiert. Weitere drei Zeilen auf derselben Platte wurden mit je 50 µl Zellsuspension und Medium, ohne die Toxinverdünnungen, befüllt.

Die Platte wurde zur Inkubation bei 5 % CO₂-Atmosphäre in den 37 °C-Brutschrank gegeben.

Nach zwei Tagen Inkubation wurde in einer Vorverdünnungsplatte in drei Zeilen je 100 µl Medium vorgelegt und in die erste Spalte 100 µl frisch aufgetaute Toxinprobe gegeben. Die Verdünnungsreihe wurde nach Protokoll durchgeführt.

Von dem verdünnten Material wurden je 50 µl auf diejenigen Zellen in der ursprünglichen Testplatte aufgegeben, die bisher ohne Toxin gewachsen waren.

Die Testplatte wurde einen dritten Tag inkubiert, dann gefärbt und ausgewertet.

3.2.3.4.2 Ergebnisse

Für die nach Standard angelegte Probe wurde eine Zytotoxizität von 21397 CE/ml ermittelt, das nach zwei Tagen Inkubation der Zellen hinzugegebene Toxin erreichte nur einen Wert von 2311 CE/ml.

Die Standardmethode wurde beibehalten.

3.3 Produktion von α-Toxin: Fermentation und Filtration

Für die biochemischen Untersuchungen der α-Toxine beider ausgewählter *C. septicum*-Stämme und die Aufreinigung des α-Toxins von Referenzstamm NC 547 war es erforderlich, das Toxin in großen Mengen herzustellen.

Es existieren verschiedene Kulturverfahren und Techniken. Für diese Arbeit wurde eine Methode zur maximalen Toxinproduktion optimiert.

3.3.1 Auswahl des Bakterien-Nährmediums

3.3.1.1 Material und Methode

Als Kulturmedium kamen RCM und HHB in Frage (Anhang, S. I). Zunächst wurden Röhrenkulturen beider *C. septicum* Stämme in 10-ml-Glasröhrchen mit 5 ml Medium angelegt. Die Röhrchen wurden im *Anoxomat*® (MART, S. KAP. 3.1.1.2) anaerob bei 37 °C bebrütet. Nach ca. 24 h wurden sie zur Gewinnung der Kulturüberstände 20 min bei 3000 U min⁻¹ (ca. 1700 g) zentrifugiert (Zentrifuge: *Typ U III*, HERAEUS CHRIST). Der Überstand wurde in 1,5-ml-Reaktionsgefäße aliquotiert. Um bakterielles Wachstum in den Zellkulturtests zu vermeiden, war es erforderlich, die Überstände vor Eintrag in die Zellkulturtestplatten nochmals zu zentrifugieren, bei 10000 U min⁻¹ (ca. 8400 g) in einer Mikro-Zentrifuge (*Typ 00912*, HERAEUS CHRIST).

Die Überstände wurden in Zytotoxizitätstests auf toxische Aktivität überprüft. Es wurden drei Wiederholungen pro Probe durchgeführt.

3.3.1.2 Ergebnisse

Tab. 4: Zytotoxizität zweier *C. septicum*-Stämme in Röhrenkultur in verschiedenen Kulturmedien (+=geringes, +=mittleres, +++=starkes bakterielles Wachstum)

Stamm <i>C. septicum</i>	Wachstum (opt. Einschätzung)			CE/ml bei Inkubation in	
	HHB	RCM		HHB	RCM
Referenzstamm NC 547	++	+++	Mittelwert	326	<20
			Stdabw.	8	
Feldstamm 2258	+	+++	Mittelwert	31	<20
			Stdabw.	1	

Tab. 4 ist zu entnehmen, dass das Wachstum des Referenzstammes NC 547 nach optischer Einschätzung in RCM besser (die Suspension dichter) war. Die α -Toxinproduktion in HHB hingegen war mit durchschnittlich 326 CE/ml ausgeprägter als in RCM mit weniger als 20 CE/ml.

Aus dem Grund kam in der Fermentation HHB als Kulturmedium zum Einsatz.

Auch das Wachstum des Feldstammes 2258 war in RCM stärker als in HHB. Ebenso wie beim Referenzstamm wurden andererseits in HHB höhere α -Toxintiter erreicht (Mittelwert: 31 CE/ml) als in RCM (<20 CE/ml). Die vergleichsweise höhere Toxinproduktion in HHB war jedoch erst nach Toxinproduktionsbeginn experimentell nachgewiesen worden, für die Fermentation wurde RCM verwendet.

Da sich, unabhängig vom verwendeten Medium, die Toxinproduktion proportional zur Masse Bakterien verhält (GRÄSSER 1964), konnten hinreichende Toxintiter erzielt werden.

3.3.2 Vergleich der Toxinproduktion in Röhren- und Fermenterkultur

3.3.2.1 Material und Methoden

Die Röhrenkulturen wurden wie in 3.3.1.1. beschrieben angelegt.

Die Fermentation erfolgte im *Göttinger Bioreaktor*-System (BÖHNEL 1986). Im Anhang (S. VII) ist eine Skizze des Aufbaus der Apparatur wiedergegeben.

HNÁTKOVÁ *et al.* (1986) und VRANÝ *et al.* (1988) stellten eine dritte Methode der Toxinproduktion vor. Die Bakterienkultur befand sich in einem Dialyseschlauch und wurde durch das Medium, welches den Schlauch umgab, per Diffusion mit Nährstoffen versorgt. Da *C. septicum* ein schnellwachsender Keim ist, reichte die Diffusionsgeschwindigkeit der Substrate nicht aus, um eine optimale Versorgung zu gewährleisten. Zudem wirkt sich der vorgeschlagene Versuchsaufbau in erster Linie positiv auf die Ausbeute solcher Toxine aus, die nach Autolyse der Bakterienzellen ins Medium abgegeben werden. Das α -Toxin von *C. septicum* wird während des bakteriellen Wachstums sezerniert (Kap. 3.3.4).

Die Toxinproduktion für die vorliegenden Untersuchungen wurde in einem 5-l-Fermentertopf im Wasserbad durchgeführt. In einen Meßkreislauf, durch welchen die Bakteriensuspension mittels einer Zahnradschleife gepumpt wurde, waren eine Redoxelektrode und eine pH-Elektrode integriert. Die Korrektur des pH-Wertes erfolgte automatisch durch Zugabe von 2 N NaOH (KENNEDY 1976). Die Kultur wurde mit N₂ überströmt.

Der Sauerstoffpartialdruck in einer Bakteriensuspension steht in einem direkten Zusammenhang mit dem in der Lösung vorherrschenden Redoxpotenzial und damit indirekt mit der Wachstumsaktivität der Bakterien in der Suspension (JACOB 1970).

Die Bakteriensuspensionen wurden zunächst unmittelbar nach dem Umschlagpunkt des Redoxpotenzials eines Laufes geerntet, der als ein Indikator für das Ende der logarithmischen Wachstumsphase gilt.

Über ein in den Regulationskreislauf des Fermenters integriertes Probennahmesystem konnten während der Läufe Proben von 5-8 ml Suspension in 10-ml-Glasröhrchen entnommen werden.

Der Überstand des Referenzstammes stammte aus dem Batch 98 FS-6 (nichtkonzentriertes Material), die Proben des Feldstammes wurden aus verschiedenen Produktionsläufen 96 FS gewonnen.

Die Proben wurden in je drei Wiederholungen auf zytotoxische Aktivität geprüft.

Der Referenzstamm NC 547 war im Fermenter nur mit HHB-Medium inkubiert worden, der Feldstamm nur mit RCM. Zum Vergleich mit der Toxinproduktion in Röhren wurden für den Referenzstamm Proben in HHB und für den Feldstamm Proben in RCM herangezogen. Es handelte sich um dieselben Proben, die für Kap. 3.3.1 ausgewertet worden waren.

3.3.2.2 Ergebnisse

Im Fermentationsmedium selbst und zu Beginn der Fermentation nach Beimpfen mit Starterkultur wurden Redoxpotenziale ≥ 0 mV gemessen. Nach Anwachsen der *C. septicum*-Kultur begann das Redoxpotenzial zu sinken. Damit gingen eine zunehmende Trübung der Suspension und, falls der pH-Wert nicht reguliert wurde, ein Absinken des pH einher. Schließlich stagnierte das Redoxpotenzial, bei Werten zwischen -200 mV und -500 mV. Nach einer kurzen Plateauphase kam es zu einem

schnellen Wiederanstieg des Redoxpotenzials. Die Plateauphase kennzeichnete den Umschlagpunkt des Wachstums der Kultur (NORRIS und RIBBENS 1970) und damit den vorläufigen Erntezeitpunkt.

Auch der pH-Wert stieg am Umschlagpunkt in basische Bereiche bis pH 7,5 – 7,8. Kurze Zeit nach dem Umschlagpunkt sank er wieder auf den regulierten Wert von 7,2.

Die Toxinausbeuten sind in Tab. 5 angegeben.

Tab. 5: Toxische Aktivität (CE/ml) in Suspensionsüberständen von Fermenter- und Röhrenkulturen im Vergleich

Stamm <i>C. septicum</i>	Medium		CE/ml bei Inkubation in	
			Röhrchen	Fermenterbatch
Referenzstamm NC 547	HHB	Mittelwert	326	3522
		Standardabw.	8	634
Feldstamm 2258	RCM	Mittelwert	<20	3693
		Standardabw.		146

Für beide Stämme wurden in den Fermenterbatchkulturen mit 3522 bzw. 3693 CE/ml deutlich höhere Titer gefunden, als in Röhrenkulturen. Der Referenzstamm NC 547 produzierte im Fermenter 10 mal soviel Toxin wie im Röhrchen. Für den Feldstamm lag das Verhältnis noch höher.

Die optische Einschätzung der Wachstumsdichte in den Proben bestätigte den Eindruck intensiveren Wachstums im Fermenter.

3.3.3 Die Toxinproduktion im Fermenter in kontinuierlicher Kultur

Der Fermenter kann als kontinuierliche Kultur (BÖHNEL 1986, ROTH 1986) unter ständiger Zugabe frischen Mediums und ständiger Ernte von Bakteriensuspension betrieben werden. Hierbei wird ein Gleichgewichtszustand der Kultur in der Phase exponentiellen Wachstums angestrebt. Die Kultur darf einerseits nicht ausgewaschen werden. Das geschieht, wenn die Menge geernteter Bakterien die Menge übersteigt, die durch bakterielles Wachstum ersetzt werden kann. Wird andererseits zu wenig geerntet, so kann es zu einem „Umkippen“ der Kultur kommen. Die Nährstoffe im Medium sind verbraucht und die Bakteriensuspension tritt in die stationäre Phase des Wachstums ein.

Die Ernte erfolgt über ein in den Fermentertopf gesenktes Rohr, das bis zum erwünschten Suspensionspegel reicht. Von diesem Ernterohr wird über Schlauchpumpen kontinuierlich oder in Intervallen geerntet. So ist technisch gewährleistet, dass der Fermentertopf nicht ungewollt vollständig entleert wird. Übersteigt der Mediumzulauf nicht die Abpumpkapazität, kann der Topf nicht vollaufen. Die kontinuierliche Zugabe des Mediums wird gestartet, sobald nach Anwachsen der Bakterienkultur das Redoxpotenzial nicht weiter fällt. pH-Wert und Inkubationstemperatur werden ständig gemessen und reguliert.

Letzteres gilt auch für den anderen Modus, die Fermenterkultur als statische, sogenannte Batchkultur zu betreiben. Hier wird im Fermentertopf eine Starterkultur der Bakteriensuspension bis zum exponentiellen Wachstum angezogen und dann eine große Menge Medium hinzugegeben. Danach erfolgt keine weitere Zugabe von Substraten. Das Wachstum in der Batchkultur wird durch Messung des Redoxpotenzials

kontinuierlich verfolgt und nach Wiederanstieg des Redoxpotenzials die gesamte Bakteriensuspension geerntet.

Wird bei der Ernte eine geringe Menge Bakteriensuspension im Fermentertopf, bzw. im Schlauchsystem des Messkreislaufes, belassen, so kann sie bei erneuter Mediumzugabe als Inokulum dienen. Diese Variante der Fermenterkultur wird als diskontinuierliche Kultur bezeichnet (MEINERS 1990). Die Wachstumskurve in den einzelnen Produktionsintervallen gleicht der Kurve einer statischen Kultur.

3.3.3.1 Material und Methoden

Die Toxinproduktion im kontinuierlichen Modus der Fermenterkultur wurde für beide Stämme *C. septicum* getestet (pH 7,2, 37 °C; Medien: HHB für *C. septicum*, Referenzstamm NC 547, RCM für *C. septicum*, Feldstamm 2258).

Die kontinuierliche Kultur wurde mittels einer Schlauchpumpe (*minipuls 2*, GILSON MEDICAL ELECTRONICS) mit 200 ml Medium pro Stunde versorgt. Die Proben wurden über das Probenentnahmesystem direkt aus der Bakteriensuspension entnommen. Für den Referenzstamm NC 547 wurde eine kontinuierliche Kultur über 11 Tage verfolgt. Am ersten Tag erfolgte eine Probennahme 3 h nach Anwachsen der Kultur, eine weitere Probennahme nach dem Umschlagpunkt des Redoxpotenzials und Start der kontinuierlichen Mediumzugabe und eine dritte Probennahme 3 h nach dem Umschlagpunkt. Am zweiten Tag wurden 10 Proben in Abständen von ca. einer Stunde genommen. An den folgenden 9 Tagen wurden jeweils ein bis drei Proben entnommen, am Mittag, bzw. morgens und abends bzw. morgens, mittags und abends.

Die kontinuierliche Kultur des Feldstammes 2258 wurde nur über einen Zeitraum von 6 h verfolgt, die erste Probe wurde 2 h vor dem Umschlagpunkt des Redoxpotenzials entnommen, die übrigen Proben wurden ab dem Umschlagpunkt in Abständen von einer Stunde genommen.

Alle Proben wurden auf den Zytotoxingehalt getestet.

3.3.3.2 Ergebnisse

Die Ergebnisse der Zytotoxizitätstests für den Referenzstamm NC 547 sind in Abb. 7 dargestellt. Der Start der kontinuierlichen Mediumzugabe ist durch einen Pfeil im Diagramm angezeigt.

Proben 3-8 zeigen eine im Mittel mit 1209 CE/ml deutliche höhere Toxizität als die Proben 9-30 (mittlere Toxizität: 756 CE/ml). Die Toxizität in den Proben blieb somit nach Start der kontinuierlichen Kultur für ca. 20 h hoch und fiel dann auf ein geringeres Niveau ab. Alle Proben enthielten weniger Toxin, als die Proben desselben Stammes aus der diskontinuierlichen Produktion (Tab. 5) mit durchschnittlich 3522 CE/ml.

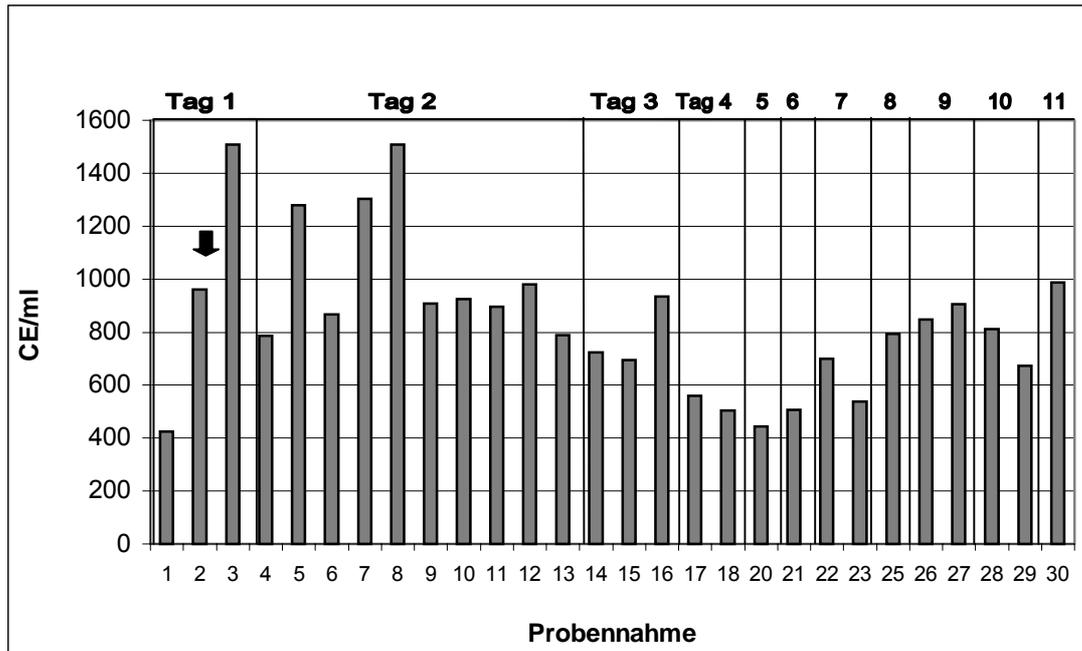


Abb. 7: Zytotoxingehalt in Proben eines Fermenterlaufes in kontinuierlicher Kultur mit *C. septicum*, Referenzstamm NC 547

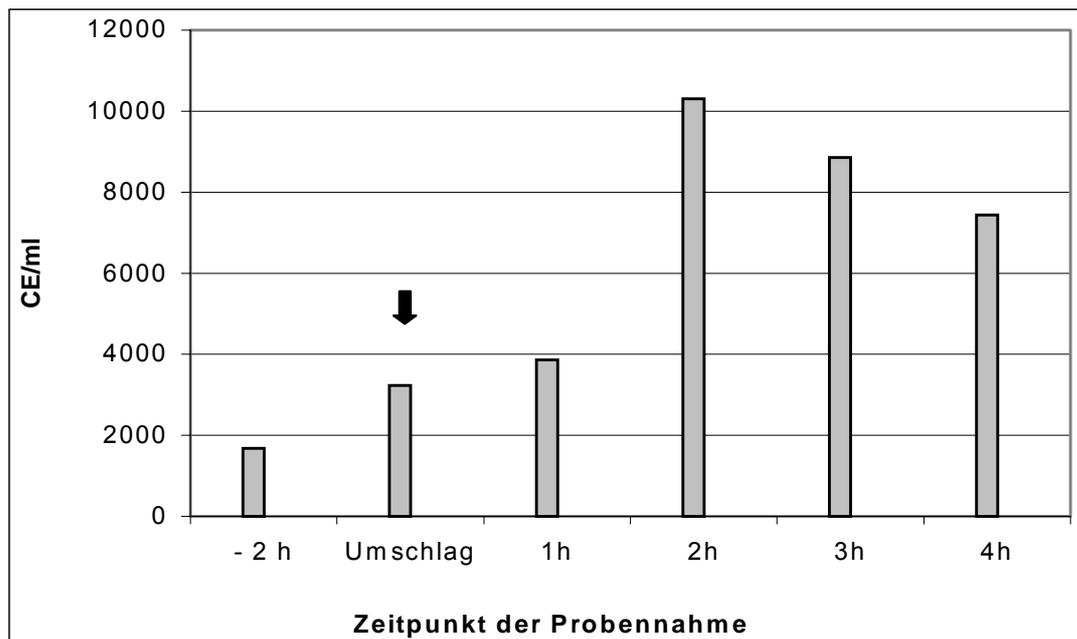


Abb. 8: Zytotoxingehalt in Proben eines Fermenterlaufes in kontinuierlicher Kultur mit *C. septicum*, Feldstamm 2258

In Abb. 8 ist die Zytotoxizität der Proben des Feldstammes 2258 in kontinuierlicher Kultur dargestellt. Zu erkennen ist, dass die Toxizität der entnommenen Proben zwei Stunden nach dem Start der kontinuierlichen Mediumzugabe (Pfeil) ein Maximum erreicht. Danach fällt sie wieder ab.

Die Zytotoxizitätstests wurden noch nicht nach der Standardmethode durchgeführt, daher sind die Werte höher als Vergleichswerte für Fermenterproben desselben Stammes in diskontinuierlicher Kultur mit 3693 CE/ml (Kap. 3.3.2).

Die kontinuierliche Kultur erforderte eine intensive Überwachung. Zudem musste die Ernte bis zum Start der Filtration gekühlt werden (Kap. 3.3.6). Wegen der geringen Zulauftrate handelte es sich um Zeiträume von vielen Stunden.

Zur Produktion großer Mengen an Bakteriensuspension mit maximaler Toxinproduktion wurde im Folgenden das Fermentationsverfahren des *Göttinger Bioreaktors* in diskontinuierlicher Kultur angewendet.

3.3.4 Optimierung des Erntezeitpunktes

Die Produktion von α -Toxin korrespondiert mit dem bakteriellen Wachstum (BALLARD *et al.* 1992, GRÄSSER 1964). In der lag-Phase sind geringe Toxinkonzentrationen zu erwarten, in der logarithmischen Phase steigt die Konzentration an α -Toxin. In der Plateauphase wird kontinuierlich α -Toxin produziert. Das Toxin hat jedoch bei den herrschenden Temperaturen um 37 °C eine geringe Lebensdauer. So musste ein idealer Erntezeitpunkt gefunden werden, an welchem die größte Menge α -Toxin produziert worden war und die geringste Menge wieder an Aktivität verloren hatte.

3.3.4.1 Material und Methoden

Mit beiden *C. septicum*-Stämmen wurden Produktionsintervalle in diskontinuierlicher Kultur bei 37 °C durchgeführt. Der Referenzstamm NC 547 wurde in HHB inkubiert. Die erste Probennahme erfolgte 2 h nach Zugabe des Mediums zur Starterkultur. Bis 3,5 h nach dem Umschlagpunkt des Redoxpotenzials wurden stündlich Proben entnommen. Eine weitere Probe wurde 19 h nach dem Umschlagpunkt genommen. Alle Proben wurden in drei Wiederholungen getestet.

Der Feldstamm 2258 wurde in RCM inkubiert. Die Probennahme wurde ebenfalls 2 h nach Mediumzugabe gestartet und stündlich bis 2 h nach dem Umschlagpunkt des Redoxpotenzials fortgesetzt. Am nächsten Tag, 20 h nach dem Umschlagpunkt, wurde eine weitere Probe entnommen.

Die Zytotoxizitätstests mit den Proben des Feldstammes waren noch nicht nach dem Standardprotokoll durchgeführt worden. Jede Probe wurde einmal getestet.

3.3.4.2 Ergebnisse

Die wachsenden Kulturen beider Stämme enthielten zu jedem Zeitpunkt der Probennahme toxische Aktivität.

In Abb. 9 sind die Toxizitäten der Proben des Referenzstammes NC 547 aufgeführt. Der Toxingehalt in den Proben stieg nach dem Umschlag des Redoxpotenzials (ca. 1600 CE/ml) noch einmal deutlich an auf 3260 CE/ml, ein Niveau, das etwa 2 h nach Umschlag erreicht und bis mindestens 3,5 h nach dem Umschlagpunkt gehalten wurde. 19 h nach dem Umschlagpunkt war eine sehr viel geringere Toxizität zu messen.

Für *C. septicum* Referenzstamm NC 547 wurde auf Grund dessen die Ernte der diskontinuierlichen Fermenterproduktionsläufe zur Toxinproduktion eine Stunde nach Umschlag des Redoxpotenzials vorgenommen.

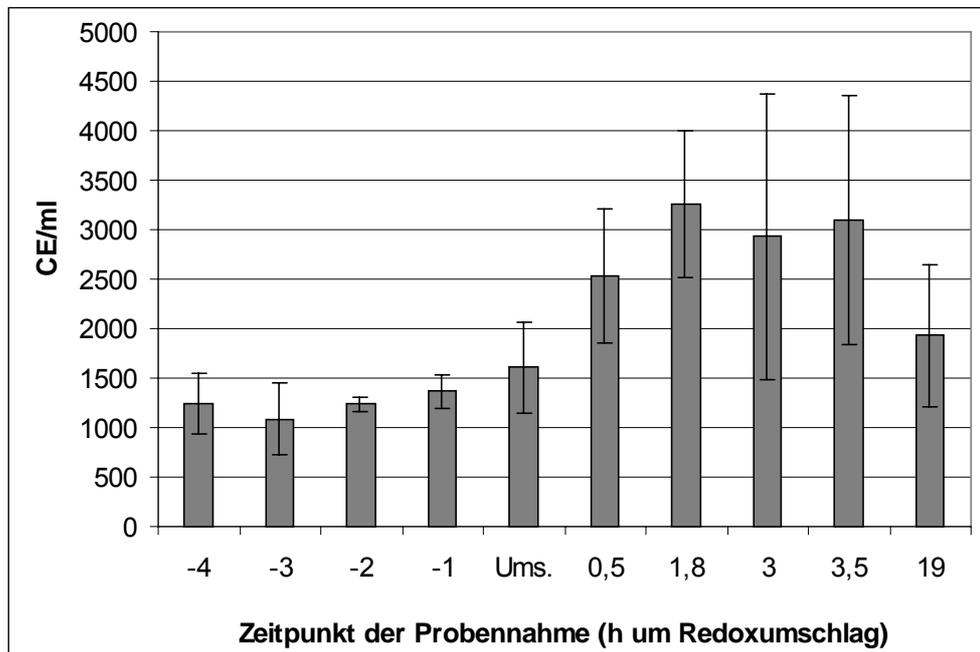


Abb. 9: Zytotoxingehalt in Proben eines diskontinuierlichen Fermentationsprozesses mit *C. septicum*, Referenzstamm NC 547

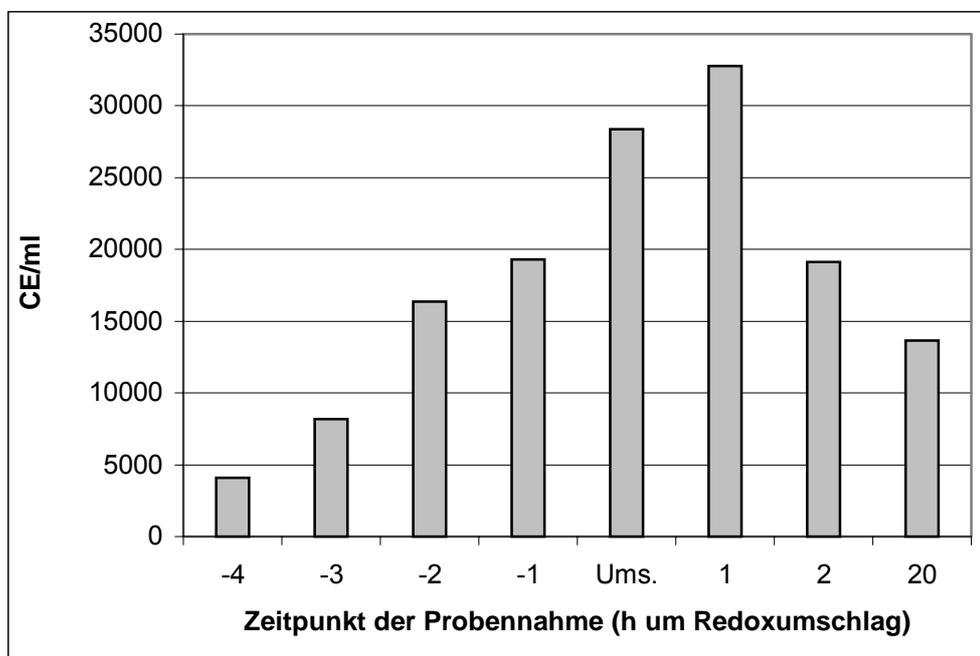


Abb. 10: Zytotoxingehalt in Proben eines diskontinuierlichen Fermentationsprozesses mit *C. septicum*, Feldstamm 2258

Auch bei den Fermentationsläufen des Feldstammes (Abb. 10) war ein weiteres Ansteigen der Toxizität von 28 384 auf 33 768 CE/ml in der ersten Stunde nach dem Redoxumschlagpunkt zu erkennen. Bereits zwei Stunden nach Umschlag jedoch war

die Toxizität wieder unter 20 000 CE/ml gesunken und fiel bis 20 h nach Umschlag auf 13653 CE/ml.

Die Ernte der Produktionsintervalle des Feldstammes *C. septicum* 2258 wurde im Folgenden eine Stunde nach Umschlag des Redoxpotenzials vorgenommen.

3.3.5 Optimierung des pH-Wertes

3.3.5.1 Material und Methoden

Mit dem Referenzstamm NC 547 wurden Produktionsintervalle in einem pH-Spektrum von pH 7,0 bis pH 7,5 und mit dem Feldstamm *C. septicum* 2258 mit pH-Werten von pH 6,0 bis pH 9,0 in Schritten von 0,2 pH durchgeführt.

60 min nach Umschlag des Redoxpotenzials am Ende eines jeden Produktionsintervalles wurde jeweils eine Probe der Bakteriensuspension genommen, aliquotiert und dreimal auf Zytotoxizität getestet.

3.3.5.2 Ergebnisse

Aus Abb. 11 ist zu entnehmen, dass die Ausbeute an aktivem α -Toxin des Referenzstammes NC 547 in diskontinuierlicher Kultur bei einem pH von 7,2 am höchsten war.

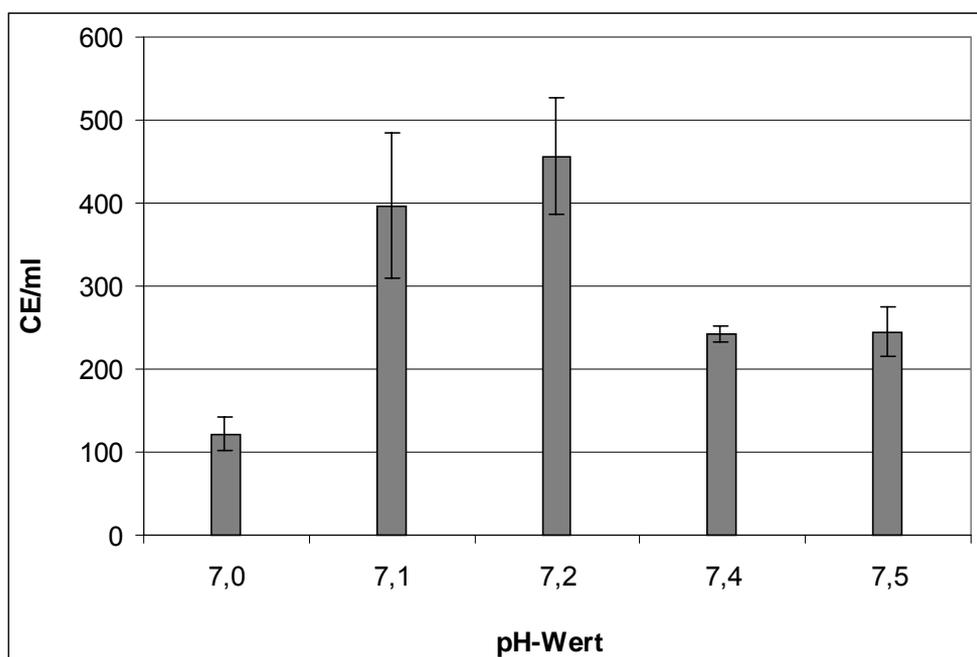


Abb. 11: Zytotoxingehalt in Proben von *C. septicum*, Referenzstamm NC 547 aus diskontinuierlicher Fermenterkultur bei verschiedenen pH-Werten

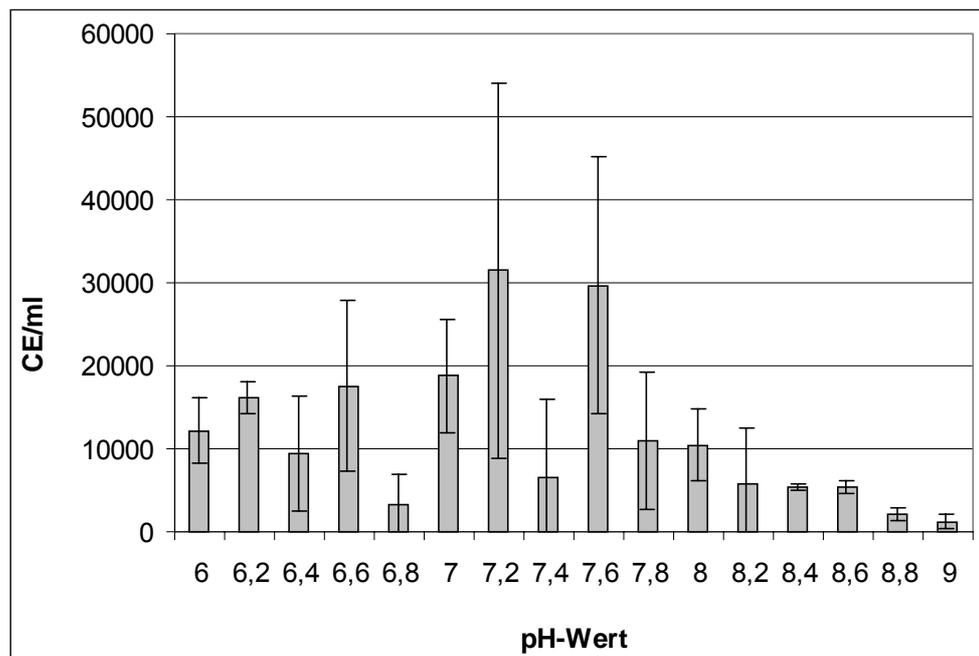


Abb. 12: Zytotoxingehalt in Proben von *C. septicum*, Feldstamm 2258, aus diskontinuierlicher Fermenterkultur bei verschiedenen pH-Werten

In Abb. 12 ist ein Maximum der Toxinproduktion durch den Feldstamm 2258 bei pH 7,2 zu erkennen. Wurde die Fermentation bei pH-Werten > 8 durchgeführt, so wurde eine verringerte α -Toxinausbeute ermittelt und ein nach optischer Einschätzung vermindertes bakterielles Wachstum erreicht. Bei pH-Werten unter pH 6 kam es nicht zum Anwachsen der Kultur.

Im Vergleich zu Produktionsläufen bei pH 7,2 und pH 7,6 wurde bei pH 7,4 eine sehr niedrige Toxizität ermittelt.

3.3.6 Filtration der Kulturüberstände

3.3.6.1 Material und Methoden

In den vorliegenden Arbeiten waren die Filter des verwendeten Cross-Flow-Filtrationssystems über ein steriles Schlauchsystem miteinander und mit dem Fermenter verbunden, s. Skizze im Anhang (S. VIII). Es handelte sich um zwei in Reihe angelegte Rezirkulationssysteme. Die Suspension wurde tangential mit einem durch vorgeschaltete Schlauchpumpen erzeugten Druck an den asymmetrischen Filtrationsmembranen (SAIER und STRATHMANN 1975) vorbeigeführt.

Im ersten Filtrationsschritt wurden die Bakterien mit einem FRESENIUS-9000-Filter mit einer Trenngrenze von 1 Mio Da vom Überstand getrennt. Das Filtrat wurde in einem zweiten Schritt durch einen Filter der Firma SARTORIUS (*Ultrasart SM 30145* 4901 E* Cellulosetriacetat) mit einer Abscheidengrenze von 30 kDa aufkonzentriert.

Der Filtrationsaufbau ermöglichte ein steriles Rückspülen mit H₂O bidest..

Filtrierte wurden die Kulturüberstände von drei Produktionsintervallen bzw. Serien von Produktionsintervallen mit dem Referenzstamm *C. septicum* NC 547 (HHB) und zwei Produktionsintervallen mit Feldstamm 2258 (RCM). Die Filtration erfolgte unter Kühlung der Toxinlösungen im Kühlbad (ca. 4 °C). Von den Konzentraten wurden Proben abgenommen und bei -80 °C eingefroren.

Für den Referenzstamm wurden Proben aus den Produktionsintervallen vor und nach der Filtration auf ihre toxische Aktivität geprüft, um gegebenenfalls Verluste an zytotoxischer Aktivität durch Filtration nachweisen zu können.

3.3.6.2 Ergebnisse

Das in diskontinuierlicher Fermenterkultur gewonnene Toxinmaterial ist in Tab. 6 charakterisiert.

Tab. 6: Toxinproduktion in diskontinuierlicher Kultur mit zwei verschiedenen Stämmen *C. septicum*

Name des Batch	Bakterienstamm	Verfahren	mittlere Toxizität (CE/ml)	Medium
97 FS-2 T5	Referenzstamm NC 547	Filtriert und Konzentriert (1:13)	25544l	HHB
98 FS-6 T5	Referenzstamm NC 547	Filtriert und Konzentriert (1:13)	46125	HHB
99 FS-7/B T5 Pool	Referenzstamm NC 547	Filtriert und Konzentriert (1:12)	41698	HHB
96 FS-3	Feldstamm 2258	Filtriert	1118	RCM
96 FS-8	Feldstamm 2258	Filtriert	4848	RCM

Das reine α -Toxin hat eine Aktivität von 25 000 CE/mg (Kap. 3.5.4.3). Die Ausbeute der Fermentationsläufe 99 FS-7/B betrug dem zu Folge durchschnittlich 110 mg reines α -Toxin/l Bakteriensuspension.

Die Filtration führte nicht zu Verlusten an zytotoxischer Aktivität des Referenzstammes NC 547.

3.4 Eigenschaften des α -Toxins

Insbesondere im Zuge der chromatografischen Aufreinigung wurde das α -Toxin einer Vielzahl von Bearbeitungsschritten unterzogen. Der Erhalt der zytotoxischen Aktivität in Abhängigkeit von Lagerungstemperatur, -dauer und -medium wurde überprüft. Das Ausmaß der Verluste durch Einflüsse bei Lyophilisation und Filtration wurde quantifiziert.

3.4.1 Material

Falls nicht anders erwähnt, wurde für alle Untersuchungen filtrierter Kulturüberstand aus einem Fermenterbatch des Referenzstammes NC 547 (97 FS-2 T5; mittlere Toxizität: 25544 CE/ml) und einem Fermenterbatch des Feldstammes 2258 (96 FS-8; mittlere Toxizität 4848 CE/ml) verwendet (Tab. 6).

Es ist zu beachten, dass es sich bei dem Material des Referenzstammes um eine durch Cross-Flow-filtration konzentrierte Proteinlösung handelte, wohingegen der Kulturüberstand des Feldstammes nicht konzentriert worden war. Die Konzentration einer Proteinlösung kann sich auf das Verhalten der einzelnen Komponenten auswir-

ken, da eine höhere Dichte an Proteinen sich in der Regel stabilisierend auf den Konformationszustand auswirkt (SCOPES 1994).

3.4.2 Lagerung des α -Toxins

3.4.2.1 Lagerung bei Temperaturen über 0 °C

3.4.2.1.1 Methoden

Für den Versuch wurden je ein Probe des Referenzstammes und eine Probe des Feldstammes aufgetaut. Von den Proben (ca. 1,2 ml) wurden 150 μ l in jeweils sechs 0,5-ml-Reaktionsgefäße (SARSTEDT) pipettiert. Die Lagerung erfolgte im Kühlschrank (+8 °C), bei Raumtemperatur (+20 °C) und im Brutschrank bei 37 °C. Je ein Satz Proben wurde für eine Stunde, ein weiterer Satz für 24 Stunden gelagert.

Die Proben wurden anschließend bis zum Einsatz im Zytotoxizitätstest bei -26 °C eingefroren. Die Lagerungsansätze wurden in dreifacher Wiederholung durchgeführt.

3.4.2.1.2 Ergebnisse

In Abb. 13 sind die Ergebnisse mit Standardabweichungen dargestellt. Zum Vergleich wurden die mittleren Toxizitäten der verwendeten Toxine ohne besondere Lagerung herangezogen (Kap. 3.4.1).

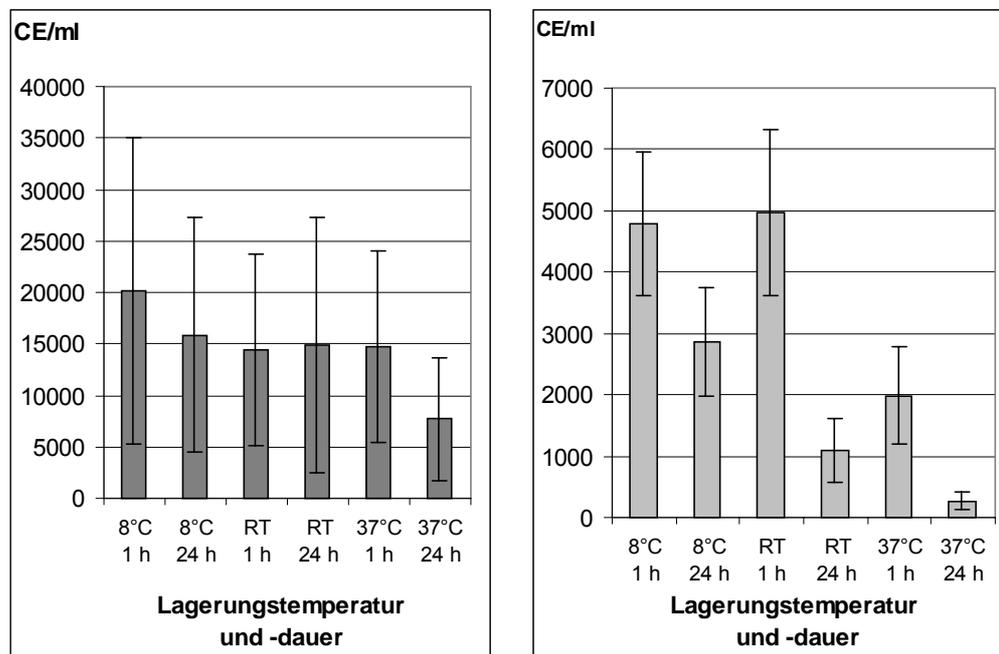


Abb. 13: Lagerung α -toxinhaltiger Kulturüberstände von *C. septicum*, Referenzstamm NC 547 (links) und Feldstamm 2258 (rechts) bei Temperaturen über 0 °C

Das Toxin des Referenzstammes hatte bereits nach einstündiger Lagerung im Kühlschrank 20 % seiner Aktivität verloren. Nach 24 h waren 40 % der Aktivität verloren gegangen.

Bei Raumtemperatur betragen die Verluste nach einer Stunde bereits 40 % und verringerten sich in den folgenden 24 h nicht mehr. Die Lagerung bei 37 °C führte zu Verlusten von 40 % nach einer Stunde und ca. 70 % nach 24 h.

Das Toxin des Feldstammes hatte nach einer Stunde Lagerung im Kühlschrank noch keine Aktivität verloren, enthielt aber nach 24 h nur noch ca. 60 % der ursprünglichen Aktivität. Auch die einstündige Lagerung bei Raumtemperatur führte nicht zu Toxizitätsverlusten. Nach 24 h wurden jedoch nur noch 20 % der ursprünglichen Toxizität gefunden. Lagerung bei 37 °C führte bereits nach einer Stunde zu Verlusten von 60 %, nach 24 h wurden weniger als 10 % der Ausgangstoxizität wiedergefunden.

3.4.2.2 Lagerung bei Temperaturen unter 0 °C

Der kryohydratische Punkt vieler Salze liegt zwischen -20 °C und -30 °C (SCOPES 1994). An diesem Punkt kann es zu Sprüngen des pH-Wertes kommen, wenn die Pufferkomponenten bei unterschiedlichen Temperaturen in die feste Phase übergehen (BRDIČKA 1988). Es wurde überprüft, ob eine Lagerung der Proben im gefrorenen Zustand über ca. 15 Wochen einen Einfluss auf die Toxizität einer Probe hatte.

3.4.2.2.1 Methoden

Toxin des Referenzstammes NC 547 wurde aufgetaut und vier mal fünf Proben à 150 µl in 0,5-ml-Reaktionsgefäße abgefüllt. Je ein Satz von 5 Proben wurde bei -18 °C, bei -26 °C und bei -80 °C erneut eingefroren. Ein weiterer Satz Proben wurde bei +8 °C gelagert. Die Lagerung erfolgte über einen Zeitraum von bis zu 108 Tagen. Die Toxizität in Abhängigkeit von Lagerungstemperatur und -dauer wurde in Zytotoxizitätstests ermittelt.

3.4.2.2.2 Ergebnisse

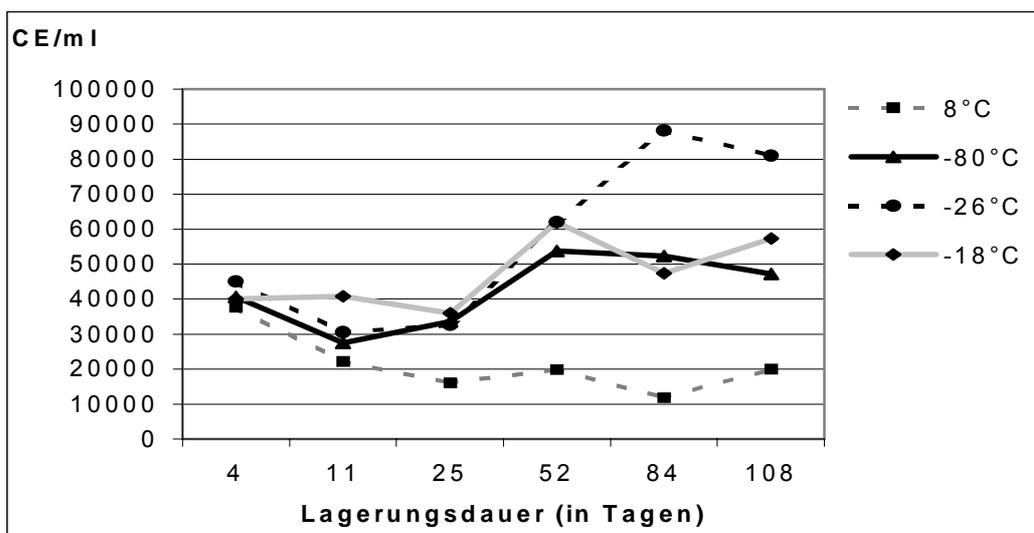


Abb. 14: Lagerung toxinhaltigen Kulturüberstandes von *C. septicum*, Referenzstamm NC 547, im gekühlten Zustand und bei verschiedenen Temperaturen unter 0 °C

Das Toxin zeigte in fast allen Tests deutlich höhere Toxizität als die zuvor für das Material im Durchschnitt ermittelten 25544 CE/ml. Die Lagerung im Kühlschrank führte zu einem Toxizitätsverlust von ca. 50 % zwischen dem 4. und 11. Tag. Die gemessene Toxizität verblieb dann auf einem Niveau von ca. 20000 CE/ml. In allen Tests wurde in den bei +8 °C gelagerten Proben am wenigsten Toxizität gefunden.

Wurde das Toxin bei -18 °C gelagert, so blieb die toxische Aktivität bis zum 25. Lagerungstag konstant bei ca. 40 000 CE/ml, dann erfolgte ein Anstieg der gemessenen Werte auf 50 000-60 000 CE/ml ab dem 52. Tag.

Die Lagerung bei -80 °C führte zu einer Verringerung der Toxizität von 40000 auf ca. 30000 CE/ml am 4. Tag. Danach wurden wieder höhere Toxintiter ermittelt, sie lagen zwischen dem 52. und dem 108. Tag um 50000 CE/ml.

Die bei -26 °C gelagerten Proben verhielten sich bis zum 52. Lagerungstag wie die bei -80 °C gelagerten Proben. Danach wurde eine Erhöhung des nachgewiesenen Toxintiters auf ca. 80000 CE/ml beobachtet.

Auf Grund der Versuchsergebnisse wurden die Proben über kurze Zeiträume bei -26 °C aufbewahrt. Aufbewahrung über mittelfristige Zeiträume erfolgte bei -80 °C.

3.4.2.3 Langzeitlagerung

3.4.2.3.1 Methoden

Die Lagerfähigkeit des Toxinmaterials von Stamm NC 547 (Fermenterbatch 97 FS-2 T5) wurde über einen Zeitraum von elf Monaten und von Proben des Stammes 2258, Fermenterbatch 96 FS-8, über zehn Monate hinweg auf Zytotoxizität getestet.

Die Überstände waren bei -80 °C gelagert worden.

3.4.2.3.2 Ergebnisse

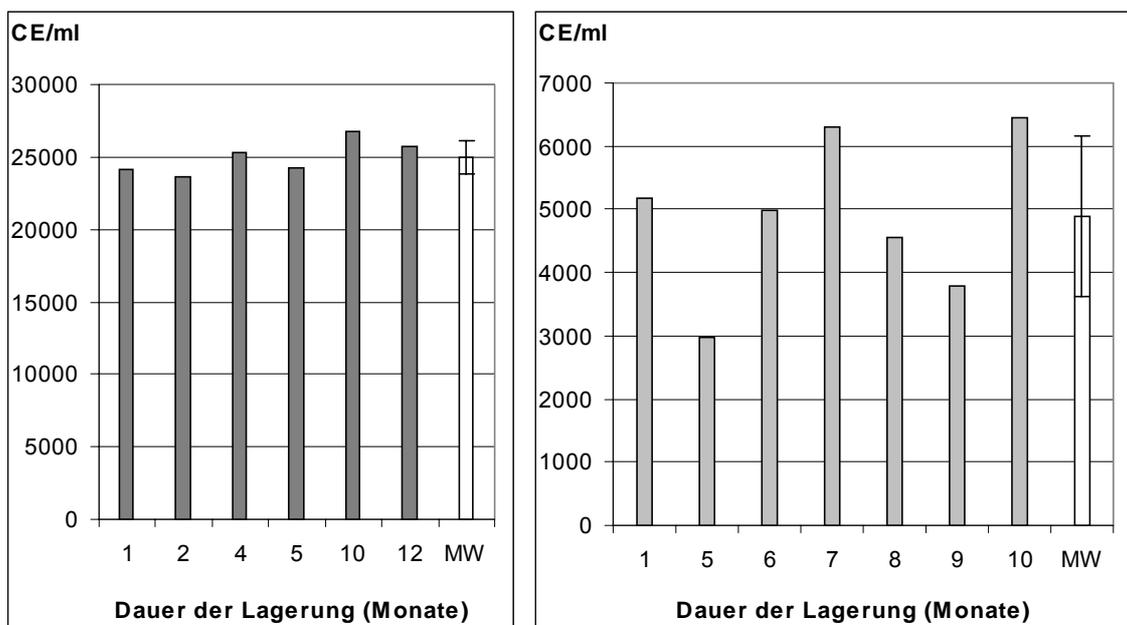


Abb. 15: Erhalt der Zytotoxizität einer Charge α -toxinhaltigen Kulturüberstandes von *C. septicum* Referenzstamm NC 547 (links) bei Lagerung bei -80 °C über 12 Monate und Feldstamm 2258 (rechts) bei Lagerung bei -80 °C über 10 Monate; Mittelwert (MW) und Standardabweichung jeweils rechte Säule

Der Überstand des Referenzstammes NC 547 zeigte bei Lagerung in $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ über ein Jahr konstante Toxizität mit geringen Abweichungen zwischen den Tests (Abb. 15). Die Toxizität des Feldstammes 2258 blieb ebenfalls über 10 Monate erhalten. Zwischen den einzelnen Tests traten höhere Standardabweichungen auf, als bei den Proben des Referenzstammes.

3.4.2.4 Lagerung in verschiedenen Resuspensionslösungen

3.4.2.4.1 Material und Methoden

Um bei der Ionenauschromatografie eine effektive Bindung des α -Toxins an das Säulenmaterial zu ermöglichen, war es notwendig, dass die Toxinlösung eine Leitfähigkeit von weniger als $1,5\text{ mS/cm}$ aufwies.

Da Bakterienmedien auf Grund der enthaltenen Salze wesentlich höhere Leitfähigkeiten haben, sollte bei der Filtration und Konzentration des Materials mit salzarmen oder salzfreien Resuspensionslösungen rückgespült werden, die ihrerseits keine toxinschädigende Auswirkungen haben durften.

Der Diethanolaminpuffer war derjenige Puffer, mit welchem der erste chromatografische Reinigungsschritt durchgeführt wurde. Die Verwendung von Phosphatpuffern zur Aufnahme von Proteinlösungen ist verbreitet. Destilliertes Wasser wurde getestet, weil man sich davon die geringsten Salzgehalte im Filtrat nach dem Rückspülen versprach.

Die Proben des Referenzstammes NC 547 wurden in Diethanolaminpuffer ohne NaCl (Anhang, S. VIII), in Phosphatpuffer (Anhang, S. VII) und in H_2O bidest. 1:100 verdünnt ($50\text{ }\mu\text{l}$ Toxinlösung + $4950\text{ }\mu\text{l}$ Lösungsmittel), aliquotiert und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren. Sie wurden in kurzem Abstand viermal in Zytotoxizitätstests untersucht.

Die Puffer und das Wasser wurden vor der Verdünnung durch einen Filtropur S Plus Sterilfilter mit $0,2\text{ }\mu\text{m}$ Porendurchmesser sterilfiltriert.

3.4.2.4.2 Ergebnisse

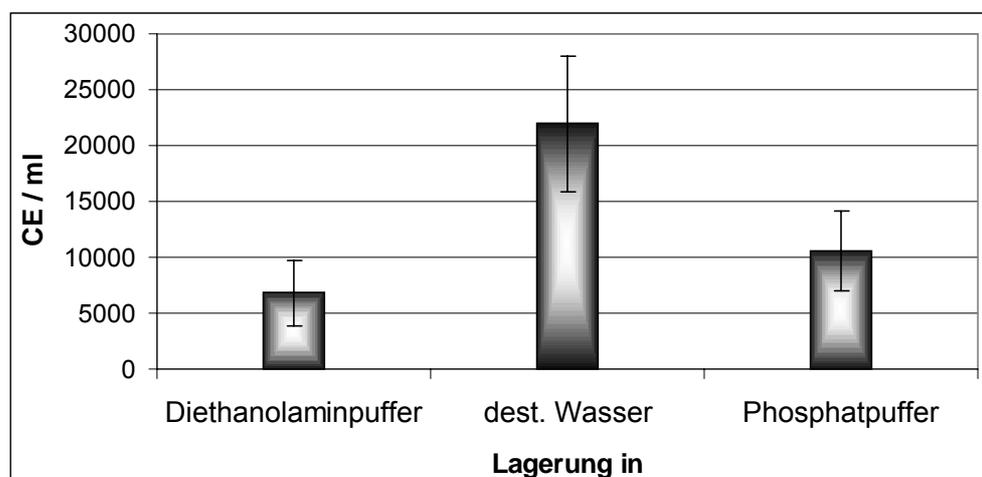


Abb. 16: Erhalt der Zytotoxizität einer Charge α -toxinhaltigen Kulturüberstandes von *C. septicum* Referenzstamm NC 547 bei Lagerung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ in verschiedenen Resuspensionslösungen

Nach Lagerung des Toxins in destilliertem Wasser wurden die höchsten Toxizitäten (ca. 22 000 CE/ml) ermittelt (Abb. 16). Eine im Vergleich dazu um 50 % reduzierte Toxizität wurde in den in Phosphatpuffer gelagerten Proben nachgewiesen und die in Diethanolaminpuffer aufbewahrten Proben enthielten nur 30 % der Toxizität der in Wasser gelösten Proben.

H₂O bidest wurde als Rückspüllösung für die Filtration und Konzentration von Toxinpräparationen, die chromatografisch aufgereinigt werden sollten, gewählt.

3.4.3 Effekt des wiederholten Auftauens und Einfrierens

Während des Auftauens und Einfrierens einer Lösung ändern sich die physikalischen Gegebenheiten in der Lösung. Ob diese Vorgänge eine toxinschädigende Wirkung haben, sollten nachstehende Untersuchungen klären.

3.4.3.1 Methoden

Vom Material des Referenzstammes NC 547 und des Feldstammes 2258 wurde je eine Probe von ca. 1,2 ml im 37-°C-Wasserbad aufgetaut. Die Proben wurden 10-15 min im Wasserbad belassen. Innerhalb dieses Zeitraumes waren sie vollständig aufgetaut. Dann wurden 200 µl abgenommen und das Ausgangsmaterial sowie das abgenommene Material erneut bei -80 °C eingefroren. Nach jeweils 1-3 Stunden wurde das Material im Ausgangsgefäß wieder aufgetaut, erneut eine Probe von 200 µl abgenommen und wieder eingefroren.

Insgesamt wurden je Stamm fünf Proben getestet, die ein- bis fünfmal aufgetaut worden waren. Zum Vergleich wurden jeweils frische Proben mitgetestet.

Die vollständigen Ansätze wurden je Stamm dreimal wiederholt.

3.4.3.2 Ergebnisse

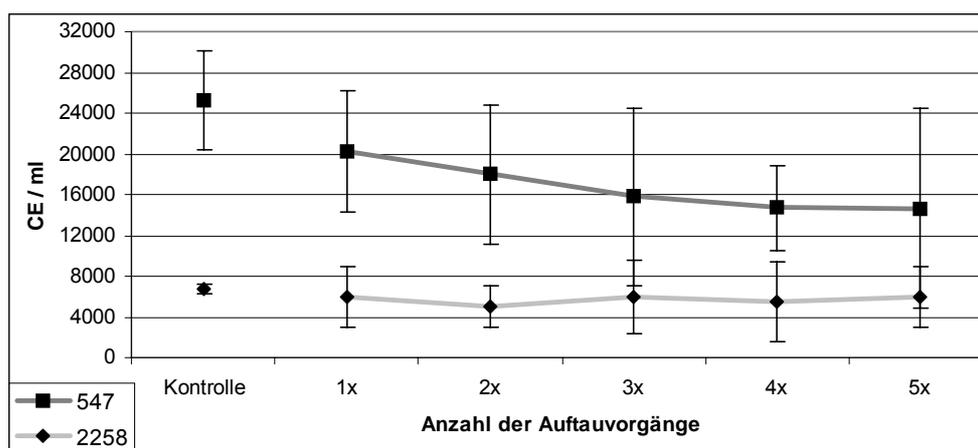


Abb. 17 : Erhalt der Zytotoxizität α -toxinhaltigen Kulturüberstandes von *C. septicum*, Referenzstamm NC 547 und Feldstamm 2258, nach wiederholtem Auftauen und Wiedereinfrieren

Für den Referenzstamm NC 547 war zunächst ein deutlicher Verlust um ca. 20 % der toxischen Aktivität nach einmaligem Auftauen zu erkennen. Nach weiterem Absinken erreichte die toxische Aktivität ab dem dritten Auftauvorgang ein konstantes Niveau von ca. 15000 CE/ml.

Auch der Überstand des Feldstammes verlor nach einmaligem Auftauen an Aktivität, jedoch in geringerem Maße (ca. 10 %). Die folgenden Auftauvorgänge brachten keine weiteren Aktivitätsverluste mehr mit sich.

3.4.4 Lyophilisierbarkeit des α -Toxins

Alternativ zur Lagerung im gefrorenen Zustand kommt für eine langfristige Aufbewahrung die Gefriertrocknung von Proben und anschließende Verwahrung im Kühlschrank (+8 °C) in Frage.

3.4.4.1 Material und Methoden

Zur Überprüfung der Verluste an Toxizität durch Lyophilisation wurden verschiedene Proben des Referenzstammes NC 547 (98 FS-6) vor und nach Gefriertrocknung auf ihren Gehalt an zytotoxischer Aktivität getestet. Es handelte sich zum einen um drei Proben mit reinem α -Toxin in sehr geringer (A und B) bzw. in mittlerer Konzentration (C) und zum anderen um einen konzentrierten Überstand (D).

Die Proben wurden zu 500- μ l-Aliquots in Fläschchen abgefüllt und dann in Lyophilisationstestern 24 h bei -30 °C vorgekühlt. Der Gefriertrockner (Typ: *Beta I*, HERAEUS CHRIST) wurde 2 h ohne Proben vorgekühlt. Die Proben verblieben 1,5 h vor dem Start der Lyophilisation im Gerät, anschließend erfolgte die 20-stündige Gefriertrocknung. Nach Beenden wurden die Proben mit sterilfiltriertem Stickstoff beaufschlagt.

Die lyophilisierten Proben wurden im gleichen Volumen Zelltestmedium wiederaufgenommen und einem Zytotoxizitätstest unterworfen.

In den Tests wurden zum direkten Vergleich nicht lyophilisierte Proben mitgeführt. Für das reine α -Toxin wurden frische Proben des gleichen Materials verwendet.

Für den Vollüberstand wurde dasselbe Reaktionsgefäß, welches zum Zwecke der Gefriertrocknung bereits aufgetaut worden war, getestet. Auf diese Weise spielte der Einfluss des zusätzlichen Auftauens vor der Lyophilisation keine Rolle.

3.4.4.2 Ergebnisse

Es wurden hohe Verluste in den reinen Proben mit geringer Proteinkonzentration und im Vollüberstand nachgewiesen (Abb. 18). Der vollständige Überstand verlor die Hälfte der Toxizität, das reine Toxin sogar 70 % resp. 85 % seiner toxischen Aktivität. Die höher konzentrierte reine Probe verlor nur etwa 15 % der toxischen Aktivität. Für die meisten laborinternen Toxinpräparationen und für alle Überstände des Feldstammes 2258 wurde wegen des geringeren Aufwandes und geringerer Verluste die Lagerung im gefrorenen Zustand bevorzugt. Proben des reinen α -Toxins wurden lyophilisiert.

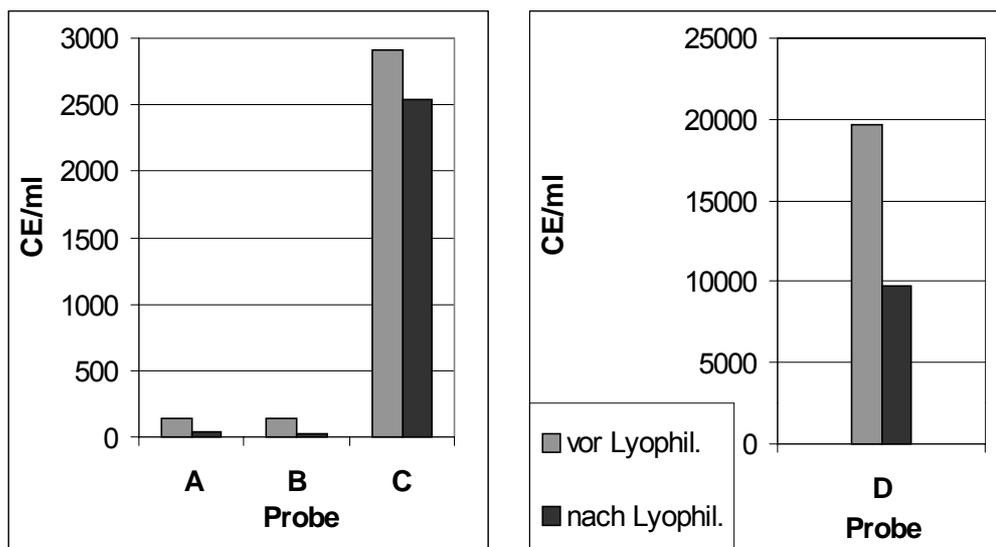


Abb. 18: Erhalt der Zytotoxizität α -toxinhaltigen Kulturüberstandes von *C. septicum*, Referenzstamm NC 547, nach Lyophilisation

3.4.5 Filtrierbarkeit des α -Toxins

Gelegentlich war es erforderlich, Proben vor dem Einsatz in Zytotoxizitätstests sterilzufiltrieren. Die Filtrationen konnten, da es sich um geringe Volumina (< 100 ml) handelte, nicht in der Fermenterfiltrationseinheit durchgeführt werden. Statt dessen kamen Mikrofiltrationssysteme zum Einsatz. Hier musste geprüft werden, ob und in welchem Umfang Toxizitätsverluste auftraten.

3.4.5.1 Material und Methoden

Zur Filtration wurden die folgenden Filtersysteme eingesetzt:

- DYNAGARD Hollow Fibre Syringe Filters, 0,2 μ m Porendurchmesser
- SARTORIUS Celluloseacetatmembran, 0,2 μ m Porendurchmesser, zusammengebautes System mit Mehrwegkartusche
- SARSTEDT Filtropur S Plus, 0,2 μ m Porendurchmesser, mit Glasfaservorfilter
- SARSTEDT Filtropur S Plus, 0,45 μ m Porendurchmesser
- SARSTEDT Filtropur S Plus, 0,2 μ m Porendurchmesser, mit Glasfaservorfilter, mit Zellkulturmedium gespült

Außer im Falle der Celluloseacetatmembran der Firma SARTORIUS, die für jede Anwendung neu in einen Mehrwegfilter eingesetzt werden musste, handelte es sich um fertige Einwegfiltersysteme.

Für das SARSTEDT-System (0,2 μ m Porendurchmesser) wurde geprüft, ob ein Vorspülen des Filters mit einer Proteinlösung die Verluste verringern konnte. Vor der Filtration der Toxinlösung wurden die Filter mit 5 ml Zellkulturmedium gespült. Problematisch war, dass es nicht möglich war, das gesamte Vorspülmedium aus der Vorkammer des Filters wieder zu entfernen. Es konnte zu Verdünnungseffekten des Toxins, besonders bei sehr kleinen Volumina, kommen.

Getestet wurden verschiedene α -Toxinpräparationen. Zum einen wurde reines Filtrat des Feldstammes 2258 filtriert und zum anderen ein Gemisch von Filtrat des Feldstammes 2258 und des Referenzstammes NC 547.

Nach Filtration wurden Zytotoxizitätstests angelegt und jeweils Proben mitgeführt, die nicht filtriert, sondern lediglich abzentrifugiert worden waren (10 min bei ca. 8400 g).

3.4.5.2 Ergebnisse

Alle getesteten Filter erfüllten die Vorgabe, dass die Filtrate keine kontaminierenden Komponenten mehr enthielten.

Für die verschiedenen Toxinpräparationen waren die Toxizitätsverluste sehr ähnlich, deshalb sind in der Tab. 7 nur die Mittelwerte der prozentualen Verluste aufgeführt.

Tab. 7: Toxizität in durch verschiedene Filtersysteme filtrierten α -Toxin-Lösungen

Filtrationssystem	Mittelwert % wiedergefundene Toxizität	Standardabw. % wiedergefundene Toxizität
Keine Filtration (abzentrifugiert)	100	0
DYNAGARD 0,2 μm	1,5	1,3
SARTORIUS 0,2 μm	100,8	20,6
SARSTEDT 0,2 μm	1,5	1,0
SARSTEDT 0,45 μm	93,6	7,1
SARSTEDT 0,2 μm, vorgespült	7,7	1,4

Die geringsten Toxizitätsverluste erbrachte die Filtration mit zusammengebauten Filtern mit einer Celluloseacetatmembran der Firma SARTORIUS mit 0,2 μm Porendurchmesser und mit SARSTEDT-Fertigfiltern mit einem Porendurchmesser von 0,45 μm .

Die anderen Filtrationssysteme waren ungeeignet für die Filtration von α -Toxinpräparationen. Die Verluste lagen bei fast 100 %.

Spülen der Filter mit Zellkulturmedium vor Filtration des Toxins bewirkte eine höhere Toxinausbeute im Filtrat, trotz des möglichen Verdünnungseffektes. Jedoch lag die Ausbeute auch hier nur bei 7,7 %.

3.4.6 Einfluss von Trypsin auf das α -Toxin

Das native α -Toxin wird erst durch Abspaltung eines carboxyterminalen Peptids in seine aktive Form überführt (GORDON *et al.* 1997, SELLMAN und TWETEN 1997). *In vivo* erfolgt diese Abspaltung durch Proteasen wie zum Beispiel Furin, eine ubiquitäre eukaryotische Serinprotease. Darüberhinaus wurde von BALLARD *et al.* (1993) nachgewiesen, dass eine Spaltung von rekombinantem α -Toxin durch Trypsin, an einer anderen carboxyterminalen Schnittstelle, ebenfalls die aktive Form des Toxins hervorbringt.

In den in dieser Arbeit durchgeführten Zellkulturtests wurde ohne besondere enzymatische Aktivierungsschritte zytotoxische Aktivität nachgewiesen.

In den folgenden Versuchen wurde geprüft, ob eine *in vitro*-Aktivierung mit Trypsin eine Steigerung der gemessenen Zytotoxizität erbringen konnte.

3.4.6.1 Material und Methoden

Toxinproben des Referenzstammes NC 547 (Batch 97 FS-2 T5) wurden in einem 1,5-ml-Reaktionsgefäß mit der verdünnten Trypsinlösung (Anhang, S. VI) versetzt wie in Tab. 8 angegeben und 30 min im Wasserbad bei 37 °C inkubiert. Die Proben wurden anschließend auf ihre Toxizität geprüft.

Tab. 8: Aktivierung des α -Toxins mit Trypsin: Mischungsverhältnisse von Toxinprobe und Trypsinlösung

Volumen (ml) Toxinlösung 1:5 vorverdünnt	Volumen (ml) Trypsinlösung	Konzentration Tryp- sin im Ansatz (w/w)	Verhältnis Trypsin zu α -Toxin ($\mu\text{g}/\mu\text{g}$)
100 μl	100 μl	0 %	-/-
100 μl	100 μl	0,0005 %	1 : 20 000
100 μl	100 μl	0,00025 %	1 : 40 000
100 μl	100 μl	0,00005 %	1 : 200 000

3.4.6.2 Ergebnisse

Durch Inkubation des α -Toxins in den angegebenen Trypsinlösungen konnte im beschriebenen Zellkulturtestsystem keine Steigerung der zytotoxischen Aktivität beobachtet werden. Die Inkubation hatte ebensowenig toxizitätsverringende Wirkung. Es wurde im Folgenden auf eine Aktivierung durch Trypsin verzichtet.

3.5 Aufreinigung des α -Toxins von *Clostridium septicum*, Referenzstamm NC 547, mittels Niederdrucksaülenchromatographie (FPLC)

Der Überstand von Bakteriensuspensionen ist ein vielfältiges Gemisch von nicht metabolisierten Bestandteilen des Nährmediums und Stoffwechselprodukten der Mikroorganismen. Im Rahmen der Arbeit sollte aus filtriertem und konzentriertem Überstand einer Kultur des *C. septicum*-Referenzstammes NC 547 das letale, nekrotisierende α -Toxin isoliert werden.

Das reine α -Toxin diene als Grundlage zur Etablierung von *in vitro*-Methoden zur Qualitätskontrolle von *C. septicum*-Vakzinen.

Die Reinigung erfolgte in mehreren Schritten durch Ionenaustauschchromatografie.

3.5.1 Untersuchung der Proben während der Aufreinigungsschritte

3.5.1.1 Toxizitätsnachweis

Das α -Toxin wurde im Ausgangsmaterial und in den Fraktionen während der chromatografischen Reinigung auf Grund seiner zytotoxischen Eigenschaften mittels Zytotoxizitätstests nachgewiesen.

Die Fraktionen waren unsteril. Die standardgemäÙe Zugabe von Antibiotika in das Zelltestmedium war jedoch hinreichend, kontaminationsfreies Wachstum in den Testplatten zu gewährleisten.

Da die in der Chromatografie verwendeten Pufferlösungen nicht zelltoxisch waren (Kap. 3.2.3.3), konnten Proben aus den Fraktionen der chromatografischen Aufreinigung direkt, ohne weitere Vorbereitungsschritte, in Zellkulturtests eingesetzt werden.

3.5.1.2 Darstellung des Toxins in der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Proteine, inklusive des α -Toxins, in den Proben wurden in denaturierenden Polyacrylamidgelen (LAEMMLI 1970) elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurden die Banden durch eine Silberfärbung sichtbar gemacht.

3.5.1.2.1 Material

In einer Gießvorrichtung des Electrophoresis Cell-Systems *Mini-Protean II* (BIO-RAD) wurden 10-%ige diskontinuierliche Polyacrylamid-Minigele angefertigt (Rezepte und Anfertigung der Gele: Anhang, S. XIII+IX) und nach der Polymerisierung in Elektrophoresekammern desselben Herstellers eingesetzt. Die Kammern wurden zur Durchführung der elektrophoretischen Läufe an ein *Power Pac 3000*-Gerät, ebenfalls von BIO-RAD, angeschlossen.

3.5.1.2.2 Methoden

Die Proben wurden im Verhältnis 1:1 mit SDS-haltigem Probenpuffer (Anhang, S. IX) verdünnt.

Üblicherweise werden die Proben zur vollständigen Reduzierung der Disulfidbrücken für 3 min auf 100 °C erhitzt. Oft wird auch Dithiothreitol (DTT) als reduzierendes Agens dem Probenpuffer zugesetzt. Voruntersuchungen hatten ergeben, dass beide Verfahren keine deutlicheren Banden und keine Erhöhung der Nachweisempfindlichkeit mit sich brachten. Es wurde daher auf eine Erhitzung und die Zugabe von Dithiothreitol verzichtet.

Die Gele wurden mit Laufpuffer (Verdünnung 1:10) überschichtet und Proben und Proteinstandard (*Silver Stain SDS-PAGE Standard, Low Range*, BIORAD oder *High molecular weight standard mixture for SDS PAGE*, SIGMA) aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte nach dem folgendem Protokoll:

5 min	100 V
40 min	200 V
5 min	100 V

Zur Silberfärbung (AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH, *Silver Staining Protocol for Proteins*; Protokoll und Rezepte der Lösungen: Anhang, S. X+XI) wurden die Gele vorsichtig aus den Kammern gelöst und gegebenenfalls markiert.

Während der Färbung, die per Hand erfolgte, wurde die Färbewanne für die jeweils vorgegebene Einwirkdauer auf einem Schüttler langsam bewegt.

Die gefärbten und konservierten Gele wurden zunächst in einem Geldokumentationssystem (*Gel Print 2000i*) fotografiert (Ausdrucke: *Digital Graphic Printer UP-D 860 E*). Die Auswertung der gespeicherten Bilddaten (.tif-Format) zur Bestimmung der spezifischen Molekülmasse an Hand der Proteinstandards erfolgte mittels des Programmes *RFLP-Scan Plus Version 3.0*, SCANALYTICS.

Die Gele wurden durch Trocknung auf saugfähigem Filter-Papier im Gel Dryer getrocknet und anschließend in Plastikbeuteln luftdicht eingeschweißt.

3.5.1.3 Immunoblot

3.5.1.3.1 Seren

Internationaler Standard:

Es wurde der internationale Anti-*C. septicum*-Standard der WHO, Weybridge, verwendet, ein Hyperimmunserum aus Pferden.

Laborinterner Serumstandard:

Vier Kaninchen (Deutsche Riesen, ca. drei Monate alt) waren mit toxoidiertem Kulturüberstand von *C. septicum* Referenzstamm NC 547 aus dem Batch 97 FS-2 immunisiert worden.

Für zwei der Kaninchen wurden dem Impfstoff 4 mg/ml Aluminiumhydroxidgel (Al(OH)₃-Gel) als Adjuvans zugesetzt. Für die anderen beiden Kaninchen wurde eine kommerzielle Formulierung (*Montanide ISA 206*, SEPPIC) als Adjuvans ausgewählt. Das Mischungsverhältnis Toxoidlösung zu Öl-Adjuvans betrug 1:1.

Im Serum der beiden Kaninchen, deren Impfstoff mit Adjuvans der Firma SEPPIC versetzt worden war, wurden nach der zweiten Immunisierung in Serumneutralisationstests (Kap. 3.6.2) zufriedenstellende Titer von 2916, resp. 3163 anti-zytotoxischen (= serumneutralisierenden) Einheiten pro ml (SNE/ml) nachgewiesen. Die Tiere wurden zur Serumgewinnung entblutet.

Die anderen beiden Kaninchen wurden ein drittes Mal geimpft und dann, mit Titern von 2529 bzw. 7186 SNE/ml im Serum, entblutet.

Die Seren aller vier Tiere wurden gepoolt und als laborinterner Antiserumstandard verwendet. Der Antikörpertiter des Serumpools gegen Toxin des Fermenterbatch 97 FS-2 betrug 4080 SNE/ml.

3.5.1.3.2 Geräte, Membranen und Lösungen

Für die Western Blots wurde eine *Mini Trans-blot Electrophoretic Transfer Cell* (BIO-RAD) verwendet. Der Transfer der Proteine vom Gel auf die Blotmembran erfolgte mit dem *Power Pac 3000*-Gerät (BIO-RAD).

Getestet wurden zunächst zwei verschiedene Membrantypen, eine Cellulosenitratmembran (0,45 µm MICRON) und eine hydrophobe PVDF-Membran. Immunoblots

mit der Cellulosenitratmembran hatten in Vorversuchen schärfere Banden und eine geringere Hintergrundfärbung ergeben, als Blots mit der PVDF-Membran, daher wurden Cellulosenitratmembranen verwendet.

Die Lösungen für die Durchführung des Blots sind im Anhang (S. XI) spezifiziert.

Antikörperlösungen:

- Internationaler Standard:
1: 6400 in Lösung 4 vorverdünnt
- Laborstandard (Kaninchenserumpool)
1: 40 in Lösung 4 vorverdünnt
- Anti-IgG Kaninchen, phophatasemarkiert:
1: 20000 in Lösung 4 vorverdünnt
- Anti-IgG Pferd, phophatasemarkiert:
1: 30000 in Lösung 4 vorverdünnt

3.5.1.3.3 Methode

Für das Immunoblotverfahren wurden SDS-Polyacrylamidgele wie beschrieben angefertigt.

Die Gele wurden nach der Elektrophorese nach Anweisungen des Herstellers in die Blotkammern eingebaut. Das Sandwich wurde mit Transferpuffer (Lösung 1) überschichtet und die Proteine in 18 h bei 30 V, 40 mA unter Rührung und Kühlung auf die Blotmembran übertragen.

Entwicklung:

- Eine Blotmembran wurde zur Entwicklung in ein Gefäß mit Blocking Puffer (Lösung 2) gegeben und 30 min bei 37 °C im Brutschrank geschwenkt.
- Anschließend wurde sie zweimal 5 min in Waschpuffer (Lösung 3) gewaschen.
- Nach Zugabe der Antikörperlösung (Kaninchen- oder Pferdeserum) wurde die Blotmembran für weitere 60 min bei 37 °C geschwenkt.
- Zur Entfernung von Serumresten erfolgte ein fünfmaliges Waschen der Membran in Waschpuffer.
- Der zweite vorverdünnte Antikörper (Anti-Kaninchen oder Anti-Pferd) wurde zugegeben und 45 min bei 37 °C geschwenkt.
- Die Membran wurde erneut fünfmal in Waschpuffer gewaschen.
- Die Färbelösung (Lösung 5) wurde zugegeben und die Membran bis Eintreten der Färbung nach 5-10 min geschwenkt. Die Färbereaktion wurde durch Spülen mit destilliertem Wasser gestoppt und die gefärbten Membranen bei Raumtemperatur getrocknet.

3.5.1.4 Quantitativer Proteinnachweis (nach LOWRY 1951)

Die Bestimmung des Gesamtproteingehaltes in den Lösungen wurde nach einer modifizierten Variante der Methode von LOWRY (1951) durchgeführt. Die Zusammensetzungen aller Testlösungen und das Protokoll der Proteinbestimmung sind im Anhang (S. XII) aufgeführt.

Die Proben mussten in amidfreien Lösungsmitteln vorliegen, da der Test diese Bindungsform nicht-selektiv nachweist. So ergibt beispielsweise probenfreier HEPES-

Puffer eine positive Reaktion. In Tris-Puffer hingegen wurde, anders als bei BRIESE (1997), keine Farbreaktion beobachtet.

In bereits gereinigten Fraktionen konnte nach einer quantitativen Proteinbestimmung die Toxizität in ein Verhältnis zur Proteinmasse gesetzt werden.

3.5.2 Chromatografie

Die Bindung der Probe an die Säule kann auf Grund hydrophober Wechselwirkungen oder, im Falle der Ionenauschromatografie, auf Grund elektrostatischer Bindungskräfte stattfinden. Im letzteren Fall kann das Säulenmaterial so gewählt werden, dass entweder Anionen oder Kationen selektiv gebunden werden.

Bei der Gelfiltration erfolgte die Auftrennung in erster Linie nach der Größe der Moleküle.

3.5.2.1 Material

3.5.2.1.1 Geräte und Säulen

Verwendet wurde ein FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography)-System, das *Gradifrac™ System* (AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH).

Im einzelnen handelte es sich um:

- einen Fraktionssammler
- eine *HiLoad™ P-50*-Pumpe
- einen Mixer (0,6 ml) und ein Solenoid-Ventil (*PSV-50*) zur Erzeugung von Gradienten
- ein Injektionsventil (*IV 7*)
- einen Schreiber (*REC 102*)
- einen UV-Monitor (*UV-1*) mit Durchflusszelle (10 mm; $\lambda = 280$ nm)
- ein Leitfähigkeitsmeßgerät (*Conductivity Monitor*), bestehend aus einer Durchflusszelle und einer Kontrolleinheit
- einen *Superloop™*, zum automatischen Auftragen größerer Probenvolumina (je 50 ml Probe).

Für die Aufreinigung wurden die folgenden Säulen (Säulen und Materialien von AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH) verwendet:

- eine Säule des Typs *XK 50*, Länge 20 cm, befüllt mit 82 ml Anionenauschmaterial (*SOURCE@30Q*)
- eine Säule des Typs *XK 16*, Länge 20 cm, befüllt mit 9 ml Kationenauschmaterial (*SOURCE@30S*).

In Voruntersuchungen wurde darüberhinaus eine Säule für die hydrophobe Interaktions-Chromatografie und eine Gelfiltrationssäule verwendet:

- eine Säule des Typs *XK 50*, Länge 20 cm, befüllt mit 77,5 ml Phenylsepharose
- eine Säule des Typs *HiLoad™ 16/60 Superdex® 200 prep grade*, vom Hersteller befüllt mit 120 ml Gelfiltrationsmaterial.

3.5.2.1.2 Ausgangsmaterial

Als Ausgangsmaterial für die Reinigung des letalen nekrotischen α -Toxins diente der durch Filtration bakterienzellenfreie, aufkonzentrierte Überstand von *C. septicum*-Fermenterkulturen des Referenzstammes NC 547.

In den Voruntersuchungen wurde mit Material verschiedener Fermentationschargen der Serie 98 FS-6 und mit Material von Batch 99 FS-7/B T5P gearbeitet.

3.5.2.1.3 Chromatografiepuffer

Der isoelektrische Punkt des α -Toxins von *C. septicum* liegt nach BALLARD et al. (1992) bei pH 8,4. Die Puffer wurden so ausgewählt, dass ein pH-Bereich gepuffert werden konnte, der eine Ionisierung des Toxins in der gewünschten Ladung bewirkte. Für die Anionenauschromatografie wurde ein Diethanolaminpuffer mit einem pH-Wert von 8,9 verwendet. Für die Kationenauschromatografie kamen ein Tris-Base-Puffer und ein HEPES-Puffer, beide mit einem pH-Wert von 7,8, zum Einsatz. Zur Erzeugung der Salzgradienten wurden Puffer mit 0,5 M NaCl eingesetzt.

Die hydrophobe Interaktionschromatografie wurde mit einem Tris-HCl-Puffer mit pH 7,9 durchgeführt. Salzgradienten wurden durch Puffer mit 1,5 M Ammoniumsulfat erzeugt.

Die Gelfiltrationsläufe wurden mit Phosphat-Puffer oder ungepuffert in H₂O bidest. durchgeführt.

Die Zusammensetzungen der Pufferlösungen sind im Anhang (S. XIII+XIV) aufgeführt.

3.5.2.2 Methoden

Für Voruntersuchungen wurden Proben der Batchserie 98 FS-6 des Referenzstammes NC 547 mit 10-20 ml Volumen auf eine Anionenauschsäule, eine Kationenauschsäule, eine hydrophobe Interaktionssäule und eine Gelfiltrationssäule aufgetragen. Es wurde geprüft, zu welchem Anteil die toxische Aktivität an die Säule gebunden hatte.

Die Läufe wurden bei einer Flussrate von 2 ml/min durchgeführt. Für die Anionen- und Kationenauschläufe und die hydrophoben Interaktionsläufe wurde ein einfacher Gradient von 0 bis 100 % Puffer B in 40 min angelegt.

Die Säulen wurden während der Läufe gekühlt, indem Wasser von 5 °C durch die Ummantelungen der Säulen gepumpt wurde.

3.5.2.3 Ergebnisse der Vorversuche

Das Prinzip der hydrophoben Interaktionschromatografie basiert auf nichtionischen Wechselwirkungen, deshalb sollte der Puffer einen pH-Wert in der Nähe des isoelektrischen Punktes aufweisen. Verwendet wurde ein Tris-HCl-Puffer mit pH 7,9, denn es hatte sich in Voruntersuchungen gezeigt, dass bei pH 8,1 bereits ein beträchtlicher Teil der toxischen Aktivität am Anionenauschmaterial gebunden hatte, das Toxin mithin in vorwiegend negativ ionisierter Form vorlag.

Die hohen Salzkonzentrationen, die zur Verstärkung der hydrophoben Wechselwirkungen in den Puffern vorlagen, beeinträchtigten das Zellwachstum in den Zytotoxizitätstests (Kap. 3.2). Um die Proben zu entsalzen mussten lange Dialysen durchgeführt werden, die zu beträchtlichen Verlusten an toxischer Aktivität führten (Kap. 3.5.3.2).

Läufe mit der Gelfiltrationssäule ergaben keine fraktionierbare Auftrennung der Proteine und hohe Verluste an Toxizität.

An den Anionen- und Kationentauschsäulen hingegen konnten über 90 % der aufgetragenen toxischen Aktivität binden (Tab. 9). Dargestellt sind die Mittelwerte für je 5 Läufe mit Ausgangsmaterialien von unterschiedlichem Reinheitsgrad.

Tab. 9: Prozentualer Anteil der nach dem Auftrag der Probe an die Säule gebundenen Toxizität

SÄULENTYP	PUFFER	Anteil der Toxizität, der nach Probenauftrag an der Säule gebunden hatte	
		Mittelwert	Stdabw.
Anionentausch	Diethanolamin 20 mM	95,4 %	5,5 %
Kationentausch	HEPES 50 mM	99,0 %	0,4 %
Kationentausch	Tris-Base 20 mM	92,4 %	8,0 %

3.5.3 Aufbereitung der Proben

3.5.3.1 Lagerung der Proben

Die Proben waren entweder im Fraktionssammler des GradifracTM-Systems in Röhrchen á 10 ml gesammelt worden, oder, im Falle größerer Probenvolumina, direkt in 500-ml-Glasflaschen. Die Proben wurden sofort gekühlt und je zwei Aliquots á 120 µl für die Untersuchungen abgenommen.

Sofern keine Dialyse erforderlich war, wurde das übrige Material bis zum nächsten Bearbeitungsschritt bei -26 °C eingefroren.

Die Lagerung des reinen α -Toxins erfolgte bei -80 °C, bzw. in gefriergetrocknetem Zustand.

3.5.3.2 Entsalzung durch Dialyse

Zwischen den chromatografischen Reinigungsschritten war eine Entsalzung der toxinhaltigen Fraktionen notwendig, damit eine Bindung an die Säule des folgenden Reinigungsschrittes gewährleistet war. Die Entsalzung erfolgte durch Dialyse.

3.5.3.2.1 Material und Methoden

Für die Dialysen wurden Cellulosemembranschläuche mit 27 mm Durchmesser verwendet.

Die Schläuche wurden nach dem folgenden Verfahren vorbehandelt:

Vorgehen:

- Das Schlauchmaterial (1-3 m) wurde in einem Erlenmeyerkolben in 1,5 l Natriumcarbonatlösung bei 80 °C 10 min erhitzt.
- Die Natriumcarbonatlösung (Anhang, S. XIV) wurde abgegossen und das Gefäß mit den Schläuchen mit 1,5 l vorerhitzter EDTA-Lösung (Anhang, S. XIV) wiederaufgefüllt und bei 95 °C 15 min im Wasserbad belassen.
- Nach dem Abgießen der EDTA-Lösung wurde mit 1,5 l H₂O bidest. aufgefüllt und der Kolben weitere 10 min im Wasserbad erhitzt.
- Die Schläuche verblieben in H₂O bidest. und wurden nach dem Abkühlen bei Raumtemperatur gelagert

Die Dialyse erfolgte in vorgekühltem Puffer A derjenigen Pufferlösung, mit welcher der nächstfolgende Chromatografieschritt durchgeführt wurde.

Das toxische Material wurde in einem durch Dialyseschlauchklemmen verschlossenen Schlauchstück unter Kühlung und Rührung des Dialysepuffers dialysiert.

Vor und nach der Dialyse wurden Proben des Materials abgenommen, um festzustellen, ob durch die Dialyse Verluste an Toxizität auftraten. Das Gesamtvolumen vor und nach der Dialyse wurde mit einer Meßpipette bestimmt.

3.5.3.2.2 Ergebnisse

Die Verluste durch Dialyse variierten sehr stark, es wurden zwischen 11 % und 97 % Ausbeute gefunden (Abb. 19).

Die Zusammensetzung des Dialysepuffers, die Menge eingesetzter toxischer Aktivität und deren Konzentration, sowie die Gesamtproteinkonzentration im Material spielten keine nachweisbare Rolle für die Ausbeute an toxischer Aktivität.

Eine Dialysedauer von 18-21 h erwies sich als ausreichend, um toxische Fraktionen eines Chromatografielaufes für den nächsten Ionenauschschritt zu entsalzen. Die Ausbeute betrug durchschnittlich 50 % der Toxizität. Je länger die Dialysedauer, desto geringer die Toxinausbeute.

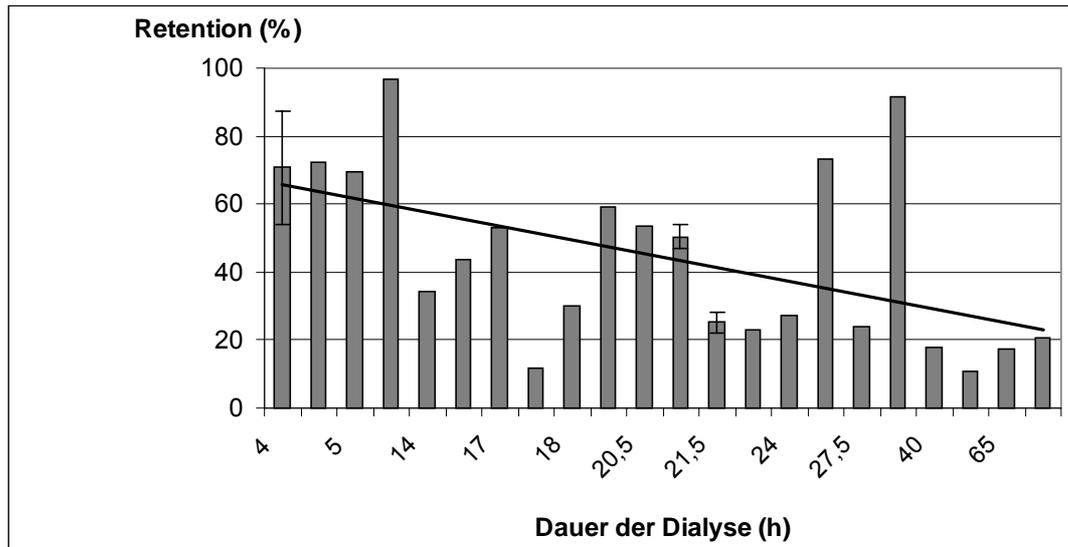


Abb. 19: Ausbeute (Retention in %) an zytotoxischer Aktivität nach Dialyse von α -toxinhaltigem Material in Abhängigkeit von der Dauer der Dialyse

3.5.3.3 Konzentrierung durch Ammoniumsulfatfällung

Stark verdünnte Proteinlösungen wurden durch eine Fällung mit Ammoniumsulfat aufkonzentriert.

Der Proteinlösung wurde unter Kühlung und Rührung Ammoniumsulfat bis zum Sättigungspunkt der Lösung, der bei einer Konzentration von ca. 40 g Ammoniumsulfat/100 ml lag, zugegeben.

Die Salzlösung wurde vier bis sechs Stunden lang gekühlt und gerührt und anschließend in 50-ml-Röhrchen 45 min bei 5000 rpm (ca. 3900 g) gekühlt zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Die Pellets wurden in geringen Volumina resuspendiert. Die Auswahl des Resuspensionsmittels richtete sich nach dem nächsten Bearbeitungsschritt.

Die Salzkonzentration in den Resuspensionslösungen war sehr hoch. Zur Lagerung wurde das α -Toxin in der proteinstabilisierenden (SCOPEs 1994) Ammoniumsulfatlösung belassen. Für weitere chromatografische Reinigungsschritte wurden Dialysen des Materials durchgeführt.

3.5.4 Hauptreinigung des α -Toxins

3.5.4.1 Material

Als Ausgangsmaterial für die Aufreinigung des α -Toxins von *C. septicum* wurden 1,8 l filtrierter konzentrierter Kulturüberstand des Fermenterbatch 99 FS-7/B T5 Pool des Referenzstammes NC 547 verwendet.

Das Material hatte eine Zytotoxizität von 41698 CE/ml, also lag eine Gesamt- Ausgangstoxizität von ca. 75 000 000 CE vor.

Die verwendeten Säulen und die Rezepte der Elutionspuffer sind im Anhang (S. XIII) beschrieben.

3.5.4.2 Verfahrensbeschreibung

Die chromatografische Aufreinigung erfolgte in drei Schritten.

Die erste Stufe der Aufreinigung war ein Anionenausschlauf mit Diethanolaminpuffer (pH 8,9). Die Konzentration des Salzes wurde in einer Stufe manuell auf 22 % eingestellt, in einer zweiten Stufe manuell auf 100 %. Der Chromatografielauf dauerte 4,5 h. Das Material, das bei 22 % Salzkonzentration eluierte, wurde gepoolt und ca. 20 h gegen HEPES-Puffer A dialysiert.

Im zweiten Reinigungsschritt wurde das Dialysat bei pH 7,8 auf das Kationenaustauschmaterial aufgegeben und in einem manuell eingestellten Stufengradienten mit einer Stufe bei 35 % HEPES-Puffer B aufgetrennt.

Proteine, die bei 35 % Puffer B von der Säule gewaschen worden waren, wurden gepoolt und ca. 21 h gegen Tris-Base Puffer A dialysiert.

Zu Entfernung der übrigen Verunreinigungen wurde ein weiterer Kationenausschritt mit Tris-Base Puffer (pH 7,8) und einem Stufengradienten mit der Stufe bei 10 % Puffer B durchgeführt.

Reines α -Toxin fand sich in den ersten Fraktionen dieser Läufe und eluierte bei 10 % Puffer B.

Die Kationenausschläufe dauerten 100-120 min.

Die Flussrate in allen Läufen betrug 2 ml/min. Die Säulen wurden gekühlt.

3.5.4.3 Ausbeute der Aufreinigung

Von den ca. 72 000 000 im Ausgangsmaterial enthaltenen zytotoxischen Einheiten wurden nach allen chromatografischen Reinigungsschritten ca. 3 600 000 CE wiedergefunden, das entspricht einer Ausbeute von 8,7 %.

Das reine α -Toxin wurde mit Ammoniumsulfat gefällt. Ein Anteil der Ausbeute, der ca. 1 800 000 CE entsprach, wurde lyophilisiert. Das Material enthielt 1399 CE/ml in 135 1-ml-Aliquots.

Der Proteingehalt der Proben betrug 100 μ g/ml. Das reine α -Toxin hatte demnach eine Toxizität von 25 000 CE/mg.

Das reine α -Toxin wurde für die Immunisierung von Mäusen zur Produktion von monoklonalen Antikörpern und für die Etablierung eines ELISA zum Nachweis spezifischer Antikörper gegen das α -Toxin von *C. septicum* im Rahmen des Projektes verwendet. Die Konzentration des α -Toxins in den Aliquots erwies sich für die Anwendungen als geeignet, so daß keine weitere Konzentrierung des Materials erfolgte.

3.5.4.4 Darstellung des Reinigungsprozesses und des Endproduktes im SDS-Polyacrylamidgel und im Immunoblot

In Abb. 20 sind die toxinhaltigen Fraktionen der einzelnen Aufreinigungsschritte in einem SDS-Polyacrylamidgel dargestellt.

Abb. 21 zeigt zwei Immunoblots mit Proben reinen α -Toxins. Ein Blot war mit dem Laborstandardserum, einem Pool von vier Kaninchenseren (Kap. 3.5.1.3.1) durchgeführt worden. Im zweiten Blot war internationales Anti-*C. septicum*-Standardserum eingesetzt worden.

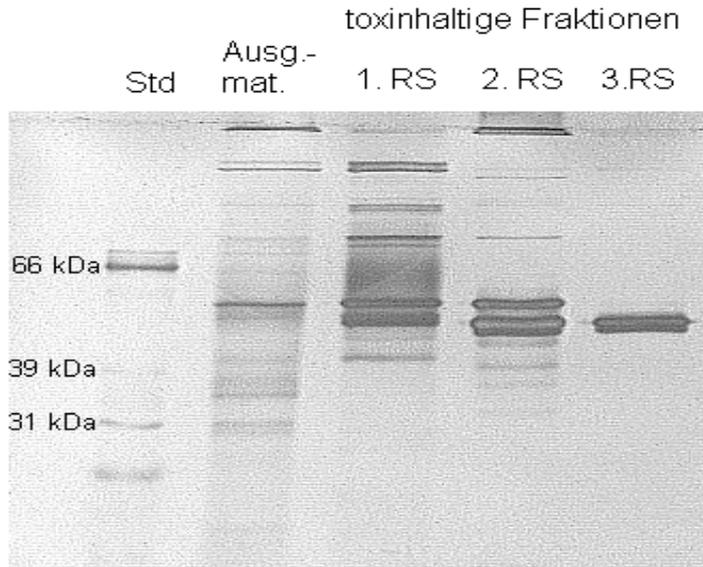


Abb. 20:
Darstellung der im toxischen Material der verschiedenen Reinigungsschritte enthaltenen Proteine im SDS-PAGE (RS = Reinigungsschritt)

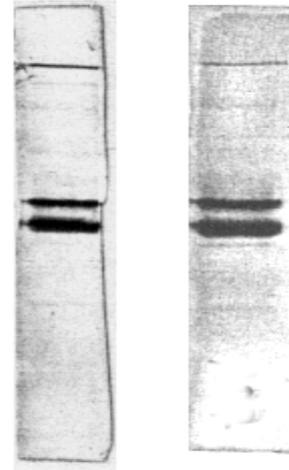


Abb. 21:
Darstellung einer Probe reinen α -Toxins im Immunoblot mit dem Laborstandardkaninchenserpumpool (links) und Internationalem *C. septicum*-Standardantiserum (rechts)

3.5.5 Eigenschaften des reinen α -Toxins

3.5.5.1 Molekülmasse

Bei der Darstellung in SDS-Gelen wurden zwei Banden mit nahezu identischem Migrationsverhalten nachgewiesen, die chromatografisch nicht weiter aufgetrennt werden konnten (Abb.20, 3. Schritt). Die Molekülmasse wurde an Hand der Proteinstandards mit dem Programm *RFLP-Scan Plus Version 3.0*, SCANALYTICS berechnet. Sie lag bei 50 kDa bzw. 48 kDa.

Einige Fraktionen mit toxischer Aktivität enthielten zusätzlich eine weitere Bande mit einer Molekülmasse von 55 kDa. Es wurden auch toxische Fraktionen gefunden, die zwar die 55-kDa-Bande enthielten, nicht aber die 50/48 kDa-Bande. Nach Lagerung des Materials im aufgetauten Zustand bei +8 °C über 48 Stunden war die 55 kDa-Bande im Gel nur noch sehr schwach nachweisbar (Abb. 22). Zudem tauchte eine schwache Bande mit hoher Molekülmasse (\gg 66 kDa) auf. Diese Bande war auch im Immunoblot angefärbt worden (Abb. 21). Ein Peptid von 3-5 kDa konnte nicht nachgewiesen werden.

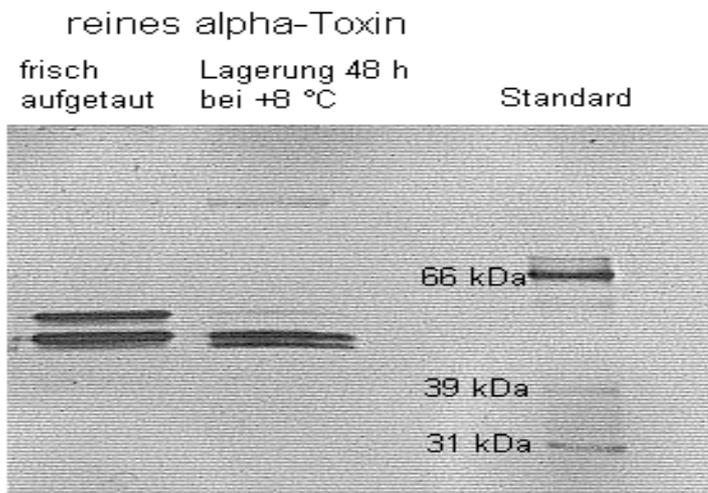


Abb. 22: Darstellung einer Probe reinen α -Toxins im SDS-PAGE im frisch aufgetauten Zustand und nach 48-stündiger Lagerung bei +8 °C

3.5.5.2 Hämolyse

Die hämolytischen Eigenschaften des reinen α -Toxins sind in Kap. 3.1.5 untersucht und dargestellt worden. Proben mit reinem α -Toxin mit einer zytotoxischen Aktivität von ca. 1400 CE/ml zeigten mit Schaferythrozyten keine Hämolyse. Mit Humane-rythrozyten wurden ca. 4,4 HE/ml nachgewiesen.

3.5.5.3 Mäuseletalität

3.5.5.3.1 Material und Methoden

Zum Nachweis der Mäuseletalität des reinen α -Toxins und zur näherungsweisen Bestimmung der mäuseletalen Dosis wurden 25 weißen Mäusen (Zuchtlinie NMRI) von 18-22 g Gewicht verschiedene Mengen reinen α -Toxins intraperitoneal oder in die Schwanzvene injiziert. Die Menge und der Applikationsort sind in Tab. 10 dargestellt. Das reine Toxin wurde mit physiologischer Natriumchloridlösung auf ein Gesamtvolumen von 0,5 ml/Tier aufgefüllt.

Tab. 10: Verabreichung von reinem α -Toxin an Mäuse: Injektionsort und -menge

Anzahl Mäuse	Injektionsort	Menge α -Toxin
6	intraperitoneal	< 4 μ g
4	intraperitoneal	8–24 μ g
6	intraperitoneal	60–84 μ g
3	intravenös	15 μ g
3	intravenös	20 μ g
3	intravenös	25 μ g

Um abzusichern, dass eine toxische Wirkung nicht durch die Chromatografiepuffer selbst vermittelt wurde, erhielten zwei weitere Mäuse intravenös jeweils 0,5 ml einer in 0,85 % NaCl 1:5 verdünnten Lösung von Tris-Base Puffer A bzw. Diethanolamin Puffer A.

3.5.5.3.2 Ergebnisse

Alle 6 Mäuse, die eine Dosis von weniger als 4 µg intraperitoneal erhalten hatten, zeigten kaum eine Reaktion auf die Injektion. Auch die intravenöse Verabreichung von 15 oder 20 µg Toxin wirkte sich nicht auf das Befinden der Mäuse aus.

Bei einer Dosis von 8-24 µg intraperitoneal konnte eine toxische Wirkung protokolliert werden. Die Tiere nahmen bereits kurze Zeit nach der Injektion eine den Bauchraum schonende, gekrümmte Haltung ein. Die Atmung war deutlich beschleunigt, das Fell struppig, die Mäuse hielten die Augen geschlossen und zeigten ein apathisches Verhalten. Nach ca. 6 h trat eine Besserung des Zustandes ein, die Tiere nahmen wieder am Geschehen in ihrer Umgebung teil und begannen sich zu putzen. Eine erneute Verschlechterung des Befindens innerhalb der folgenden 7 Tage wurde nicht beobachtet.

Tiere, die 60-84 µg intraperitoneal oder 25 µg intravenös erhalten hatten, zeigten massive Symptome bereits kurze Zeit nach Gabe des Toxins. Sie hielten die Augen geschlossen und den Rücken aufgekrümmt, das Fell war struppig und das Blut in der Schwanzvene bläulich verfärbt. Die Tiere reagierten nicht auf ihre Umwelt und zeigten eine stark beschleunigte, krampfartige Atmung. Zwei der sechs Mäuse, die die Dosis intraperitoneal erhalten hatten, und zwei der drei Mäuse, die eine intravenöse Injektion erhalten hatten, erholten sich nach ein bis zwei Tagen wieder, die Symptome gingen zurück. Die übrigen Mäuse starben in den ersten 5 Stunden nach der Injektion.

Die fünf verendeten Mäuse wurden seziiert. Bei den Tieren, die das Toxin intraperitoneal erhalten hatten, zeigte sich eine auffällige Ansammlung klarer, nicht bluthaltiger Flüssigkeit in der Bauchhöhle, die bei der intravenös gespritzten Maus nicht beobachtet wurde.

Darüberhinaus gab es keine einheitlichen Muster morphologischer Veränderungen der Organe und Gewebe.

Die intravenöse Verabreichung von Chromatografiepuffern verblieb ohne Auswirkungen auf das Befinden der Tiere.

Auf Grund der zytotoxischen, hämolytischen und mäuseletalen Eigenschaften, der Molekülmasse, und des Nachweises von zwei serologisch anfärbaren Proteinbanden, die sich in der Molekülmasse um 4-6 kDa unterschieden, wurde das gereinigte Protein als das α -Toxin von *C. septicum* identifiziert.

3.6 Produktion und Einsatz eines lokalspezifischen Toxoidimpfstoffes des *C. septicum*-Feldstammes 2258

3.6.1 Herstellung und Anwendung des Impfstoffes

3.6.1.1 Herkunft des Impfstoffproduktionsstammes

Ein Feldstamm war aus Probenmaterial verendeter Kühe isoliert und als *C. septicum* klassifiziert worden (Labornummer 2258).

Betroffen waren vier Mutterkühe eines Ausbruchs von Geburtsrauschbrand in einem Betrieb im Münsterland (Deutschland). Die Tiere hatten wenige Stunden bis Tage nach dem Abkalben erste Zeichen der Infektion gezeigt und waren innerhalb von ein bis zwei Tagen gestorben. Die Gabe von Calcium und Antibiotika nach Auftreten der ersten Symptome konnte das Leben der Kühe nicht retten.

Alle anderen Tiere des Bestandes blieben verschont.

In dem Betrieb wurden neben ca. 50 bis 60 Milchkühen zusätzlich Mastschweine gehalten. Die Kühe waren vor Auftreten der Fälle von Geburtsrauschbrand jährlich mit einer kommerziellen polyvalenten Clostridienvakzine mit *C. septicum*-Toxoidanteil geimpft worden.

Die Kühe standen auf Spaltenböden und hatten Zugang zu einem Auslauf im Freien. Die Fütterung erfolgte mit Maissilage unter Zusatz von Mineral- und Kraftfutter (Transponderfütterung). Der in einem gesonderten Teil der Gebäude gelegene Abkalbbereich war nach Auftreten des ersten Falles mehrfach desinfiziert worden, was jedoch weitere Verluste nicht verhindert hatte.

3.6.1.2 Kultivierung des *C. septicum*-Feldstammes 2258

Der Feldstamm wurde in einem 3-l-Fermenter in einem diskontinuierlichen Produktionsverfahren kultiviert (Kap. 3.3., Anhang, S. VII). Das Kulturmedium war Reinforced Clostridia Medium (RCM). Der pH-Wert wurde auf pH 7,2 eingestellt und reguliert und die sauerstoffarme Atmosphäre durch Überströmen mit Stickstoff hergestellt.

Die Ernte erfolgte jeweils nach dem Umschlagpunkt des Redoxpotenzials. Insgesamt wurden aus drei Produktionsintervallen 4,3 l Bakteriensuspension geerntet.

3.6.1.3 Toxoidierung der Fermenterkultur

Der Fermenterernte wurden zur Inaktivierung 116,2 ml Formalin (Formaldehyd 37-%ig) zugegeben. Der Formaldehydgehalt betrug dadurch 1 %. Zur Toxoidierung wurde das Gemisch anschließend 4 Tage bei 37 °C inkubiert.

Nach Toxoidierung wurde der Formaldehydgehalt mittels eines Schnelltests (MERCK) ermittelt und durch weitere Zugabe von Formalin auf 0,5 % eingestellt.

3.6.1.4 Filtration der toxoidierten Kultur

Die Toxoidlösung wurde mittels eines zweistufigen Filtrationssystems (Anhang, S. VIII) von den Bakterienzellen der *C. septicum*-Kultur abgetrennt und aufkonzentriert.

triert. Mit physiologischer Kochsalzlösung wurde rückgespült und das Endvolumen von 1000 ml Toxoidkonzentrat eingestellt.

3.6.1.5 Applikation des stallspezifischen Impfstoffes und Entnahme von Blutproben

Eine Impfstoffdosis für eine Kuh setzte sich aus 0,5 ml des Toxoidkonzentrates und 0,5 ml eines Adjuvans auf Ölbasis, *Montanide ISA 206* (SEPPIC) zusammen. Die Komponenten wurden homogenisiert (*Ultratourax*).

Zur Überprüfung der Unschädlichkeit des Impfstoffes wurden einem Meerschweinchen 0,5 ml des reinen Toxoids und 0,5 ml des Impfstoffes, versetzt mit Adjuvans, je subcutan in die Innenseite der Hinterbeine verabreicht. Das Meerschweinchen wies einen Tag nach Injektion lediglich eine leichte Schwellung der Lymphknoten an den Hinterextremitäten auf. Nach einem weiteren Tag war der Befund unauffällig.

Die Applikation des Impfstoffes im Zieltier erfolgte nach dem in Abb. 23 dargestellten Schema.

Vor der ersten und der zweiten Impfung wurde den zu vakzinierenden Kühen Blut entnommen. Die aus den Proben gewonnenen Seren wurden auf ihren Gehalt an toxinneutralisierenden Antikörpern untersucht.

Seren aus Blutproben, die vor der ersten Vakzinierung genommen worden waren, wurden zur Bestimmung des Ausgangsantikörpertiters der Kühe verwendet. Der Titer in Seren, die aus Blutproben unmittelbar vor der zweiten Impfung stammten, wurde mit dem Ausgangsantikörpertiter verglichen. Anhand der Entwicklung des Antikörpertiters konnte der Impferfolg überprüft werden.

Darüberhinaus wurden den Kälbern von geimpften Muttertieren im Alter von 4 – 6 Wochen Blutproben entnommen. Die Kälber hatten Kolostralmilch erhalten. Die Seren wurden auf ihren Antikörpergehalt untersucht, um gegebenenfalls eine Übertragung maternaler Antikörper nachweisen zu können.

Von 22 Kühen standen die Seren vor der ersten und zweiten Impfung und die Seren ihrer Kälber zur Verfügung. Die unspezifische Komplementaktivität wurde durch eine 30-minütige Inkubation im Wasserbad bei 56 °C inaktiviert.

IMPfung	ZEITPUNKT	TIERE	BLUTENTNAHME FÜR
1. Impfung		Jungtiere	-/-
1. Impfung	nach Feststellung der Trächtigkeit	tragende Kühe	Nullserum
2. Impfung (Booster)	drei bis vier Wochen nach der ersten Impfung	Jungtiere	-/-
2. Impfung (Booster)	drei bis vier Wochen nach der ersten Impfung	tragende Kühe	Antiserum
-/-	vier bis sechs Wochen nach der Geburt	Kälber	Kälberserum (Kontrolle auf maternale Antikörper)
3. Impfung	ein Jahr nach der ersten Impfung	tragende Kühe und Jungtiere	-/-

Abb. 23: Schema der Vakzinierung von Kühen mit Toxoidimpfstoff aus einer Kultur des lokalspezifischen Erregers *C. septicum*, Labornummer 2258, und die Entnahme von Blutproben zur Überwachung des Impferfolges (-/- = nicht vorgenommen)

3.6.1.6 Immunisierung von Kaninchen zur Herstellung eines laborinternen Standardserums

Zwei Kaninchen (deutsche Riesen, 4 Monate alt) wurden je zweimal im Abstand von 28 Tagen mit dem gleichen Impfstoff in gleicher Dosis wie die Kühe (Kap. 3.6.1.5) immunisiert. Die Tiere wurden 14 Tage nach der letzten Impfung entblutet und die unspezifische Komplementaktivität in den Seren inaktiviert. Die Kaninchenserum wurden im Toxinneutralisationstest als positive Kontrolle eingesetzt.

3.6.2 Toxinneutralisationstest mit Zellkultur

Die aus den Blutproben der Kühe und Kälber gewonnenen Seren wurden in einem Toxinneutralisationstest auf der Basis von Zellkulturen auf ihren Antikörpergehalt untersucht.

3.6.2.1 Material

Der Toxinneutralisationstest war auf dem in Kap. 3.2 beschriebenen Zytotoxizitätstest aufgebaut. Es wurden daher die gleichen Materialien verwendet:

- Zellkultur- und Flachbodenmikrotiterplatten (96 Kavitäten, SARSTEDT)
- Zellkulturmedium für Zellen der Linie BHK21-BSR/PK5/88 mit Zusatz von Antibiotika:

Penicillin	100	IU/ml
Streptomycin	100	µg/ml
- toxinhaltiges filtriertes Konzentrat von Kulturüberstand des Impfstoffproduktionsstammes (Batch 96 FS-8) als Antigen
- Probeseren
- Kontrollseren:

negative Kontrolle:	Serum aus der Blutprobe einer Kuh eines anderen Bestandes ohne Vorkommen von Geburtsrauschbrand
positive Kontrolle:	Kaninchenserum (Kap. 3.6.1.6)
- Zellen aus 4-Tage-Kulturen der Linie BHK21-BSR/PK5/88
- MTT-Lösung (Anhang, S. VI)
- HCL-Isopropanol-SDS-Lösung (Anhang, S. VI).

3.6.2.2 Methoden

Zunächst wurde in einem Zytotoxizitätstest eine Titration des Antigens (Fermentationskulturüberstand des *C. septicum*-Feldstamm 2258) durchgeführt, um diejenige Verdünnungsstufe des Toxins zu ermitteln, die ca. 10-20 % der Zellen in einer Kavität vital beließ. Für den Neutralisationstest wurde Toxinlösung mit der entsprechenden Verdünnung angefertigt.

Die Vorverdünnungen der Probeseren für den Neutralisationstest wurden in Flachboden-Mikrotiterplatten (Abb. 2) durchgeführt.

Belegung der Verdünnungsplatte:

- Alle Kavitäten von B 2 bis G 11 wurden zunächst mit 100 µl Zellkulturmedium befüllt.
- In die Spalte 2 wurden je 100 µl der (ggf. bereits vorverdünnten) Serumproben (Zeile A-C) bzw. der laborinternen positiven (Zeile D-F) und negativen Serumkontrolle (Zeile G+H) pipettiert.
- Das Material in den Kavitäten der Spalte 2 wurde 6 x mit der elektronischen 8-Kanal-Pipette durchmischt und anschließend 50 µl des Gemisches in die nächste Spalte gegeben. Dieser Vorgang wurde bis Spalte 10 fortgeführt; hier wurden 100 µl verworfen.

Testplatte:

- Alle Kavitäten von A 1 bis G 11 wurden zunächst mit 50 µl der wie oben angegeben austitrierten Toxinverdünnung befüllt, in Spalte 12 (Zellkontrolle) wurden 100 µl toxinfreies Zellkulturmedium gegeben.
- Von dem Material in der Serum-Vorverdünnungsplatte wurden je 50 µl in die entsprechenden Kavitäten der Testplatte pipettiert.
- Es wurde eine Zellsuspension mit einer Konzentration von 1×10^5 Zellen/ml angesetzt. Die Zellen waren zuvor von den Kulturflaschen abtrypsiniert und anschließend in einer Neubauer-Zählkammer (LINDL UND BAUER 1987) gezählt worden. Sie wurden bis zur gewünschten Konzentration mit antibiotikahaltigem Zellkulturmedium verdünnt. Von dieser Zellsuspension wurden je 50 µl in alle belegten Kavitäten gegeben.
- Auf allen Platten wurde eine toxinfreie Zellwachstumskontrolle (Spalte 12) und eine zellfreie Mediumkontrolle (Spalte 1) mitgeführt.

Inkubation:

- Die Platten wurden 72 h bei 37 °C in 5 % CO₂-Atmosphäre inkubiert.

Anfärbung:

- Die Anfärbung der vitalen Zellen zur Auswertung des Toxinneutralisationstests erfolgte in gleicher Weise wie für den Zytotoxizitätstest (Kap. 3.2.2.3) beschrieben.

3.6.2.3 Kalkulation der Ergebnisse des Toxinneutralisationstests

Wie beim Zytotoxizitätstest wurde für jede gemessene Mikrotiterplatte ein Mittelwert für die Extinktion bei 100 % (Zellkontrolle) bzw. bei 0 % Zellwachstum (Mediumkontrolle) ermittelt. Diejenige Verdünnungsstufe des Probeserums, bei welcher genau 50 % überlebende Zellen nachgewiesen werden konnten, wurde definiert als

die neutralisierende Aktivität der Probe, angegeben in serumneutralisierenden Einheiten pro ml (SNE/ml).

Der Wert lag in der Regel zwischen zwei gemessenen Verdünnungsstufen und konnte, analog zu der Berechnung der Ergebnisse des Zytotoxizitätstests, nach folgender Formel berechnet werden:

$$\left(\frac{P - E_k}{E_g - E_k} \right) \cdot D_V + D_V = A_P$$

- A_P = errechnete Verdünnungsstufe des Toxins, bei der genau 50 % der Zellen vital verbleiben = Toxizität in CE/ml
- P = errechnete Extinktion bei 50 % vital verbliebenen Zellen
($P = (E_{100\%} - E_{0\%}) / 2$)
- E_k = Extinktion bei der im Vergleich zu P nächstkleineren gemessenen Verdünnungsstufe
- E_g = Extinktion bei der im Vergleich zu P nächstgrößeren gemessenen Verdünnungsstufe
- D_V = Differenz zwischen der nächstkleineren und der nächstgrößeren Verdünnungsstufe.

3.6.3 Ergebnisse der Neutralisationstests der Rinderseren

3.6.3.1 Antikörpergehalt in den Seren der Kühe vor und nach Vakzinierung

In Abb. 24 sind die Mittelwerte von jeweils drei Wiederholungen des Toxinneutralisationstests für jedes Serum dargestellt. Es handelt sich um die Antikörpertiter in den Nullseren vor Impfung und den Seren nach der ersten Impfung von 22 Kühen (JANSEN et al. 1998).

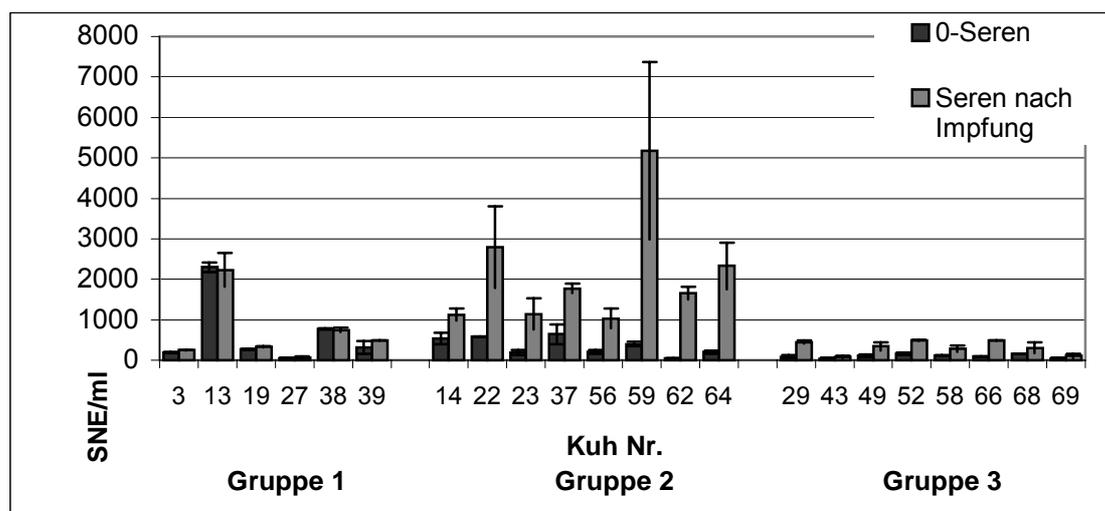


Abb. 24: Antikörpertiter in den Seren von Kühen vor und nach Vakzinierung mit lokalspezifischem Impfstoff des Feldstammes *C. septicum*, Labornummer 2258 (Erläuterung der Gruppeneinteilung: s. Text)

In Gruppe 1 wurden diejenigen Tiere zusammengefaßt, die eine geringe oder keine Steigerung des Antikörpertiters nach Impfung aufwiesen. Zwei der 5 Tiere dieser Gruppe, Kuh Nr. 13 und Kuh Nr. 38, zeigten bereits vor Vakzinierung hohe Antikörpertiter im Serum.

Eine deutliche Steigerung des Antikörpertiters im Serum um mindestens 100 % bis über 1000 % war in den Seren von 16 der 22 Kühe, ca. zwei Dritteln der untersuchten Tiere, nachzuweisen. Die Seren wurden zu Gruppe 2 und Gruppe 3 zusammengefaßt. Die Tiere in Gruppe 2 wiesen bereits im Serum vor der ersten Impfung einen Antikörperspiegel zwischen 50 und 650 SNE/ml auf, in den Seren nach Impfung wurden hohe Titer von über 1000 SNE/ml gefunden. Tiere der Gruppe 3 hatten vor der Impfung 40-160 SNE/ml im Serum, nach Impfung erhöhte sich der Titer um wenigstens 100 % auf 80-500 SNE/ml.

3.6.3.2 Antikörpergehalt in den Seren von Kälbern geimpfter Mutterkühe

Die Ergebnisse von drei Wiederholungen der Neutralisationstests mit Kälberseren sind in Abb. 25 dargestellt im Vergleich zu den Antikörpertitern in den Seren der Muttertiere nach Impfung. Auch in dieser Abbildung sind die Ergebnisse nach den in Kap. 3.6.3.1 gefundenen drei Gruppen der Reaktion der Muttertiere auf die Vakzinierung sortiert.

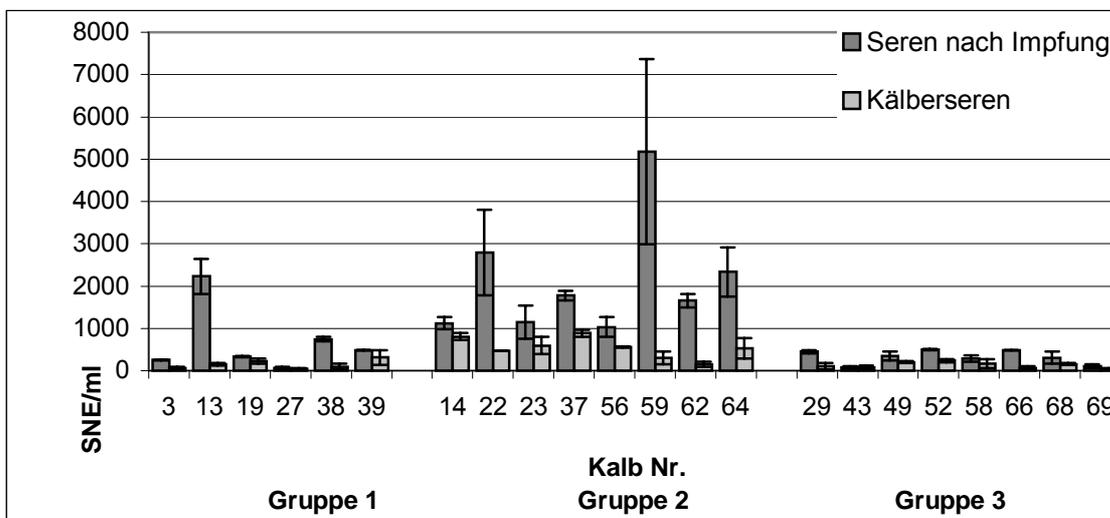


Abb. 25: Antikörpertiter der Seren von Kühen nach Vakzinierung mit lokalspezifischem Impfstoff des Feldstammes *C. septicum*, Labornummer 2258, und der Seren der Kälber dieser Tiere

In den Seren aller Kälber wurden Antikörper gefunden. Der Titer war immer niedriger als der Antikörpertiter in den Seren der Mutterkühe.

Die Seren von Kälbern von Kühen der Gruppe 2, die eine starke Erhöhung des Antikörpertiters und hohe absolute Werte für die Titer gezeigt hatten, enthielten im Mittel die höchsten Antikörpertiter. Durchschnittlich wurden 535 SNE/ml gefunden.

Kälber von Müttern der Gruppe 3 enthielten geringere Mengen Antikörper im Serum. Die Seren von Kälbern der Tiere in Gruppe 1, die keine Erhöhung der Antikörpertiter nach Impfung gezeigt hatten, enthielten ebenfalls geringe Antikörpertiter. Die Titer der Kälber in Gruppe 1 und Gruppe 3 lagen im Mittel bei 140 SNE/ml.

Die Seren von 16 der 22 Kälber enthielten eine Menge an Antikörpern in SNE/ml, die wenigstens ein Viertel der für die Mutterkühe gefundenen Titer ausmachte.

Abweichend hiervon entsprachen die in den Seren der Kälber der Kühe Nr. 13, 22, 38, 59, 62 und 66 gefundenen Antikörpertiter einem Anteil von weniger als 20 % des Antikörpertiters im Serum der Mutter. Die Muttertiere dieser Kälber gehörten allen drei Gruppen der Reaktion auf die Vakzinierung an.

3.6.3.3 Impferfolg im Stall

Vom Zeitpunkt der ersten Vakzinierung an traten im betroffenen Betrieb über einen Zeitraum von drei Jahren keine weiteren Verluste durch Geburtsrauschbrand auf.

Die ersten beiden Jahre war der Bestand durchgängig mit der stallspezifischen Vakzine behandelt worden. Dann wurde mit einem kommerziell erhältlichen polyvalenten Clostridienimpfstoffpräparat vakziniert, wie bereits vor Auftreten der Fälle von Geburtsrauschbrand.

3.6.4 Toxinneutralisationsversuche mit anderen Seren

Die Spezies *C. septicum* und *C. chauvoei* sind sich serologisch sehr ähnlich. In Toxinneutralisationstests sollte geprüft werden, ob es zu Kreuzreaktionen kommen kann, ob also ein Serum gegen *C. chauvoei*-Antigene in der Lage ist, verschiedene Toxine von *C. septicum* im Zellkulturtest zu neutralisieren.

Außerdem sollte geprüft werden, ob das Antigen des *C. septicum* Feldstammes 2258 durch nicht-homologe Seren neutralisiert werden konnte.

3.6.4.1 Material und Methode

Mit den toxinhaltigen Kulturüberständen vom *C. septicum*-Referenzstamm NC 547 und vom Feldstamm 2258 wurden Toxinneutralisationstests durchgeführt. Hier sollte lediglich ermittelt werden, ob eine Neutralisation stattfand.

Acht verschiedene Kaninchenserum und ein internationales Standardantiserum, ein Pferde-Hyperimmunserum, wurden getestet.

Eines der Kaninchenserum stammte aus der offiziellen Chargenprüfung eines Anti-*C. chauvoei*-Bakterins (Kommerzielle Vakzine A), drei weitere aus den Chargenprüfungen von polyvalenten Clostridienvakzinen mit *C. septicum*-Toxoidanteilen (kommerzielle Vakzine B, C, D). Serum E stammte aus der Chargenprüfung eines bivalenten Bakterins mit *C. septicum*-Komponente.

Die übrigen drei Seren waren im Labor durch Immunisierung von Kaninchen hergestellt worden. Eines der Kaninchen war mit Toxoidimpfstoff aus Antigenen des *C. septicum*-Referenzstammes NC 547 geimpft worden, ein anderes mit dem für die Kühe produzierten Toxoidimpfstoff auf Basis des Antigens des *C. septicum*-Feldstammes 2258. Das dritte Laborserum war durch Immunisierung von Kaninchen mit im *Ultratourax*-Mixer zerkleinerten *C. chauvoei*-Kulturen produziert worden. Der Impfstoff enthielt Reste von der Zellwand, lösliche und intrazelluläre Antigene und zusätzlich Flagellenantigene.

3.6.4.2 Ergebnisse

Tab. 11: Ergebnisse der Toxinneutralisationstests mit verschiedenen Seren und Toxin des Referenzstammes NC 547 und des Feldstammes 2258 (n.d. = nicht durchgeführt)

SERUM	ANTIGEN DES STAMMES	
	NC 547	2258
Internationales Standardserum	pos.	pos.
Kommerzielle Vakzine A (Anti <i>C. chauvoei</i>)	neg.	n.d.
Kommerzielle Vakzine B	pos.	pos.
Kommerzielle Vakzine C	pos.	pos.
Kommerzielle Vakzine D	pos.	schwach pos.
Kommerzielle Vakzine E	neg.	neg.
Kaninchenserum Anti <i>C. septicum</i> Feldstamm 2258	pos.	pos.
Kaninchenserum Anti <i>C. septicum</i> Referenzstamm NC 547	pos.	n.d.
Kaninchenserum Anti <i>C. chauvoei</i> Referenzstamm 1271	neg.	neg.

Es wurden keine Kreuzreaktionen zwischen den Anti-*C. chauvoei*-Seren und den Antigenen des *C. septicum*-Referenzstammes NC 547 gefunden. Ebenso wenig waren die Anti-*C. chauvoei*-Seren in der Lage, die toxischen Überstände von Kulturen des *C. septicum*-Feldstammes 2258 zu neutralisieren.

Die kommerzielle polyvalente Vakzine E führte nicht zu einer im Testsystem nachweisbaren Ausbildung von Antikörpern gegen *C. septicum*-Antigene in Kaninchen.

4 DISKUSSION

Durch *C. septicum* verursachte Gasödemerkrankungen verursachen weltweit, insbesondere in den ariden und semiariden Zonen der Tropen und Subtropen, Verluste in der Nutztierhaltung. Eine Immunprophylaxe durch die Verabfolgung von Toxoidvakzinen ist geboten.

Im Rahmen der Wirksamkeitskontrolle von Impfstoffen mit *C. septicum*-Toxoidanteilen sind Mäuseneutralisationstests zum Nachweis von spezifischen Antikörpern in Seren von immunisierten Kaninchen vorgeschrieben (DAB 10).

Die zytolytischen Eigenschaften des α -Toxins von *C. septicum* ermöglichen einen quantitativen Nachweis des α -Toxins durch *in vitro*-Testverfahren auf Basis von sensitiven Zellkulturen. Entsprechend kann die Messung spezifischer Antikörper gegen *C. septicum*-Antigene in den Seren geimpfter Tiere, alternativ zu den Mäuseneutralisationstests, in Neutralisationstests mit sensitiven Zellkulturen erfolgen.

Im Rahmen der Arbeit sollte lösliches Antigen von zwei *C. septicum*-Stämmen, dem Referenzstamm NC 547 und einem aus einem lokalen Ausbruch isolierten Feldstamm (2258), produziert werden. Die Identifizierung der Spezies *C. septicum*, insbesondere die Differenzierung von *C. chauvoei* ist problematisch (MOUSSA 1959, SEIFERT 1992 und 1995, HATHEWAY 1990).

Zur Absicherung der Identität des Feldstammes wurden die Symptome der von dem Stamm bei Rindern ausgelösten Erkrankung in Betracht gezogen. Sie deuteten darauf hin, dass die Spezies zur Gruppe der Erreger des Gasödemkomplexes gehörte.

Der Nachweis, dass es sich um anaerobe, zur Sporenbildung befähigte, grampositive Bakterien handelte, wurde für die untersuchten Stämme durch konventionelle biochemische Methoden geführt. Der Referenzstamm wurde allen typisierenden Untersuchungen parallel unterzogen, so dass Aussagen über die Eignung der durchgeführten Methoden vorgenommen werden konnten.

Sowohl durch die gaschromatografische Analyse der leichtflüchtigen Alkohole und Fettsäuren (BROOKS *et al.* 1976, SEIFERT *et al.* 1981, GIERCKE-SYGUSCH 1987), die Produkte der Gärung sind, als auch der langkettigen, zellwandständigen Fettsäuren (HEITFUSS 1991) konnte eine Clusterung von *C. septicum* und *C. chauvoei* und eine Trennung dieser Gruppe von anderen Clostridien erzielt werden. Eine Differenzierung von der sehr ähnlichen Spezies *C. chauvoei* gelang jedoch nicht.

Die Ergebnisse wurden in der vorliegenden Arbeit für den Feldstamm und für den Referenzstamm bestätigt.

Versuche, eine Unterscheidung von *C. septicum* und *C. chauvoei* durch fluoreszenzserologische Techniken vorzunehmen, gelangen in eindeutiger Weise für den Referenzstamm, nicht jedoch für den Feldstamm. Ursache ist die Diversität der somatischen Antigene innerhalb der Spezies *C. septicum* (ROBERTSON und FELIX 1930, HENDERSON 1935 und 1937, MOUSSA 1959, BATTY und WALKER 1963, SHIRASAKA 1983).

Erst die Amplifizierung des α -Toxingens und der anschließende Nachweis des Produktes der Polymerasekettenreaktion ermöglichte eine positive Zuordnung beider Stämme zu der Spezies *C. septicum* und eine sichere Differenzierung von *C. chauvoei*.

Die Parameter zur Produktion von α -Toxin durch den *C. septicum*-Referenzstamm 547 im Göttinger Bioreaktor sollten optimiert werden. Das Bioreaktorsystem wurde darüberhinaus verwendet, um einen Toxoidimpfstoff aus dem Antigen des Feldstammes 2258 herzustellen.

Das Göttinger Bioreaktor-System (BÖHNEL 1986) ist gut geeignet zur Kultivierung von Clostridienkulturen und damit zur Produktion von löslichen Antigenen (DEUBLER 1982, ROTH 1986, SCHAPER 1991).

Mittels der Kaskaden-Cross-Flow-Filtration können toxinhaltige Überstände von Clostridienkulturen schnell und ohne Toxizitätsverluste von den Bakterien abgetrennt und konzentriert werden (KENNEDY 1976, ROTH 1986).

In der vorliegenden Arbeit hatten sich beide zur Toxinproduktion verwendeten Stämme nach 10-20 Tagen an das Wachstum im Bioreaktor in RCM und HHB bei pH 7,2 adaptiert und produzierten Toxin.

Für *C. septicum*-Kulturen wurde eine Freisetzung des Toxins erst nach dem Ende der exponentiellen Wachstumsphase beschrieben (SMITH und HOLDEMAN 1968 und KENNEDY 1976). GRÄSSER (1964) und HNÁTKOVÁ *et al.* (1986) hingegen wiesen die Produktion von Toxin während der logarithmischen Wachstumsphase nach. In den vorliegenden Untersuchungen wurde zu jedem Zeitpunkt nach Anwachsen der Kultur im Fermenter toxische Aktivität nachgewiesen. Maximale Toxinmengen wurden ein bis zwei Stunden nach dem Wiederanstieg des Redoxpotenzials gefunden.

Die Messung des Redoxpotenzials über eine in den Messkreislauf des Fermentationssystems integrierte Redoxelektrode bot ein geeignetes Mittel zur Überwachung des bakteriellen Wachstums und zur Bestimmung des Erntezeitpunktes. Trübungsmessungen dagegen sind weniger geeignet, obwohl sie eine Steigerung der Bakterienkonzentration während des Wachstums sichtbar machen. Es ist jedoch nur schwer möglich, das Ende des exponentiellen Wachstums zu erkennen, da neben den vegetativen auch die toten Zellen und Sporen Licht absorbieren.

Die diskontinuierliche Kulturform erwies sich in Bezug auf die Erfordernisse als besonders geeignet. Der Kulturüberstand konnte zu dem Zeitpunkt, als in einer Kultur die maximale Toxinmenge vorlag, durch Kaskadenfiltration ohne Verluste konzentriert und eingefroren werden, was dem Erhalt der toxischen Aktivität zu Gute kam.

Die Unterschiede zur Toxinproduktion in kontinuierlicher Kultur waren jedoch so gering, dass auch letztere Methode geeignet ist, α -Toxin von *C. septicum* in größeren Mengen zu gewinnen. Das gilt insbesondere, wenn das Antigen für die Produktion von Impfstoffen bereitgestellt werden soll. Die serologische Struktur des α -Toxins ist persistenter als die zytolytische Aktivität. Zudem wird die Ernte durch kontinuierliche Toxoidierung stabilisiert.

Die toxische Aktivität in Kulturüberständen musste quantifiziert werden. Der Nachweis und die Titration der Toxizität in *C. septicum*-Kulturüberständen kann im Tierversuch mit Mäusen erfolgen, denn das von *C. septicum* sezernierte α -Toxin ist ein Letaltoxin (SMITH und WILLIAMS 1984, CATO *et al.* 1986, HATHEWAY 1990, KNIGHT *et al.* 1990, ROTH *et al.* 1999).

Die zytolytischen Eigenschaften des α -Toxins von *C. septicum* ermöglichen die Durchführung eines Nachweissystems in Mikrotiterplatten auf Basis von sensitiven Mammaliazellkulturen als Alternative zum Tierversuch.

Der Nachweis des α -Toxins im Zellkulturtest erwies sich als einfach, schnell durchführbar und gut standardisierbar. Der Test war empfindlich und die Nachweisgrenze wesentlich niedriger, als im parallel durchgeführten Hämolysetest.

Der Nachweis in Zellkultursystemen ist zudem empfindlicher, als bei den *in vivo*-Methoden Hautnekrosetest und Mäuseletalitätstest (KNIGHT 1990).

Die ausgeprägte zytotoxische Aktivität war spezifisch für *C. septicum*. Proben von *C. chauvoei* waren in diesen und anderen Untersuchungen (WONG GONZÁLEZ 2000) nicht oder nur in sehr geringem Ausmaß (< 10 CE/ml) zytotoxisch.

Die Zelllinie BHK21-BSR/PK5/88, ein Hybrid der BHK21-C13-Linie, war bei leichter Kultivierbarkeit sehr sensitiv gegen das α -Toxin der beiden untersuchten Stämme. Die Zellen der Linie konnten ohne signifikante Veränderungen der Sensitivität über 90 Mal passagiert werden.

Die Eignung der Linie wurde auch für die Toxine anderer *C. septicum*-Stämme nachgewiesen, darunter 9 mexikanische Feldstämme (WONG GONZÁLEZ 2000).

Im Vergleich zu der ebenfalls sehr sensitiven Vero-Zelllinie (SHIMIZU *et al.* 1979) zeichnete sich die BHK21-BSR/PK5/88-Linie durch besseres Wachstum und damit verbunden deutlichere Anfärbung aus.

Die simultane Zugabe von Probe und Zellsuspension in die Testplatten (MIYAMURA *et al.* 1974 a) hat sich bewährt. Eine spätere Zugabe der toxischen Proben führte zu signifikant verringerten Meßergebnissen. Die Zellen in den Mikrotiterplatten bedecken den Boden einer Kavität nach zwei Tagen bereits zu 50-80 %. Es ist denkbar, dass Zellen in unterschiedlichen Phasen des Wachstums in spezifischer Weise auf die Gegenwart des Toxins reagieren.

Da es keine Hinweise auf eine subletale zytopathische Aktivität des α -Toxins gibt (KNIGHT *et al.* 1990), kann zur Testauswertung eine selektive Anfärbung der vitalen Zellen (SCHAPER 1991) vorgenommen werden.

Einige Arbeitsgruppen verwendeten als Endpunkt zur Determinierung einer „minimalen zytopathischen Dosis“ (SHIMIZU *et al.* 1979) diejenige Verdünnungsstufe, die in der Lage war, alle Zellen in einem Reaktionsgefäß zu töten (MIYAMURA *et al.* 1974 a, HOWARD und BUCKLEY 1985, KNIGHT *et al.* 1986).

Davon ausgehend, dass es sich bei Zellkulturen um biologische Systeme handelt, die sich, trotz der exakten Einhaltung des Versuchsprotokolls, innerhalb von Grenzen variabel verhalten können, muss von Abweichungen im maximalen Zellwachstum von Test zu Test ausgegangen werden. Daher wurde in den vorliegenden Untersuchungen für die Bestimmung der Toxizität einer Probe der reziproke Wert derjenigen Verdünnungsstufe, die in der Lage war 50 % der Zellen im Reaktionsgefäß abzutöten, verwendet. Die Kalkulation der Toxizität in CE/ml erfolgte unter Einbeziehung des in der individuellen Testplatte maximalen Zellwachstums.

Wurden die in den Testplatten nach der Anfärbung gemessenen Extinktionen gegen die Verdünnungsstufen der Probe aufgetragen, so ergab sich eine Kurve mit sigmoidem Verlauf. Da im linearen Bereich solcher Kurven weniger als drei Meßpunkte lagen, konnte die Kalkulation der Toxizität nicht an Hand der Parallelität zu der Kurve eines Standardtoxins erfolgen.

Das Verdünnungssystem in 1:2-Schritten erlaubte eine sehr schnelle Titration der Proben in den Testplatten und die Untersuchung eines breiten Spektrums an Verdünnungsstufen für jede Probe. Zugleich jedoch führte das System in den höheren Verdünnungen zu hohen Zahlendifferenzen zwischen zwei aufeinanderfolgenden Verdünnungsstufen und damit zu ausgesprochen hohen Standardabweichungen zwischen den Tests.

Durch den Verdünnungs- und Kalkulationsmodus ergaben sich für hochtoxische Proben sehr hohe Standardabweichungen der ermittelten Toxizitäten. Günstiger wäre die parallele Titration von verschiedenen Vorverdünnungen einer Probe in einer Platte, wodurch im kritischen Bereich eine größere Anzahl von Meßwerten zur Auswertung zur Verfügung stünde.

Das Mitführen eines Standardtoxins mit bekannter Toxizität als Referenzprobe erlaubte einen qualitativen Vergleich zwischen den in verschiedenen Testplatten ermittelten Werten für eine Probe. Da ein internationales Standardtoxin derzeit nicht erhältlich ist, wurde ein laborinterner Toxinstandard hergestellt (KEMENY 1994) und in geeigneten Aliquots fraktioniert. Die Fraktionierung ist insofern von Bedeutung, als die Vorgänge des Einfrierens und Wiederauftauens an sich zu Verlusten an toxischer Aktivität führen können, wie die vorliegenden Untersuchungen zumindest für das Toxin des Referenzstammes aufgezeigt haben.

Die Variation zwischen den einzelnen Tests, die mit dem Laborstandardtoxin durchgeführt worden waren, lag in den vorliegenden Untersuchungen mit 11,9 % gut in einem für die Reproduzierbarkeit biologischer Systeme akzeptablen Rahmen (KNIGHT *et al.* 1990, EBERT 1998).

Die in Säugerzellkulturen nachgewiesene Toxizität in Überständen von *C. septicum*-Kulturen ist in erster Linie auf die Aktivität des α -Toxins zurückzuführen. Das Toxin verliert rasch an toxischer Aktivität (TAKANO und KONDO 1987). Insofern war es von Bedeutung, die Stabilität des α -Toxins, bzw. der zytotoxischen Aktivität des Toxins, zu untersuchen.

Zunächst wurde angenommen, dass *C. septicum* keine extrazellulären Proteasen sezerniert (GRÄSSER 1964), die Ansicht musste jedoch revidiert werden (HASHIM und HASSAN 1991, BÖHNEL 1986). Das α -Toxin ist allerdings, abgesehen von den carboxyterminalen Aktivierungsschnittstellen, vergleichsweise stabil gegen Proteolyse (ROSSJOHN *et al.* 1998). Die Verluste an toxischer Aktivität sind nicht auf proteolytischen Abbau zurückzuführen, sondern auf die Bildung inaktiver Komplexe (SELLMAN *et al.* 1997).

In den Lagerungsversuchen blieb die toxische Aktivität gut erhalten, solange das Toxin im gefrorenen Zustand vorlag. Bei den Proben handelte es sich jeweils um konzentrierten oder verdünnten Kulturüberstand. Somit lag ein Gemisch verschiedener Salze und Proteine vor. Der kryohydratische Punkt einzelner Komponenten spielte hier vermutlich eine untergeordnete Rolle.

Sofern die Aktivität proteolytischer Enzyme ausgeschlossen werden kann, sind in der Regel hochkonzentrierte Proteinlösungen stabiler als stark verdünnte Lösungen (SCOPES 1994). Das Verhalten des gereinigten α -Toxins bei Lagerung kann daher von den gefundenen Ergebnissen abweichen, was in weiteren Untersuchungen zu prüfen wäre.

Versuche mit proteinstabilisierenden Substanzen, beispielsweise Glycerin (KEMENY 1994) oder Schutzkolloiden (ROTH 1986), wurden nicht durchgeführt.

Die Lyophilisation ist nach ROTH (1986) und KEMENY (1994) eine geeignete Methode, Clostridienantigene über lange Zeiträume zu stabilisieren. Die Lyophilisation von toxischem Material des *C. septicum*-Referenzstammes führte jedoch zu beträchtlichen Verlusten an toxischer Aktivität in niedrigkonzentrierten Proben reinen Toxins und in Kulturüberstand. Gereinigtes Toxin in höherer Konzentration zeigte geringe Verluste. Die Lyophilisation wurde als unumgängliche Methode der Präparation für Lagerung und insbesondere Transporte angesehen.

Bei der Auswahl der Lagerungsform des Toxins ist in Betracht zu ziehen für welche Zwecke das gelagerte Material eingesetzt werden soll. Der Einfluss aller beteiligter Substanzen auf alle geplanten Arbeitsschritte sollte nachgeprüft werden.

Bei Langzeitversuchen und Standardmethoden ist in Erwägung zu ziehen, dass Zellkulturen auf Grund ihrer Sensitivität möglicherweise auf minimale Änderungen des Testsystems reagieren. Hingewiesen sei hier auf hersteller- und marktbedingte Änderungen der Zusammensetzung kommerzieller Kulturmedien oder Gebrauchsmaterialien wie Kulturflaschen und Mikrotiterplatten. Wird ein Bestandteil des Testsystems ersetzt, so sollten zunächst einige Tests mit alter und neuer Materialkombination sowie mit standardisierten Referenzproben parallel geführt werden.

Wie bereits dargestellt, bedarf das α -Toxin zur Entfaltung seiner toxischen Aktivität an einer Zielzelle der Aktivierung durch die Abspaltung eines carboxyterminalen Peptids.

Das α -Toxin ist Substrat für verschiedene proteolytische Enzyme (BALLARD 1995, GORDON 1997). Erfolgt die Aktivierung nicht an der Membran der Zielzelle, sondern in Lösung, entstehen toxisch inaktive Makromoleküle (SELLMAN und TWETEN 1997), deren serologische Kapazität gleichwohl unverändert bleibt (ROTH 2000). Die Bildung von Aggregaten, die schon durch Spuren proteolytischer Enzyme bewirkt werden kann, wurde als die Tendenz des Toxins in seine stabilere Toxoidform überzugehen bezeichnet (GRÄSSER 1964).

In den vorliegenden Untersuchungen wurden Versuche zur Aktivierung des α -Toxins durch Trypsin vorgenommen, jedoch wurden keine Veränderung der toxischen Aktivität durch Inkubation mit Trypsin beobachtet. Die Überprüfung erfolgte allerdings durch den Einsatz in Zellkulturtests. *In vivo* erfolgt die Aktivierung des α -Toxins hauptsächlich durch das Enzym Furin, eine an eukaryotischen Zellwänden lokalisierte Serinprotease (EDER und FERSHT 1995, GORDON *et al.* 1997, SELLMAN *et al.* 1997). Es ist davon auszugehen, dass eine maximale Aktivierung stattfindet, weil Furin auch in Zellkulturen vorliegt, wie GORDON *et al.* 1997 für CHO- und FD11-Zellen zeigten. Allerdings wäre eine Verringerung der Toxizität nach der Trypsinbehandlung durch die Bildung inaktiver löslicher Aggregate zu erwarten gewesen (SELLMAN und TWETEN 1997), die jedoch ausblieb.

Zur Reinigung des α -Toxins aus Kulturüberstand sind von verschiedenen Arbeitsgruppen jeweils unterschiedliche Vorgehensweisen erarbeitet worden (KNIGHT *et al.* 1990, BALLARD *et al.* 1992, SELLMAN *et al.* 1997). Rekombinantes α -Toxin konnte im ersten Reinigungsschritt auf Grund seines Poly-Histidin-Restes an eine Nickelchelatsäule gebunden werden. Anschließend genügte ein Chromatografie-schritt mit einer Kationentauschsäule (SELLMAN *et al.* 1997).

α -Toxin, welches von *C. septicum*-Kulturen produziert worden war, wurde in drei Schritten gereinigt, durch Gelfiltration, Anionentausch- und Kationentauschsäulenchromatografie (KNIGHT *et al.* 1990) oder durch einen Anionentauschschritt, gefolgt von zwei Kationentauschschritten (BALLARD *et al.* 1992).

Das in dieser Arbeit zur Reinigung des α -Toxins des *C. septicum*-Referenzstammes in einem FLPC-System vorgeschlagene Verfahren ermöglichte eine gute Reinigung. Ein Anionentauschschritt und zwei darauffolgende Kationentauschschritte wurden durchgeführt. Der Anionentauschschritt wurde jedoch, anders als bei BALLARD *et al.* (1992), die einen Puffer mit pH 8,0 verwendeten, bei pH 8,9 durchgeführt. Das α -Toxin mit dem isoelektrischen Punkt bei pH 8,4 (BALLARD *et al.* 1992) befand sich dadurch in der gebundenen Fraktion.

In SDS-Polyacrylamidgelen wurden zwei immunrelevante Banden des α -Toxins gefunden. An Hand der im Gel mitgeführten Proteinstandards konnte eine Molekülmasse von 55 kDa für das schwerere und von 48 kDa bzw. 50 kDa für das leichtere Protein ermittelt werden. Die 55 kDa-Form konnte nach einer Lagerung im aufgetauten Zustand in die kleinere Form übergehen. Eine solche Lagerung ist mit Toxizitätsverlusten verbunden.

Das Vorhandensein von zwei immunologisch aktiven Formen des Toxins, eine ca. 5 kDa schwerer als die andere, ist konform mit den bisher gefundenen Ergebnissen, wengleich die Molekülmassen mit 48 kDa und 44 kDa (BALLARD *et al.* 1995) bzw. 46,5 kDa und 41,3 kDa (GORDON *et al.* 1997) für das α -Toxin und 3,7 kDa (BALLARD *et al.* 1993) bzw. 5,1 kDa (GORDON *et al.* 1997) für das Peptid angegeben wurden.

Die Methode der Molekülmassenbestimmung an Hand von Proteinstandards in Polyacrylamidgelen ist einer Fehlerquote unterworfen. In den durchgeführten Untersuchungen wurden für die gleiche Proteinbande in Standards verschiedener Herstellerfirmen eine Differenz von bis zu 6 kDa berechnet.

In den SDS-Polyacrylamidgelen und den Immunoblots mit gereinigten Fraktionen wurden serologisch nachweisbare Aggregate gefunden, die schwerer waren, als das größte Referenzprotein des Standards mit 66 kDa. Serologisch färbbare Komplexe von >200 kDa wurden auch von anderen Autoren gefunden (BALLARD *et al.* 1992 und 1995, SELLMAN *et al.* 1997). Die Komplexe sind stabil gegen die denaturierenden Bedingungen im SDS-Gel (SELLMAN *et al.* 1997).

Die kleinere 50/48 kDa-Form des α -Toxins war ebenfalls in sich stabil, nur ein eher geringer Teil aggregierte spontan zu einem Komplex. Auch SELLMAN *et al.* (1997) fanden in Proben, in welchen es zur Bildung von Aggregaten gekommen war, die kleinere Form des α -Toxins. Das Resultat überrascht insofern, als in derselben Veröffentlichung die Kinetik der Komplexbildung untersucht wurde und sich herausstellte, dass zwar der Vorgang der Insertion des Oligokomplexes in die Zielzellmembran temperaturabhängig ist, nicht aber die Oligomerisierung selbst. Es wäre demnach ein höherer Grad der Komplexbildung zu erwarten. Die zitierten Messungen bezogen sich allerdings auf eine Komplexbildung an der Membran, die gegenüber der Komplexbildung in Lösung begünstigt sein könnte.

Dem α -Toxin von *C. septicum* werden letale, zytotoxische, nekrotische und hämolytische Eigenschaften zugeordnet. Es gilt als die einzige letale Aktivität, die *C. septicum* sezerniert (BALLARD *et al.* 1992). Mäuse, welchen das reine Toxin verabreicht

worden war, starben an schockartigen Symptomen (BALLARD *et al.* 1992, TWE-TEN 1995).

Tatsächlich war das im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen gereinigte α -Toxin mäuseletal. Bei intravenöser Gabe des Toxins führten geringere Toxinkonzentrationen zum Tod der Tiere als bei intraperitonealer Gabe. Die Ergebnisse im Bereich der subletalen Dosen deuteten darauf hin, dass Krankheitssymptome nach intraperitonealer Gabe bei geringeren Toxinkonzentrationen auftreten, als bei intravenöser Verabreichung.

In den Mäusen, die nach Eintritt des Todes seziert worden waren, wurde keine Gasbildung, keine Verflüssigung von Geweben und keine Nekrosen gefunden, gleich, welche Applikationsform durchgeführt worden war. Letztere sonst bei Gasödemerkrankungen typischerweise auftretenden Symptome (SEIFERT 1992 und 1995) sind daher auf die Wirkung anderer von *C. septicum* sezernierter Toxine, bzw. ein Zusammenspiel der toxischen Prinzipien bei Infektion zurückzuführen (BÖHNEL 1986, GINSBURG *et al.* 1999).

Das α -Toxin macht den größten Teil der hämolytischen Aktivität von *C. septicum*-Kulturüberstand aus (BALLARD 1992). In den vorliegenden Untersuchungen konnte das bestätigt werden, denn das Verhältnis der zytolytischen Aktivität von gereinigtem α -Toxin zu der hämolytischen Aktivität des reinen Toxins entsprach dem Verhältnis von zytolytischer zu hämolytischer Aktivität des Kulturüberstandes.

Es kann von einer „langsamen Hämolyse“, die frühestens nach 4 Stunden vollständig war, gesprochen werden. „Langsame Hämolyse“ war auch von anderen Arbeitsgruppen für das α -Toxin nachgewiesen worden (BERNHEIMER 1944, MOUSSA 1958, TAKANO und KONDO 1987, BALLARD *et al.* 1992).

Wegen der hämolytischen Aktivität des α -Toxins kann als Ersatz für den Zytotoxizitätstest mit Zellkulturen auch der technisch leichter durchzuführende Hämolysetest für den Nachweis und die Quantifizierung des α -Toxins verwendet werden. Allerdings ist der Hämolysetest weniger empfindlich. Vor allem aber zeigen die Ergebnisse des Hämolysetests mit Kulturüberständen des Referenzstammes NC 547 und des Feldstammes 2258, dass die sezernierte hämolytische Aktivität stammspezifisch bezüglich der Spezifität für Erythrozyten verschiedener Blutsorten ist. Für 9 mexikanische Feldstämme, die als *C. septicum* klassifiziert worden waren, wurden sehr unterschiedliche Hämolysetiter gegen Humanblut nachgewiesen (WONG GONZÁLEZ 2000). Bei unbekanntem Feldstamm ist der Nachweis des α -Toxins per Zytotoxizitätstest der sicherere und sensitivere Ansatz.

Clostridieninfektionen verursachen, vor allem in tropischen und subtropischen Regionen, in der Nutztierhaltung erhebliche Verluste (SEIFERT 1992). Auf Grund des fulminanten Verlaufes der Erkrankung sind prophylaktische Maßnahmen in Form von Impfungen geboten.

Durch die Applikation von Toxoidvakzinen auf Basis des letalen, nekrotischen, hämolytischen α -Toxins von *C. septicum* kann ein guter Immunschutz bewirkt werden (GRÄSSER 1964, PRANTER *et al.* 1971, KENNEDY 1976, BALLARD *et al.* 1992).

Kommerzielle Vakzinen, produziert aus den Antigenen von etablierten Impfstoffproduktionsstämmen, sind jedoch gegebenenfalls nicht in der Lage, bei lokalen Ausbrüchen von *C. septicum*-Erkrankungen einen Immunschutz zu begründen (SEIFERT

1992). Bei der Impfung mit Mehrfachimpfstoffen ist es denkbar, dass das Immunsystem nicht gegen alle Komponenten einen Antikörpertiter aufbaut, der gegen starken Erregerdruck oder hochpathogene Feldstämme schützen kann. Zudem unterscheiden sich *C. septicum*-Stämme unterschiedlicher geografischer Herkunft oft in der Struktur der Antigene (SEIFERT 1992).

Zwar konnten beide untersuchten *C. septicum*-Stämme an Hand des Amplifikationsproduktes des α -Toxingens sicher identifiziert werden.

Dennoch unterschieden sich die Eigenschaften des hämolytischen Proteins der beiden Stämme. Das α -Toxin von *C. septicum* wirkt stärker hämolytisch gegen menschliche Erythrozyten, als gegen Schaferythrozyten (IMAGAWA *et al.* 1994), was in Bezug auf das α -Toxin des Referenzstammes bestätigt wurde. Proben von Kulturüberstand des Feldstammes 2258 zeigten den gleichen Titer an hämolytischer Aktivität gegen Schafblut, wie der Kulturüberstand des Referenzstammes. Sie waren jedoch im Vergleich zur Probe des Referenzstammes weniger zytotoxisch, das Verhältnis der toxischen Aktivität zur hämolytischen Aktivität gegen Schafblut war also ein anderes. Zudem konnte gar keine Hämolyse gegen Humanblut nachgewiesen werden.

Da das α -Toxin von *C. septicum* für den größten Teil der hämolytischen Aktivität von Kulturüberständen verantwortlich ist (BALLARD *et al.* 1992), wie für die in dieser Arbeit untersuchten Stämme ebenfalls gezeigt wurde, muss angenommen werden, dass das α -Toxin des Feldstammes eine andere Spezifität bezüglich der Erythrozyten hat, als das Toxin des Referenzstammes. Die Spezifität ist aller Wahrscheinlichkeit nach strukturell begründet.

Alternativ könnte vermutet werden, dass im Kulturüberstand des Feldstammes das hämolytische δ -Toxin eine vergleichsweise bedeutsamere Rolle spielt. Diese Erklärung würde darauf hinauslaufen, dass sich die Zusammensetzung der löslichen Antigene verschiedener *C. septicum*-Stämme unterscheidet. Das δ -Toxin ist jedoch sauerstofflabil (STEVENS *et al.* 1990, BALLARD *et al.* 1992, CORTIÑAS *et al.* 1997), so dass die hämolytische Aktivität bei den aerob durchgeführten Hämolysetests vermutlich verloren ginge.

Die Impfung der Rinder eines Milchviehbetriebes in Deutschland mit einer kommerziellen Clostridien-Mehrfach-Vakzine hatte einen Ausbruch von durch *C. septicum* verursachtem Geburtsrauschbrand nicht verhindern können.

Die Produktion von Impfstoffen aus lokalspezifischen Stämmen ist ein erfolgversprechender Weg, lokalen Ausbrüchen von *C. septicum*-Infektionen zu begegnen. Sind noch nicht alle Tiere eines Bestandes betroffen, kann eine temporäre Vermeidung der Orte, an welchen der Infektionsherd, also die Clostridien sporen, vermutet werden, und eine sofortige Impfung des Restbestandes mit lokalspezifischer Vakzine weitere Verluste eindämmen oder verhindern.

Der bei dem Ausbruch aus verendeten Kühen isolierte Feldstamm *C. septicum* 2258 war zur Produktion eines lokalspezifischen Toxoidimpfstoffes verwendet worden. Der Impfstoff wurde mit Adjuvans auf Ölbasis (*Montanide ISA 206*, SEPPIC) versetzt. Der Zusatz von Öl-Adjuvantien bewirkte bei guter Verträglichkeit eine bessere Immunantwort in Schweinen, Rindern (BARNETT *et al.* 1996) und in Kaninchen (HERRERA *et al.* 1999) als der Zusatz von Aluminiumhydroxidlösungen. In der vorliegenden Arbeit wurden bei Einsatz des Öl-Adjuvans bereits nach der zweiten Impfung von Kaninchen mit Kulturüberstand des Referenzstammes zufriedenstellende Antikörpertiter in den Seren erzielt. Wurde mit Aluminiumhydroxid als Adju-

vans immunisiert, so waren drei Impfungen erforderlich. Dann allerdings war er Antikörpertiter in den Seren höher, als bei Verwendung des Öladjuvans.

Der Einsatz des stallspezifischen Impfstoffes verlief insofern erfolgreich, als über einen Zeitraum von drei Jahren keine weiteren *C. septicum*-Infektionen in dem betroffenen Betrieb auftraten.

Der Impferfolg sollte darüberhinaus an Hand der Antikörpertiter in den Rinderseren nachgewiesen werden. Ein Antikörperrnachweis in Form eines Toxinneutralisationstests ist durch den Tierversuch in Mäusen möglich. Auf Grund der zytotoxischen Eigenschaften des α -Toxins ist alternativ ein Neutralisationstest auf Basis von Zellkulturen durchführbar (KNIGHT *et al.* 1990, ROTH *et al.* 1999, RIDDELL *et al.* 1993). KNIGHT *et al.* (1990) zeigten, dass eine gute Korrelation zwischen den Ergebnissen der Zellkulturtests und dem Tierversuch besteht.

Im Rahmen der Arbeit wurde auf den Tierversuch verzichtet. Der Mäuseneutralisationstest wurde durch ein Verfahren mit sensitiven Zellkulturen ersetzt, das in der Lage ist, die schützenden Antikörper gegen das *C. septicum*- α -Toxin selektiv nachzuweisen.

Die Ergebnisse der Toxinneutralisationstests zeigten, dass alle Kühe des Bestandes bereits in den Seren, die vor der ersten Impfung mit der stallspezifischen Vakzine entnommen worden waren, spezifische Antikörper gegen das Toxin des *C. septicum*-Feldstammes aufwiesen.

In den im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Toxinneutralisationstests war gezeigt worden, dass die Toxizität des Feldstammes durch homologe Seren, aber auch durch Seren des Referenzstammes und kommerzielle Anti-*C. septicum*-Seren neutralisiert werden konnte. Ebenso konnten Seren von Kaninchen, die mit Toxoidvakzine des Feldstammes immunisiert worden waren, das Toxin des Referenzstammes NC 547 neutralisieren. Mittels des Zellkultureneutralisationstests konnte daher nicht mit Gewißheit differenziert werden, ob die Antikörper in den Seren vor der lokalspezifischen Vakzinierung auf Grund von Antigenkontakt während unbenannt gebliebener Infektionen produziert worden waren, oder ob sie aus der Reaktion auf die vorangegangene Impfung mit der kommerziellen Vakzine stammten.

Es war auch nicht möglich zu bestimmen, welcher Antikörpertiter in den Seren als schützend zu bewerten war. Dazu hätte eine Wirksamkeitsprüfung mit der Immunisierung von Kaninchen und dem Mäuseneutralisationstest durchgeführt werden müssen. Die Korrelation des Zelltests zum Mäusetest ist zu etablieren.

Der Immunschutz von Kälbern, die jünger als 6 Monate sind, ist auf passive Immunisierung durch die Aufnahme kolostraler maternaler Antikörper zurückzuführen (SEIFERT 1992, HJERPE 1990). Der Immunschutz hängt von der Menge der innerhalb von 48 h nach der Geburt (CLAUSEN *et al.*, ohne Jahresangabe) aufgenommenen kolostralen Antikörper ab (BULLEN 1967).

Die Fähigkeit einer Mutterkuh, Antikörper an den Nachwuchs abzugeben, hängt von ihrem eigenen Immunstatus bezüglich eines spezifischen Antigens und ihrer Gesamtkonstitution und -kondition ab.

Auch in den vorliegenden Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Kälber von Mutterkühen mit hohen Antikörpertitern gegen *C. septicum*-Antigene im Serum ihrerseits in der Regel höhere Titer im Serum aufwiesen, als Altersgenossen, deren Mütter niedrige Antikörpertiter oder eine schlechte Reaktion auf die Vakzinierung gezeigt hatten.

5 ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei *C. septicum*-Stämme zur Produktion von α -Toxin eingesetzt. Es handelte sich um einen Referenzstamm und einen aus einem lokalen Ausbruch von Geburtsrauschbrand isolierten Feldstamm. Die Stämme wurden zunächst durch konventionelle biochemische und gaschromatografische Verfahren, Fluoreszenzserologie und die Analyse spezifischer Gensequenzen charakterisiert, wobei die Eignung der verschiedenen Methoden überprüft wurde.

Das α -Toxin ist die letale Komponente im Überstand von *C. septicum*-Kulturen und das wichtigste Antigen. Es kann in Mäusetitrationstests nachgewiesen werden. Im Rahmen der Arbeit wurde als Alternative zum Tierversuch ein *in vitro*-Testsystem mit sensitiven Adhäsions-Säugerzellkulturen entwickelt. Verschiedene Zelllinien wurden auf ihre Sensitivität gegen das α -Toxin getestet. Hinterfragt wurden die Dauer der Kultivierbarkeit der Zelllinie und die Reaktion auf eine Reihe von Pufferlösungen, die in der Verarbeitung des zu prüfenden α -Toxins eine Rolle spielten.

Zur Kultivierung der toxinproduzierenden Stämme wurden Versuche mit verschiedenen Fermentationsverfahren und Inkubationsbedingungen im Göttinger Bioreaktor-System durchgeführt. Das Augenmerk lag dabei auf einer einfachen Kultivierbarkeit und auf einer maximalen Toxinausbeute. Der Einsatz eines Kaskaden-Cross-Flow-Filtrationssystems sollte eine effektive Reinigung und Konzentration der Ernten ermöglichen.

Das neu entwickelte Zellkulturtestsystem diente dem Nachweis und der Quantifizierung des α -Toxins. Die Untersuchungen sollten Aufschluß über den Erhalt der toxischen Aktivität des α -Toxins bei kurzer und mittelfristiger Lagerung geben. Der Einfluss von verschiedenen Lagerungspuffern und -temperaturen, Inkubation mit Trypsin, Filtration und Lyophilisation wurde geprüft.

Das α -Toxin des Referenzstammes wurde per Säulenchromatografie gereinigt. Die Molekülmasse, das immunologische Verhalten und die hämolytischen und mäuseletalen Eigenschaften des reinen α -Toxins wurden untersucht.

Aus dem *C. septicum*-Feldstamm wurde im Bioreaktor eine lokalspezifische Vakzine aus toxoidiertem Kulturüberstand hergestellt und in einem Milchviehbetrieb eingesetzt. Auf Basis des oben erwähnten Zellkulturtests wurde ein *in vitro*-Toxinneutralisationstest entwickelt. Der Antikörpertiter in den Seren der Kühe vor und nach Vakzinierung und in den Seren ihrer Kälber wurde in dem Toxinneutralisationstest geprüft.

Die Ergebnisse der Untersuchungen sind wie folgt:

- ◆ Beide untersuchten Stämme konnten durch einfache biochemische Untersuchungen der Gattung der Clostridien zugeordnet werden. Die Klassifizierung des Feldstammes auf Speziesebene, insbesondere die Differenzierung von *C. chauvoei*, gelang weder durch die gaschromatografische Analyse der langkettigen, zellwandständigen Fettsäuren, noch den Einsatz von fluoreszenzmarkierten Antikörpern. An Hand des in der Polymerasekettenreaktion amplifizierten α -Toxin-

Gens konnte die Identität des Feldstammes als *C. septicum* eindeutig belegt und eine Differenzierung beider Stämme von *C. chauvoei* vorgenommen werden.

- ◆ Die Zelllinie BHK21-BSR/PK5/88, eine Hybridlinie der BHK21-C13-Linie (Baby-Hamster-Nierenzellen), wurde im Vergleich zu fünf anderen Säuger-Zellkulturlinien als die empfindlichste gegen das α -Toxin von *C. septicum* herausgestellt und in einem *in vitro*-Toxizitätstest etabliert und standardisiert. Die selektierte Zelllinie zeichnete sich durch gutes, beständiges Wachstum aus. Mit der Linie wurden über bis zu 92 Passagen hinweg konstante Ergebnisse im Zytotoxizitätstest mit Proben des Laborstandard- α -Toxins nachgewiesen. Das Testprotokoll und die Kalkulationsmethode erbrachten reproduzierbare und aussagefähige Resultate, wenngleich insbesondere für hochtoxische Proben auf Grund des Verdünnungssystems in den Tests teilweise beträchtliche Standardabweichungen ermittelt wurden.
- ◆ Optimale Ausbeuten des α -Toxins des Referenz- und des Feldstammes wurden in diskontinuierlicher Kultur bei pH 7,2 im Göttinger Bioreaktor erzielt. Die Ernte der Kulturen erfolgte etwa zwei Stunden nach Wiederanstieg des in den Bakterien suspensionen kontinuierlich gemessenen Reduktions-Oxidations-Potenzials. Durch eine anschließende zweistufige Kaskadenfiltration erfolgte die Abtrennung der Bakterien vom Kulturüberstand und die Konzentration der Proteine >10 kDa im Kulturüberstand ohne Verluste an toxischer Aktivität.
- ◆ Die zelltoxischen Eigenschaften des α -Toxins gingen in aufgetautem Zustand rasch verloren, blieben jedoch bei Lagerung in gefrorenem Zustand in hohem Maße über Monate hinweg erhalten. Für den Referenzstamm konnte nachgewiesen werden, dass wiederholtes Auftauen und Wiedereinfrieren des toxischen Kulturüberstandes eine toxizitätsmindernde Wirkung hatte. Die Verluste lagen bei 60 %. Die Verdünnung von Toxinproben in H₂O bidest. erbrachte einen besseren Erhalt der Toxizität, als Verdünnungen in Diethanolamin- oder Phosphatpuffer (30 % resp. 50 % der Toxizität in H₂O bidest.). Die Verluste durch Lyophilisation von konzentrierten Lösungen waren tolerierbar (15 %), verdünnte Lösungen verloren erheblich an Toxizität (50-85 %).
- ◆ Die Reinigung des α -Toxins aus Kulturüberstand wurde in drei chromatografischen Schritten durchgeführt. Einem Anionenaustauschschritt folgten zwei Kationenaustauschschritte. Zwischen den Reinigungsstufen wurden die toxinhaltigen Fraktionen dialysiert. In den reinen Fraktionen konnte das α -Toxin in zwei Formen von 54 kDa resp. 48-50 kDa gelelektrophoretisch und immunologisch nachgewiesen werden. Es kam darüberhinaus zur Bildung hochmolekularer Aggregate. Das gereinigte α -Toxin war hämolytisch, zytotoxisch und mäuseletal.
- ◆ Ein *in vitro*-Toxinneutralisationstest mit Zellkulturen, basierend auf dem oben beschriebenen Zytotoxizitätstest, wurde entwickelt. Die Seren der Kühe und Kälber, die mit der lokalspezifischen Vakzine geimpft worden waren, wurden mit dem neuen *in vitro*-Testsystem untersucht. Antikörper konnten reproduzierbar nachgewiesen werden. In den Seren der Muttertiere konnten bereits vor der ersten Vakzinierung Antikörper nachgewiesen werden. Bei zwei Dritteln der Kühe erhöhte sich der Antikörpertiter nach der Impfung. In den Seren der Kälber von geimpften Muttertieren konnten Antikörper nachgewiesen werden. Die höchsten

Antikörpertiter wiesen Kälber von Muttertieren auf, die bereit in den Seren vor der ersten Impfung einen hohen Antikörpertiter gehabt hatten und auf die Impfung mit einer Erhöhung des Antikörperspiegels reagierten.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J.D., 1990: Molekularbiologie der Zelle. 2. Aufl., VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim
- Al-Khatib, G., 1968: Beiträge zur Clostridiendifferenzierung IV. Nachweise und Neutralisation der Hämolyse pathogener Clostridien. Arch. Exp. Vet. Med. 22, 1107-1113
- Al-Khatib, G., 1969: Beiträge zur Clostridiendifferenzierung IV. Zur Differenzierung von *Clostridium septicum* und *Clostridium chauvoei*. Arch. Exp. Vet. Med. 23, 963-970
- Andersson, M.A., Nikulin, M., Kõljalg, U., Andersson, M.C., Rainey, F., Reijula, K., Hintikka, E.L., Salkinoja-Salonen, M., 1997: Bacteria, molds, and toxins in water-damaged building materials. Appl. Environ. Microbiol. 63, 387-393
- Ardehali, M., Moosawi, M., Avazpoor, J., 1988: Isolation, typing and rapid diagnosis of pathogenic Clostridia from infected animals in Iran. Arch. Inst. Razi 38-39, 35-42
- Artiges, A., 1999: Alternatives to animals in the development and control of biological products for human and veterinary use. Dev. Biol. Standard. 101, 29-35
- Attebery, H.R., Sutter, V.L., Finegold, S.M., 1974: Normal human intestinal flora. In: Balows, A., Dehaan, R.M., Dowell, V.R., Guze, L.B. (Eds.): Anaerobic bacteria, role in disease. Thomas, Springfield, 81-97
- Babiker, S.E.D.H., 1991: Investigations for the production and potency testing of locality specific vaccines against blackquarter disease in the Sudan. Gött. Beitr. Land- Forstwirtschaft. Trop. Subtrop. 65
- Ballard, J., Bryant, D., Stevens, D., Tweten, R.K., 1992: Purification and characterization of the lethal toxin (alpha-toxin) of *Clostridium septicum*. Infect. Imm. 60, 784-790
- Ballard, J., Crabtree, J., Roe, B.A., Tweten, R.K., 1995: The primary structure of *Clostridium septicum* alpha-toxin exhibits similarity with that of *Aeromonas hydrophila* Aerolysin. Infect. Imm. 63, 340-344
- Ballard, J., Sokolov, Y., Yuan, W.-L., Kagan, B.L., Tweten, R.K., 1993: Activation and mechanism of *Clostridium septicum* alpha toxin. Mol. Microbiol. 10, 627-634
- Barnett, P.V., Pullen, L., Williams, L., Doel, T.R., 1996: International bank for foot-and-mouth disease vaccine: Assessment of Montanide ISA 25 and ISA 206, two commercially available oil adjuvants. Vaccine 14, 1187-1198
- Batty, I., Walker, P.D., 1963: Differentiation of *Clostridium septicum* and *Clostridium chauvoei* by the use of fluorescent labelled antibodies. J. Path. Bact. 85, 517-521

- Bernheimer, A.W., 1944: Parallelism in the lethal and hemolytic activity of the toxin of *Clostridium septicum*. *J. Exp. Med.* 80, 309-320
- Bernheimer, A.W., 1970: Cytolytic toxins of bacteria. In: *Microbial toxins*. Academ. Press, New York, 183-212
- Bernheimer, A.W., Avigad, L.S., 1974: Partial characterization of aerolysin, a lytic exotoxin from *Aeromonas hydrophila*. *Infect. Immun.* 9, 1016-1021
- Berry, A.M., Lock, R.A., Paton, J.C., 1996: Cloning and characterization of *nanB*, a second *Streptococcus pneumoniae* neuraminidase gene, and purification of the NanB enzyme from recombinant *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 178, 4854-4860
- Böhnel, H., 1986: Methodische Untersuchungen zur Herstellung von Toxoidvakzinen gegen Clostridiosen der Wiederkäuer. Habilitationsschrift, FB Agrarwissenschaften, Universität Göttingen
- Böhnel, H., 1988: Die Toxine der Clostridien. *J. Vet. Med.* 35, 29-47
- Bourgeau, G., Lapointe, H., Péloquin, P., Mayrand, D., 1992: Cloning, expression and sequencing of a protease gene (*tp*) from *Porphyromonas gingivalis* W83 in *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 60, 3186-3192
- Brazier, J.S., Levett, P.N., Stannard, A.J., Phillips, K.D., Willis, A.T., 1985: Antibiotic susceptibility of clinical isolates of clostridia. *Brit. Soc. Antimicrob. Chemother.* 15, 181-185
- Brdička, R., 1988: Grundlagen der physikalischen Chemie. 15. Aufl., VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin
- Briese, B.H., 1997: Charakterisierung der Poly(3-Hydroxybutyrat)-Depolymerase A aus *Pseudomonas lemoignei*. Diss. rer. nat., Universität Göttingen
- British Pharmacopoeia, 1988: Biological assay for gas gangrene antitoxin (septicum). II App. 14B5 A155
- Brooks, J.B., Selin, M.J., Alley, C.C., 1976: Electron capture gas chromatography study of the acid and alcohol products of *Clostridium septicum* and *Clostridium chauvoei*. *J. Clin. Microbiol.* 3, 180-185
- Buckley, J.T., Halasa, L.N., Lund, K.D., MacIntyre, S., 1981: Purification and some properties of the hemolytic toxin aerolysin. *Can. J. Biochem.* 59, 430-435
- Bullen, J.J., 1967: Role of toxins in host-parasite relationships. *Symp. Ser. Immunobiol. Standard.* 6, 233-276
- Bullen, J.J., Cushnie, G.H., 1962: Experimental gas gangrene: the effect of antiserum on the growth of *Clostridium welchii* type A. *J. Pathol. Bacteriol.* 84, 177-192

- Cardella, M.A., Kolbe, D.R., 1976: Potency testing of *Clostridium septicum* bacterins in sheep and laboratory animals. *Dev. Biol. Standard.* 32, 115-122
- Cato, E.P., George, W.L., Finegold, S.M., 1986: Genus *Clostridium* Prazmowski 1880 23^{AL}. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 2, Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E., Holt, J.G. (Eds.), Williams + Wilkins, Baltimore, 1181
- Cebula, T.A., LeClerc, J.E., 1997: Hypermutability and homologous recombination: Ingredients for rapid evolution. *Bull. Inst. Pasteur* 95, 97-106
- Chaudhuri, P., Gupta, R., Singh, S.D., 1995: DNA-homology between plasmids of *Clostridium septicum* and *Clostridium chauvoei*. *Indian Vet. Med. J.* 19, 131-134
- Claus, K.D., Kolbe, D.R., 1979: Immunogenicity of *Clostridium septicum* in guinea pigs. *Am. J. Vet. Res.* 40, 1752-1756
- Clausen, P.-H., Salchow, F., Staak, C., ohne Jahresangabe: Measurement of neonatal γ -globulin for assessment of colostral immunoglobulin transfer. The zinc sulphate turbidity test. XIth Information from the GTZ-BGA Service-Laboratory, Robert von Ostertag-Institut, Berlin
- Collins, M.D., Lawson, P.D., Willems, A., Cordoba, J.J., Fernandez-Garayzabal, J., Garcia, P., Cai, J., Hippe, H., Farrow, J.A.E., 1994: The phylogeny of the genus *Clostridium*: proposal of five new genera and eleven new species combinations. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44, 812-826
- Corbel, M.J., 1996: Reasons for instability of bacterial vaccines. *Dev. Biol. Standard.* 87, 113-124
- Cortiñas, T.I., Mattar, M.A., de Guzman, A.M.S., 1997: Alpha-toxin production by *Clostridium septicum* at different culture conditions. *Anaerobe* 3, 199-202
- Cortiñas, T.I., Micalizzi, B., de Guzman, A.M.S., 1994: Influence of culture conditions on growth and protective antigenicity of *Clostridium septicum*. *J. Appl. Bacteriol.* 77, 382-387
- Cussler, K., 1999: A 4R concept for the safety testing of immunobiologicals. *Dev. Biol. Standard.* 101, 121-126
- Cygan, Z., 1990: Immunogenicity of an autovaccine Closeptivac prepared against braxy. *Medyc. Weteryn.* 46, 6-8
- Deubler, P., 1982: Methodische Untersuchungen zur Herstellung von Toxoidvakzinen mit Hilfe der Kaskadenultrafiltration. *Diss. med. vet.*, Universität Gießen
- Deutsches Arzneibuch, 1992: Monografie: Gasbrand-Antitoxin (*Clostridium septicum*). *Deutscher Arzneibuch Verlag, Stuttgart*, 10. Ausgabe

- Ebert, E., 1998: Gesetzlich vorgeschriebene Tierversuche zur Wirksamkeitsprüfung von *Clostridium perfringens*-Immunpräparaten: Entwicklung und Prävalidierung von Alternativmethoden. Diss. rer. nat., Universität Frankfurt M.
- Eder, J., Fersht, A.R., 1995: Pro-sequence assisted protein folding. *Mol. Microbiol.* 16, 609-614
- Elbashir, S.M., 1993: Production of vaccine against haemorrhagic septicaemia (HS) with Göttingen Bioreaktor technology using local Sudanese *Pasteurella multocida* strains B and E. *Gött. Beitr. Land- Forstwirtschaft. Trop. Subtrop.* 88
- Elizondo Herrera, A., 1993: Untersuchungen zur Anwendungsmöglichkeit einer zweistufigen Cross-Flow-Filtrationsanlage zur Reinigung und Konzentrierung von MKS- und Tollwutviren. *Gött. Beitr. Land- Forstwirtschaft. Trop. Subtrop.* 86
- Elliot, S.L., Pye, S., Le, T., Mateo, L., Cox, J., MacDonald, L., Scalzo, A., Forbes, C.A., Suhrbier, A., 1999: Peptide based cytotoxic T-cell vaccines; delivery of multiple epitopes, help, memory and problems. *Vaccine* 17, 2009-2019
- Elwell, L.P., Shipley, P.L., 1980: Plasmid-mediated factors associated with virulence of bacteria to animals. *Ann. Rev. Microbiol.* 34, 465-496
- European Pharmacopoeia, 1997: Monographs on clostridial vaccines and sera
- European Pharmacopoeia, 1997: *Clostridium septicum* vaccines for veterinary use. 0364
- Evans, D.G., 1945: The in-vitro production of alpha-toxin, theta-haemolysin and hyaluronidase by strains of *Cl. welchii* type A, and the relationship of in-vitro properties to virulence in guinea pigs. *J. Path. Bact.* 57, 75-85
- Fawthrop, D., 1996: Regulatory requirements for veterinary vaccine stability in the European community. *Dev. Biol. Standard.* 87, 319-327
- Fenyves, A., 1996: Regulatory practices and problems with vaccine stability studies and the establishment of shelf lives. *Dev. Biol. Standard.* 87, 329-334
- Festing, M.F.W., 1999: Reduction in animal use in the production and testing of biologicals. *Dev. Biol. Standard.* 101, 195-200
- Fildes, P., 1929: Tetanus. –IX. The oxidation-reduction potential of the subcutaneous tissue fluid of the guinea-pig; its effect on infection. *Brit. J. Exp. Pathol.* 10, 197-204
- Finlay, B.B., Falkow, S., 1997: Common themes in microbial pathogenicity revisited. *Microbiol. Molec. Biol. Rev.* 61, 136-156
- Fraser, A.G., 1978: Neuraminidase production by clostridia. *J. Med. Microbiol.* 11, 269-280

- Freer, J.H., 1986: Membrane damage caused by bacterial toxins: recent avances and new challenges. In: Natural toxins animal, plant, and microbial. 189-211, J.B. Harris (Ed.), Clarendon Press, Oxford
- Frerichs, G.N., Gray, A.K., 1975: The relation between the rabbit potency test and the response of sheep to sheep clostridial vaccines. *Res. Vet. Sci.* 18, 70-75
- Fussenegger, M., 1997: Different lifestyles of human pathogenic procaryotes and their strategies for phase and antigenic variation - Review article. *Symbiosis* 22, 85-153
- Gabay, E. L., Rolfe, R.L., Finegold, S.M., 1981: Susceptibility of *Clostridium septicum* to 23 antimicrobial agents. *Antimicr. Ag. Chemother.* 20, 852-853
- Gadalla, M.S., Collee, J.G., 1968: The nature and properties of the haemagglutinin of *Clostridium septicum*. *J. Pathol. Bacteriol.* 93, 255-274
- Garcia, M.M., McKay, K.A., 1969: On the Growth and Survival of *Clostridium septicum* in Soil. *J. appl. Bact.* 32, 362-370
- Gessler, F.A., 1994: Untersuchungen zur Differenzierung von *Bacillus cereus*-Stämmen unterschiedlicher Herkunft und Bedeutung. Diss. med. vet. Universität München
- Giercke-Sygusch, S., 1987: Untersuchungen zur Erstellung eines Atlas anaerober Bakterien. *Gött. Beitr. Land. Forstwirtschaft. Trop. Subtrop.* 20
- Ginsburg, I., Ward, P., Varani, J., 1999: Can we learn from the pathogenetic strategies of group A hemolytic streptococci how tissues are injured and organs fail in post-infectious and inflammatory sequelae? *FEMS Immun. Med. Microbiol.* 25, 325-338
- Glenny, A.T., Llewellyn-Jones, M., Mason, J.H., 1931: The intracutaneous method of testing the toxins and antitoxins of the "gas gangrene" organisms. *J. Pathol. Bacteriol.* 34, 201-211
- Golovlev, E.L., 1998: Phenotype metastability in bacteria. *Microbiology* 67, 119-124
- Goot, F.G. van der, Hardie, K.R., Parker, M.W., Buckley, J.T., 1994: The C-terminal peptide produced upon proteolytic activation of the cytolytic toxin aerolysin is not involved in channel formation. *J. Biol. Chem.* 269, 30496-30501
- Gordon, V.M., Benz, R., Fujii, K., Leppla, S.H., Tweten, R.K., 1997: *Clostridium septicum* alpha-toxin is proteolytically activated by furin. *Infect. Imm.* 65, 4130-4134
- Grässer, A., 1964: Probleme bei der Toxingewinnung aus *Clostridium-septicum*-Kulturen. Kurzvortrag zur Wissenschaftlichen Tagung am 11.-12.5.1964 anlässlich des 10-jährigen Bestehens des Forschungsinstitutes für Impfstoffe Dessau

- Gryaznova, D.V., Nikolaeva, A.M., Efimova, N.P., 1998: Detection of the causative agents of the main anaerobic gas infection with the use of the enzyme immunoassay. *Z. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 0, 36-39
- Gupta, R.K., 1980: Antibody response to streptolysin O in mammals. *J. Inf. Dis.* 142, 624
- Gustafsson, K., Uggla, A., Svensson, T., Sjöland, L., 1988: Detection of *Toxoplasma gondii* in liver tissue sections from brown hares (*Lepus europaeus* P.) and mountain hares (*Lepus timidus* L.) using the peroxidase anti-peroxidase (PAP) technique as a complement to conventional histopathology. *J. Vet. Med.* 35, 402-407
- Guzman, A.M.S. de, Micalizzi, B., 1992: Diagnóstico de la mancha por inmunofluorescencia directa en médula ósea de bovino. *Rev. Lat.-amer. Microbiol.* 34, 87-89
- Haase, M., 1996: Stability testing requirements for vaccines - draft guidelines of the international conference on harmonization. *Dev. Biol. Standard.* 87, 309-318
- Hamaoka, T., Terakado, N., Nakamura, S., 1994: Diversity in molecular mass of the common EDTA-soluble antigens of *Clostridium chauvoei* and *Clostridium septicum*. *Microbiol. Immunol.* 38, 149-152
- Harbola, P.C., Kumar, A.A., 1990: Clostridial infections in animals. *Indian Vet. Med. J.* 14, 162-166
- Harris, R.W., Sims, P.J., Tweten, R.K., 1991: Kinetic aspects of the aggregation of *Clostridium perfringens* θ -toxin on erythrocyte membranes: a fluorescence energy transfer study. *J. Biol. Chem.* 266, 6936-6941
- Harwood, D.G., 1996: Clostridium disease. A diagnostic dilemma. *Goat Vet. Soc. J.* 16, 26-30
- Hasan, S.M., Hall, J.B., 1976: Growth of *Clostridium tertium* and *Clostridium septicum* in chemically defined media. *Appl. Env. Microbiol.* 31, 442-443
- Hashim, O.H., Hassan, H., 1991: Actions of three clostridial IgA proteases on distinct forms of immunoglobulin A molecules. *Immunology* 73, 235-238
- Hatheway, C.L., 1990: Toxigenic Clostridia. *Clin. Microbiol. Rev.* 3, 66-98
- Häusser, V., 1989: Methodische Untersuchungen zur kontinuierlichen Kultivierung von *Mycoplasma mycoides* ssp. *mycoides* im Göttinger Bioreaktor. *Gött. Beitr. Land- Forstwirtsch. Trop. Subtrop.* 45
- Hawkins, C., Riley, J.L., 1997: Spontaneous gas gangrene: an unusual complication of colonic carcinoma. *Clin. Oncol. Res. Coll. Radiol.* 9, 184-185
- Heitefuß, S., 1991: Untersuchungen zur Identifizierung von aeroben, anaeroben und fakultativ anaeroben Bakterien mit gaschromatographischen Methoden. *Gött. Beitr. Land- Forstwirtsch. Trop. Subtrop.* 57

- Henderson, D.W., 1933: Studies on *Clostridium chauvoei*. III. Passive protection with pure „O“ sera. *Brit. J. Exp. Pathol.* 14, 108-112
- Henderson, D.W., 1935: The prophylaxis of experimental V. septique infection and the practical application of antibacterial methods. *Brit. J. Exp. Pathol.* 16, 393-405
- Henderson, D.W., 1937: A serological analysis of the protective substances in specific antibacterial sera which control experimental infection with *Clostridium oedematis maligni* (Vibrion septique). *Brit. J. Exp. Pathol.* 18, 224-236
- Hendrick, J.P., Hartl, F.-U., 1993: Molecular chaperone functions of heat shock proteins. *Ann. Rev. Biochem.* 62, 349-384
- Hepple, J.R., 1967: Aluminium hydroxide as an adjuvant for clostridial vaccines. *Immunobiol. Standard.* 6, 173-180
- Herdning-Sotzeck, B., 1998: Identifizierung von *Clostridium*-Spezies mittels der Fourier-Transform-Infrarotspektroskopie. Diss. oec. troph. Universität Bonn, D 98 (Diss. Universität Bonn), Shaker-Verlag, Aachen
- Herrera, A., Vazquez, D., Navea, L., Lobaina, L., Quintana, D., Napoles, A., Garcia, Y., Duarte, C.A., 1999: Effect of different adjuvants and immunomodulators on the humoral immune response of rabbits and mice against HIV-1-derived multi-epitope polypeptides. *Biotec. Apl.* 16, 103-108
- Hjerpe, C.A., 1990: Clostridial disease vaccines. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 6, 222-234
- Hnátková, Z., Vraný, B., Hnátek, J., Lettl, A., 1986: Preparation of *Clostridium septicum* antigen for horse immunization by using dialyzed culture. *Folia Microbiol.* 31, 382-386
- Hodgson, A.M.L., Radford, A.J., 1993: Conventional and contemporary bacterial veterinary vaccines. *Vet. Vacc.* 4, 200-239
- Holdeman, L.V., Cato, E.P., Moore, W.E.C., 1977: *Anaerobe laboratory manual*. 4th Ed. Blacksburg, Virginia
- Holdeman, L.V., Good, I.J., Moore, W.E.C., 1976: Human fecal flora: Variations in bacterial composition within individuals and a possible effect of emotional stress. *Appl. Environ. Microbiol.* 31, 359-375
- Hong, H.A., Hendriks, J., 1999: The use of alternatives to animal tests in developing countries. *Dev. Biol. Standard.* 101, 209-214
- Howard, S.P., Buckley, J.T., 1982: Membrane glycoprotein receptor and hole-forming properties of a cytolytic protein toxin. *Biochem.* 21, 1662-1667
- Howard, S.P., Buckley, J.T., 1985: Activation of the hole-forming toxin aerolysin by extracellular processing. *J. Bacteriol.* 163, 336-340

- Hucker, C., 1979: Gram's stain (Hucker's modification). In: Diagnostic procedures in veterinary bacteriology and mycology. 3rd ed., Thomas, Springfield, 389-390
- Idrissi, A.H. el, Ward, G.E., Johnson, D.W., Benkirane, A., Fassi-Fehri, M.M., 1992: Bacteriological investigation of sudden sheep mortality in Morocco. *Prevent. Vet. Med.* 12, 35-46
- Imagawa, T., Dohi, Y., Higashi, Y., 1994: Cloning, nucleotide sequence and expression of a hemolysine gene of *Clostridium septicum*. *FEMS Microbiol. Letters* 117, 287-292
- Jacob, H.E., 1970: Redox potential. In: *Methods in Microbiology*. Norris, J.R., Ribbons, D.W. (eds.), Academic Press, London, 92-123
- Jansen, K., Roth, F., Petzke, S., 1998: Entwicklung eines Zytotoxinhemmungstests zum Nachweis von Antikörpern gegen das α -Toxin von *Clostridium septicum* in Seren. *ALTEX* 15, 56-59
- Johnson, S., 1997: Antibody responses to clostridial infection in humans. *Clin. Infect. Dis.* 25, 173-177
- Johnson, S., Driks, M.R., Tweten, R.K., 1994: Clinical courses of seven survivors of *Clostridium septicum* infection and their immunologic responses to α -toxin. *Clin. Infect. Dis.* 19, 716-764
- Jones, S.L., Wilson, W.D., 1993: *Clostridium septicum* septicemia in a neonatal foal with hemorrhagic enteritis. *Cornell Vet.* 2, 143-151
- Katlic, M.R., Derkac, W.M., Coleman, W.S., 1981: *Clostridium septicum* infection and malignancy. *Ann. Surg.* 193, 361-364
- Keim, A.A.M., 1983: Untersuchungen zum Einfluss unterschiedlicher C-Quellen im Nährmedium auf das Toxinbildungsvermögen pathogener Clostridien. *Diss. med. vet. Tierärztliche Hochschule Hannover*
- Kemeny, D.M., 1994: ELISA Anwendung des enzyme linked immunosorbent assay im biologisch/medizinischen Labor. Fischer Verlag, Stuttgart
- Kennedy, K., 1976: Preparation and evaluation of *Clostridium septicum* toxoid. *Dev. Biol. Standard.* 32, 123-130
- Knight, P.A., Burnett, C., Whitaker, A.M., Queminet, J., 1986: The titration of clostridial toxoids and antisera in cell culture. *Dev. Biol. Standard.* 64, 129-136
- Knight, P.A., Tilleray, J.H., Queminet, J., 1990: In vitro tests for the measurement of veterinary clostridial toxins, toxoids and antisera. 1: Titration of *Clostridium septicum* toxins and antitoxins in cell culture. *Biologicals* 18, 181-189

- Koch, K., Böhm, R., Strauch, D., 1978: The differentiation of clostridial microcultures on nucleopore-filters by fluorescent antibodies as a rapid screening test for spores. I. Method of producing microcultures. *Zbl. Bakteriol. Orig. A.* 241, 448-462
- Koransky, J.R., Stargel, M.D., Dowell, V.R., 1979: *Clostridium septicum* bacteraemia, its clinical significance. *Am. J. Med.* 66, 63-66
- Krämer, J., Schallehn, G., 1974: Enterocinwirkung auf *Clostridium perfringens* und *Clostridium septicum*. *Zbl. Bakt. Hyg., I.Abt. Orig. A* 226, 105-113
- Kreeftenberg, J.G., 1998: Developments in the reduction, refinement, and replacement of animal tests in the quality control of immunobiologicals. *Dev. Biol. Standard.* 101, 13-17
- Kuhnert, P., Capaul, S.E., Nicolet, J., Frey, J., 1996: Phylogenetic positions of *Clostridium chauvoei* and *Clostridium septicum* based on 16S rRNA gene sequences. *Intern. J. System. Bacteriol.* 46, 1174-1176
- Kuhnert, P., Krampe, M., Capaul, S.E., Frey, J., Nicolet, J., 1997: Identification of *Clostridium chauvoei* in cultures and clinical material from blackleg using PCR. *Vet. Microbiol.* 51, 291-298
- Laemmli, U.K., 1970: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T 4. *Nature* 227, 680-685
- Laird, W.J., Aaronson, W., Silver, R.P., Habig, W.H., Hardegree, M.C., 1980: Plasmid associated toxigenicity in *Clostridium tetani*. *J. Infect. Dis.* 142, 623-624
- Larson, H.E., Price, A.B., 1977: Pseudomembraneous colitis: presence of clostridial toxin. *Lancet*, 1312-1314
- Lawrence, G.W., Saul, A., Giddy, A.J., Kemp, R., Pye, D., 1997: Phase I trial in humans of an oil based adjuvant SEPPIC Montanide ISA 720. *Vaccine* 15, 176-178
- Leenaars, M., Koedam, M.A., Hendriksen, C.F.M., Claasen, E., 1998: Immune responses and side effects of five different oil-based adjuvants in mice. *Vet. Immunol. Immunopath.* 61, 291-304
- Lemercinier, X., Crane, D., Gee, C., Austin, S., Bolgiano, B., Jones, C., 1999: New methods for the characterisation of biopharmaceuticals: conjugate vaccines against *Haemophilus influenzae* type b. *Dev. Biol. Standard.* 101, 177-183
- Lindberg, A.A., Pillai, S., 1996: Recent trends in the developments of bacterial vaccines. *Dev. Biol. Standard.* 87, 59-71
- Lindl, T., Bauer, J., 1987: *Zell- und Gewebekultur*. Fischer Verlag, Stuttgart
- Lowry, J.R., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275

- Lucken, R.N., 1999: Alternatives to in vivo potency and protection tests for veterinary vaccines. *Dev. Biol. Standard.* 101, 67-72
- Maas, W.K., 1977: Genetics of toxin production by bacteria. In: *Perspectives in toxinology*, Bernheimer, A.W. (Ed.), New York, 1-14
- MacLennan, J.L., 1962: The histotoxic clostridial infections of man. *Bact. Rev.* 26, 177-274
- Meiners, M., 1990: *Biotechnologie für Ingenieure. Grundlagen Verfahren Aufgaben Perspektiven.* Vieweg, Braunschweig
- Milstien, J.B., Dellepiane, N., 1999: Alternatives and developing countries. *Dev. Biol. Standard.* 101, 203-208
- Miyamura, K., Nishio, S., Ito, A., Murata, R., Kono, R., 1974 a: Micro cell culture method for determination of diphtheria toxin and antitoxin titers using VERO cell. I. Studies of factors affecting the toxin and antitoxin titration. *J. Biol. Standard.* 2, 189-201
- Miyamura, K., Tajiri, E., Ito, A., Murata, R., Kono, R., 1974 b: Micro cell culture method for determination of diphtheria toxin and antitoxin titers using VERO cell. II. Comparison with the rabbit skin method and practical application for sero-epidemiological studies. *J. Biol. Standard.* 2, 203-209
- Morgan, K.L., Green, D.S., Green, N.J., Hillyer, M.H., 1987: The injection site reaction and antibody response in sheep and goats following the use of multivalent clostridial vaccines. In: *Goat production in the humid tropics. Proc. Workshop University Ile-Ife, Nigeria*, 117-124
- Moussa, R.S., 1958: Complexity of toxins from *Clostridium septicum* and *Clostridium chauvoei*. *J. Path. Bact.* 76, 538-545
- Moussa, R.S., 1959: Antigenic formulae for *Clostridium septicum* and *Clostridium chauvoei*. *J. Path. Bact.* 77, 341-350
- Müller, H.E., 1970: Über einen Nachweis in vitro und die Wirkung in vivo von Neuraminidase bei *Clostridium septicum*. *Zbl. Bakt., I.Abt. Orig* 215, 530-535
- Müller, H.E., 1976: Neuraminidase als Pathogenitätsfaktor bei mikrobiellen Infektionen. *Zbl. Bakt. Hyg. I A* 235, 106-110
- Munang'Andu, H.M., Muyoyeta, P.M., Mweene, A.S., Kida, H., 1996: Bovine clostridial infections in Zambia (1985-1994). *Jap. J. Vet. Res.* 44, 175-178
- Nakamura, S., Tanabe, N., Yamakawa, K., Nishida, S., 1983: Cytotoxin production by *Clostridium sordellii* strains. *Microbiol. Immunol.* 27, 495-502
- Nißlein, T.E., 1993: Produktion von Tollwutvirus in einem kontinuierlichen Zellsystem. *Gött. Beitr. Land- Forstwirtschaft. Trop. Subtrop.* 82

- Nord, C.E., 1982: Anaerobic bacteria in septicaemia and endocarditis. *Scand. J. Inf. Dis.* 31, 95-104
- Norris, J.R., Ribbens, D.W. (Ed.), 1970: *Methods in Microbiology* 2, 91-123, Academic Press, London
- Oakley, C.L., 1970: Relative toxicities and assay systems. In: *Microbial toxins*, Vol 1. Bacterial protein toxins. , 355-387. Aijl, S., Kadis, S., Montie, T.C. (Eds.), Academic Press, New York
- Parker, M.W., Buckley, J.T., Postma, J.P., Tucker, A.D., Leonard, K., Pattus, F., Tsernoglou, D., 1994: Structure of the *Aeromonas* toxin proaerolysin in its water-soluble and membrane-channel states. *Nature* 367, 292-295
- Parker, M.W., Goot, F.G. van der, Buckley, J.T., 1996: Aerolysin – the ins an outs of a model channel-forming toxin. *Mol. Microbiol.* 19, 205-212
- Petre, J., Pizza, M., Nencioni, L., Podda, A., Magistris, M.T. de, Rappuoli, R., 1996: The reaction of bacterial toxins with formaldehyde and its use for antigen stabilization. *Dev. Biol. Standard.* 87, 125-134
- Pinto, M.P., Abreu, V.L.V., 1992: Comparação de técnicas para preparo de conjugados anti-*Clostridium septicum* e anti-*Clostridium chauvoei*. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.* 44, 513-520
- Potter, A.A., Babiuk, L.A., 1993: Conventional and biotechnically engineered bovine vaccines. *Vet. Vaccines.* 4, 240-287
- Pranter, W., Engelhardt, H., Zwisler, O., 1971: Die immunologische Wirksamkeit des Toxoids von *Clostridium septicum* im Tierversuch. *Med. Microbiol. Immunol.* 157, 75-83
- Princewill, T.J.T., Oakley, C.L., 1976: Deoxyribonucleases and hyaluronidases of *Clostridium septicum* and *Clostridium chauvoei*. *Med. Lab. Sci.* 33, 105-118
- Raya, N.E., Quintana, D., Carrazana, Y., Gomez, C., Duarte, C.A., 1999: A prime-boost regime that combines Montanide ISA 720 and Alhydrogel to induce antibodies against the HIV-1 derived multiepitope polypeptide TAB9. *Vaccine* 17, 2646-2650
- Reichmann, J., Wildführ, G., Spencker, F.-B., 1973: Nichttraumatische Infektion durch *Clostridium septicum*. *Zbl. Chir.* 98, 936-938
- Riddell, S.W., Miles, B.L., Skitt, B.L., Allen, S.D., 1993: Histopathological effects of culture filtrates of *Clostridium septicum* in rabbit intestinal loops. *Clin. Infect. Dis.* 16, 211-213
- Robertson, M., Felix, A., 1930: Serological studies in the group of the spore-bearing anaerobes II. In vivo experiments with an „O“ immune serum to *Vibrion septique* devoid of antitoxin content. *Brit. J. Exp. Path.* 11, 14-23

- Roggentin, P., Gutschker-Gdaniec, G.H.M., Hobrecht, R., Schauer, R., 1988: Early diagnosis of clostridial gas gangrene using sialidase antibodies. *Clin. Chim. Acta* 173, 251-262
- Roggentin, P., Hobrecht, R., Tirpitz, D., Rothe, B., Schauer, R., 1991: Application of Sialidase antibodies for the diagnosis of clostridial infections. *Clin. Chim. Acta* 196, 97-106
- Rood, J.I., 1983: Transferable tetracycline resistance in *Clostridium perfringens* strains of porcine origin. *Can. J. Microbiol.* 29, 1241-1246
- Rossjohn, J., Feil, S.C., McKinstry, W.J., Tsernoglou, D., Goot, F.G. van der, Buckley, J.T., Parker, M.W., 1998: Aerolysin - a paradigm for membrane insertion of beta-sheet protein toxins? *J. Struct. Biol.* 121, 92-100
- Roth, F., 1986: Methodische Untersuchungen zur Optimierung der Herstellung von Toxoidvakzinen im Göttinger Bioreaktor-Verfahren. *Gött. Beitr. Land. Forst-wirtschaft. Trop. Subtrop.* 18
- Roth, F., 2000: mdl. Mitteilung
- Roth, F., Jansen, K., Petzke, S., 1999: Detection of neutralizing antibodies against alpha-toxin of different *C. septicum* strains in cell culture. *FEMS Immun. Med. Microbiol.* 24, 353-359
- Rothe, B., Rothe, B., Roggentin, P., Schauer, R., 1991: The sialidase gene from *Clostridium septicum*: cloning, sequencing, expression in *Escherichia coli* and identification of conserved sequences in sialidasases and other proteins. *Mol. Gen. Genet.* 226, 190-197
- Russell, W.M.S., Burch, R.L., 1959: The principles of humane experimental technique. Mehtuen, London
- Saier, H.-D., Strathmann, H., 1975: Asymmetrisch strukturierte Membranen – Herstellung und Bedeutung. *Angew. Chem.* 13, 476-483
- Schallehn, G., 1975: Bacteriocine von *Clostridium septicum*. *Zbl. Bakt. Hyg. I.Abt. Orig. A* 233, 542-552
- Schallehn, G., 1978: Die Sporenbildner. In: *Lehrbuch der Medizinischen Mikrobiologie*. Otte, H.J., Brandis, H. (Eds.), Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 313-330
- Schallehn, G., Brandis, H., 1985: Die Bedeutung von *Clostridium septicum* als Gasödemerreger. *Immun. Infekt.* 13, 3-8
- Schallehn, G., Krämer, J., 1975: Studies on the mode of action of a bacteriocin from *Clostridium septicum*. *Can. J. Microbiol.* 22, 435-437

- Schaper, R., 1991: Methodische Untersuchungen zur Produktions- und Wirksamkeitskontrolle von Rauschbrandvakzinen. Gött. Beitr. Land- Forstwirtschaft. Trop. Subtrop. 61
- Schauer, R., 1982: Chemistry, metabolism, and biological functions of sialic acids. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 40, 131-234
- Schauer, R., Jancik, J.M., Wember, M., 1979: Occurrence of neuraminidase activity in the serum of patients infected with clostridia (gas oedema). *Glycoconjugates. Proc. Vth Int. Symp.* Georg Thieme, Stuttgart, 362-363
- Schauer, R., Sander-Wewer, M., Gutschker-Gdaniec, G.H.M., Roggentin, P., Radow, E.A., Hobrecht, R., 1985: Sialidase activity in the sera of patients and rabbits with clostridial myonecrosis. *Clin. Chim. Act.* 146, 119-127
- Schlegel, H.G., 1985: *Allgemeine Mikrobiologie*. 6. Aufl., Thieme Verlag Stuttgart
- Schoub, B.D., Cameron, N.A., 1996: Problems encountered in the delivery and storage of OPV in an African country. *Dev. Biol. Standard.* 87, 27-32
- Scopes, R.K., 1994: *Protein purification principles and practice*. 3rd ed., Springer Verlag New York
- Seifert, H.S.H., 1992: *Tropentierhygiene*. Fischer Verlag, Jena
- Seifert, H.S.H., Böhnel, H., 1995: Clostridiosen bei Tier und Mensch. In: *Handbuch der bakteriellen Infektionen bei Tieren*. H. Blobel und T. Schliesser (Eds.), Bd. II/4., Fischer Verlag, Jena
- Seifert, H.S.H., Rieke, K., Böhnel, H., 1981: Differenzierung pathogener Clostridia aus Feldmaterial und von Referenzstämmen mit Hilfe der biometrischen Analyse der quantitativ erfaßten metabolischen Fettsäuremuster der Erreger. *Zbl. Bakt. Hyg. I Abt. Orig. A* 251, 83-113
- Seimiya, Y., Ohshima, K., Itoh, H., Ogasawara, N., Kikuchi, Y., Haratani, M., Tanimura, N., Hamaoka, T., 1992: Purulent thromboembolic meningoencephalomyelitis in a calf with isolation of *Clostridium septicum* from the brain. *J. Vet. Med. Sci.* 54, 171-172
- Sellman, B.R., Kagan, B.L., Tweten, R.K., 1997: Generation of a membrane-bound, oligomerized pre-pore complex is necessary for pore formation by *Clostridium septicum* α -toxin. *Mol. Microbiol.* 23, 551-558
- Sellman, B.R., Tweten, R.K., 1997: The propeptide of *Clostridium septicum* alpha toxin functions as an intramolecular chaperone and is a potent inhibitor of alpha toxin-dependent cytolysis. *Mol. Microbiol.* 25, 429-440
- Shimizu, T., Umesawa, M., Yoshizawa, S., Yamanaka, T., Kondo, H., 1979: Differentiation in the cytotoxicity between hemorrhagic and necrotizing principles produced by *Clostridium septicum*. *Japan. J. Med. Sci. Biol.* 32, 121-123

- Shirasaka, A.W., Benno, Y., 1982: Isolation of *Clostridium septicum* from diseased chickens in broiler farms. *Jpn. J. Vet. Sci.* 44, 807-809
- Shirasaka, S., Teranishi, H., Benno, Y., Azuma, R., 1983: Serological characterization of *Clostridium septicum* strains isolated from clinical materials of chickens and cows. *Jpn. J. Vet. Sci.* 45, 861-863
- Smith, L.D., Dowell, V.R., 1980: *Clostridium*. In: Manual of clinical microbiology. Lennette, E.H., Balows, A., Hausler, W.J. Jr., Truant, J.P. (Eds.), Am. Soc. Microbiol., Washington D.C., 419-425
- Smith, L.D.S., Holdeman, L.V., 1968: The pathogenic anaerobic bacteria. Thomas, Springfield, Illinois, 349-360
- Smith, L.D.S., Williams, B.L., 1984: The pathogenic anaerobic bacteria. Thomas, Springfield, Illinois, 180-190
- Songer, J.G., 1996: Clostridial enteric diseases of domestic animals. *Clin. Microbiol. Rev.* 9, 216-234
- Songer, J.G., 1998: Clostridial diseases of small ruminants. *Vet. Res.* 29, 219-232
- Sonnenberg, H., 1992: Untersuchungen zur Herstellung von Impfstoff gegen Brucellose im Göttinger IBT Bioreaktor mit dem Stamm *Brucella suis* S2. *Gött. Beitr. Land- Forstwirtschaft. Trop. Subtrop.* 81
- Sternberger, L.A., Hardy, P.H., Cuculis, J.J., Meyer, H.G., 1970: The unlabelled antibody technique in immunohistochemistry. Preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (horseradish peroxidase-antihorseradish peroxidase) and its use in identification of spirochaetes. *J. Histochem. Cytochem.* 18, 315-333
- Stevens, D.L., Musher, D.M., Watson, D.A., Eddy, H., Hamill, R.J., Gyorkey, F., Rosen, H., Mader, J., 1990: Spontaneous, nontraumatic gangrene due to *Clostridium septicum*. *Rev. Infect. Dis.* 12, 286-296
- Stryer, L., 1990: Biochemie. Spektrum der Wissenschaft Verlagsgesellschaft, Heidelberg
- Swiatek, P.L., Allen, S.D., Siders, J.A., Lee, C.-H., 1987: DNase production by *Clostridium septicum*. *J. Clin. Microbiol.* 25, 437-438
- Takano, S., Kondo, H., 1987: Quantitative method for determination of hemolytic activity of *Clostridium septicum* toxin. *Japan. J. Med. Sci. Biol.* 40, 47-59
- Takeuchi, S., Hashizume, N., Kinoshita, T., Kaidoh, T., Tamura, Y., 1997: Detection of *Clostridium septicum* hemolysin gene by polymerase chain reaction. *J. Vet. Med. Sci.* 59, 853-855
- Tulasne, J.J., Lefèvre, P.C., Blancou, J., 1996: Experience with veterinary vaccines in warm climates. *Dev. Biol. Standard.* 87, 33-42

- Tweten, R.K., 1995: Pore-forming toxins of the gram-positive bacteria. *Am. Soc. Microbiol. Washington D.C.*, 207-230
- Ullrich, M.W., 1994: Produktion von Maul- und Klauenseuche-Virus in einem zwei-stufigen Bioreaktorsystem. *Gött. Beitr. Land- Forstwirtsch. Trop. Subtrop.*, 89
- Uzal, F.A., Belak, K., Rivera, E., Robles, C.A., Feinstein, R.E., 1992: Bacillary haemoglobinuria diagnosis by the peroxidase-antiperoxidase technique. *J. Vet. Med. B* 39, 595-598
- Vannelli, S.A., Uzal, F.A., 1996: Clostridium septicum detection by the peroxidase-antiperoxidase (PAP) technique, in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues of sheep. *Arch. Med. Vet.* 28, 125-128
- Veterinary Investigation Diagnosis Analysis. III. 1994 and 1987-1994: A tabulated summary of diagnoses recorded at veterinary investigation centres in England, Scotland and Wales.
- Volkin, D.B., Burke, C.J., Sanyal, G., Middaugh, C.R., 1996: Analysis of vaccine stability. *Dev. Biol. Standard.* 87, 135-142
- Vraný, B., Hnátková, Z., Lettl, A., 1988: Production of toxic antigens in dialyzed cultures of microorganisms. *Folia Microbiol.* 33, 148-154
- WHO, 1992: Technical Report Series No. 823, 14-79
- Winsnes, R., Hendriksen, C.F.M., Sesardic, D., Akkermans, A., Daas, A., 1999: Serological assays as alternatives to the PhEur challenge test for batch release of tetanus vaccines for human use. *Dev. Biol. Standard.* 101, 277-288
- Woese, C.R., 1987: Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* 51, 221-271
- Wong González, A., 2000: Charakterisierung und Differenzierung von mexikanischen Stämmen der Spezies Clostridium chauvoei und Clostridium septicum. *Gött. Beitr. Land- Forstwirtsch. Trop. Subtrop.* 137
- Wood, K.R., 1991: An alternative to the toxin neutralization assay in mice for the potency testing of the Clostridium tetani, Clostridium septicum, Clostridium novyi Type B and Clostridium perfringens Type D epsilon components of multivalent sheep vaccines. *Biologicals* 19, 281-286
- Willis, A.T., Williams, K., 1972: Prevention of swarming of Clostridium septicum. *J. Med. Microbiol.* 5, 493-496
- Zaffran, M., 1995: Vaccine transport and storage: environmental challenges. *Dev. Biol. Standard.* 87, 9-17
- Zenz, K., Roggentin, P., Schauer, R., 1993: Isolation and properties of the natural and the recombinant sialidase from Clostridium septicum NC 0054714. *Glycoconj. J.* 10, 50-56

7 ANHANG

Bakterienkulturmedien

Reinforced Clostridia Medium (RCM):

Hefeextrakt	3,0	g
Fleischextrakt	10,0	g
Pepton aus Fleisch	10,0	g
Stärke	1,0	g
Glucose	5,5	g
Cysteiniumchlorid	0,55	g
Natriumchlorid	5,0	g
Natriumacetat	4,98	g
Agar-Agar	0,5	g
H ₂ O bidest.	ad 1000	ml

pH 7,2

autoklavieren: 20 min 121 °C

Bei Ansatz großer Mengen Medium (5-10 l) wurde die Glucose getrennt von den anderen Bestandteilen gelöst und autoklaviert und anschließend steril hinzugegeben.

Hirn-Herz-Bouillon (HHB):

Hirn-Herz-Bouillon	37	g
Zusammensetzung:	Nährsubstrat	27,5 g
	(Hirn-Herz-Extrakt, Peptone)	
	D (+) Glucose	2,0 g
	NaCl	5,0 g
	di-Natriumhydrogenphosphat	2,5 g
	H ₂ O bidest.	ad 1000 ml

autoklavieren: 20 min 121 °C

Blut-RCM-Agar:

Hefeextrakt	3,0	g
Fleischextrakt	10,0	g
Pepton aus Fleisch	10,0	g
Stärke	1,0	g
Glucose	5,5	g
Cysteiniumchlorid	0,55	g
Natriumchlorid	5,0	g
Natriumacetat	4,98	g
Agar-Agar	0,5	g
H ₂ O bidest.	ad 1000	ml

pH 6,8

20 min bei 121 °C autoklavieren

Zugabe ca. 125 ml defibriniertes Humanblut (Konserve)

Fertig-Agar DST (OXOID):

Proteose-Pepton	10,0 g
Kalbfleischextrakt	10,0 g
Glucose	2,0 g
NaCl	3,0 g
di-Natriumhydrogenphosphat	2,0 g
Natriumacetat	1,0 g
Adeninsulfat	0,01 g
Guanidinhydrochlorid	0,01 g
Uracil	0,01 g
Xanthin	0,01 g
Aneurin	0,02 mg
Agar-Agar	12,0 g
H ₂ O bidest.	ad 1000 ml
20 min bei 121 °C autoklavieren	

Ergebnisse der gaschromatografischen Untersuchungen

Für die Feldstämme wurde die Genauigkeit ihrer gaschromatografischen Identifizierung (in %) angegeben.

Wurden mehrere Ansätze desselben Stammes verglichen, so erhielten sie zur Unterscheidung zusätzlich zur Labornummer einen Kennbuchstaben (a,b,c,d).

Referenzstamm NC 547:

Tab. A-1: Vergleich mit Referenzstämmen der Gattung *CLOSTRIDIUM*:

LAB. Nr.	NAME DES STAMMES	KOEFFIZIENT r
NC 547 b	<i>Clostridium septicum</i>	0,989
NC 547 c	<i>Clostridium septicum</i>	0,982
IRP 190	<i>Clostridium novyi</i>	0,892
4611	<i>Clostridium botulinum</i> Typ E	0,864
ATCC 27322	<i>Clostridium botulinum</i> Typ G	0,862
NC 547	<i>Clostridium septicum</i>	0,849
ATCC 14501	<i>Clostridium innocuum</i>	0,842
ATCC 13937	<i>Clostridium ramosum</i>	0,839
581	<i>Clostridium botulinum</i> Typ A	0,827
35396	<i>Clostridium botulinum</i> Typ E	0,827

Tab. A-2: Vergleich mit allen nach der Methode untersuchten anaeroben Feld- und Referenzstämmen:

LAB. Nr.	NAME DES STAMMES	GENAUIGKEIT	KOEFFIZIENT r
NC 547 c	Clostridium septicum	Ref.	0,989
NC 547 d	Clostridium septicum	Ref.	0,982
2258 a	Clostridium septicum	98,2 %	0,975
IRP 206 a	Clostridium chauvoei	Ref.	0,973
IRP 206 b	Clostridium chauvoei	Ref.	0,973
1178 a	Clostridium chauvoei / septicum	C.c.: 98,2 %	0,971
955 a	Clostridium septicum	(?)	0,960
1242 b	Clostridium chauvoei / septicum	C.c.: 98,2 %	0,957
1199 b	Clostridium septicum	(?)	0,957
735	Clostridium chauvoei	(?)	0,954

Feldstamm 2258:

Tab. A-3: Vergleich mit Referenzstämmen der Gattung *CLOSTRIDIUM*:

LAB. Nr.	NAME DES STAMMES	KOEFFIZIENT r
NC 547 a	Clostridium septicum	0,987
IRP 206	Clostridium chauvoei	0,982
NCTC 8596	Clostridium chauvoei	0,963
5295	Clostridium botulinum Typ C	0,958
003-9	Clostridium botulinum Typ C	0,958
62 A	Clostridium botulinum Typ A	0,955
4997	Clostridium botulinum Typ A	0,953
ATCC 17863	Clostridium parabolulinum	0,946
468 C	Clostridium botulinum Typ C	0,946
ATCC 17794	Clostridium lentoputrescens	0,946

Tab. A-4: Vergleich mit allen nach der Methode untersuchten anaeroben Feld- und Referenzstämmen:

LAB. Nr.	NAME DES STAMMES	GENAUIGKEIT	KOEFFIZIENT r
335	Clostridium septicum	98,8 %	0,995
94128	Clostridium chauvoei	98,0 %	0,995
516	Clostridium septicum	98,5 %	0,994
734	Clostridium septicum	98,4 %	0,992
974	Clostridium chauvoei	C.c.: 98,7 %	0,991
1615	Clostridium septicum	97,3 %	0,991
1023 a	Clostridium chauvoei	Ref.	0,990
1200	Clostridium septicum / chauvoei	C.s.: 97,7 %	0,989
894	Clostridium chauvoei	98,2 %	0,988
NC 547 a	Clostridium septicum	Ref.	0,987

Lösungen für fluoreszenzserologische Untersuchungen

Puffer FA (4x):

Na ₂ CO ₃	11,4 g
NaHCO ₃	33,6 g
NaCl	8,5 g
H ₂ O bidest.	ad 1000 ml
	pH 9,0

Aceton-Methanol-Lösung:

Aceton	50 ml
Methanol	25 ml

Glycerollösung mit Puffer FA:

Puffer FA	50 ml
Glycerol	50 ml

Lösungen für die Durchführung der Polymerase-Kettenreaktion und des Nachweises der Amplifikationsprodukte

Isolierung der DNA:

Lysispuffer:			
Tris-HCl	(SIGMA)	20	mM
EDTA	(SIGMA)	2	mM
Triton X-100		1	%
Lysozym	(SIGMA)	2	mg/ml

Proteinase K-Lösung:			
Proteinase K		20	mg/ml

Nachweis der Amplifikationsprodukte:

Agarose-Gele (1 %):		
Agarose (GIBCO BRL)	3	g
H ₂ O bidest.	ad 300	ml

DNA-Standard:	
1 Kb DNA Ladder	(GIBCO BRL)

Ethidiumbromidlösung zur Färbung:	
Ethidiumbromid	(BIO-RAD) 1 Tablette
H ₂ O bidest.	22 ml
Zugabe 100 µl Färbelösung je 100 ml Gel	

Zellkultur

Zellkulturmedien:

Zelllinie BHK21-BSR/PK5/88

10 % FKS + Natriumpyruvat:

Minimal Essential Medium (GIBCO BRL)	29,01 g
Natrium-Pyruvat	0,36 g
NaHCO ₃	2,55 g
Aminosäuren (SEROMED)	30 ml
Fötale Kälberserum (PAN)	300 ml
H ₂ O bidest.	ad 3000 ml

Zelllinie CHO-K1

10 % FKS H:

Ham's F12 (GIBCO BRL)	32,07 g
HEPES (SEROMED)	5,4 g
NaHCO ₃	6,6 g
Glucose	3,0 g
Vitamine (SEROMED)	30 ml
Aminosäuren (SEROMED)	30 ml
Fötale Kälberserum (PAN)	300 ml
H ₂ O bidest.	ad 3000 ml

Zelllinien EBL und MDCK

10 % FKS:

Minimal Essential Medium (GIBCO BRL)	28,83 g
HEPES (SEROMED)	5,4 g
NaHCO ₃	6,6 g
Vitamine (SEROMED)	30 ml
Aminosäuren (SEROMED)	30 ml
Fötale Kälberserum (PAN)	300 ml
H ₂ O bidest.	ad 3000 ml

Zelllinie Vero

5 % FKS:

Minimal Essential Medium	28,83 g
Glutamin	0,8778 g
NaHCO ₃	3,6 g
Vitamine (SEROMED)	30 ml
Aminosäuren (SEROMED)	30 ml
Fötale Kälberserum (PAN)	150 ml
H ₂ O bidest.	ad 3000 ml

Zelllinie 3T3

10 % FKS D:

Iscove's Modified Dulbecco's Medium	30,36 g
HEPES (SEROMED)	5,4 g
NaHCO ₃	6,6 g
Vitamine (SEROMED)	30 ml
Aminosäuren (SEROMED)	30 ml
Fötales Kälberserum (PAN)	300 ml
H ₂ O bidest.	ad 3000 ml

Pufferlösungen für die Zellkultur:

GKN:

Glucose	3,3 g
NaCl	24,0 g
KCl	1,2 g
KH ₂ PO ₄	0,36 g
Na ₂ HPO ₄ x 12 H ₂ O	0,72 g
H ₂ O bidest.	ad 3000 ml
pH 7,2	
sterilfiltriert	

Trypsin-EDTA-Lösung:

NaCl	16,0 g
KCl	1,6 g
Glucose	2,0 g
NaHCO ₃	1,16 g
Trypsin (SEROMED)	1,0 g
EDTA (SIGMA)	0,4 g
H ₂ O bidest.	ad 2000 ml;
pH 7,2	
sterilfiltriert	

Nachweis vitaler Zellen in Zellkulturtests (MTT-Test):

MTT-Lösung:

MTT-Reagenz (SIGMA)	5 mg/ml
---------------------	---------

Isopropanol-HCl-Lösung:

HCl conc.	5 ml
Isopropanol	495 ml
SDS-Lösung (3%)	<u>100 ml</u>
	600 ml

Pufferlösung für die Durchführung der Hämolysetests (PBS):

Lösung A:

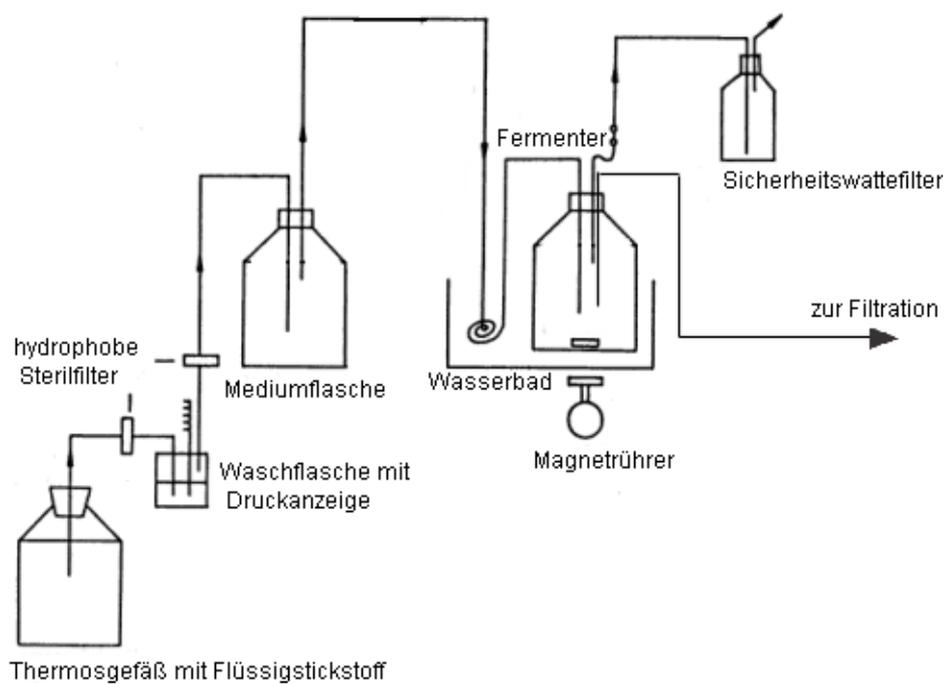
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	48,3 g
NaCl	10,22 g
H_2O bidest.	ad 3500 ml

Lösung B:

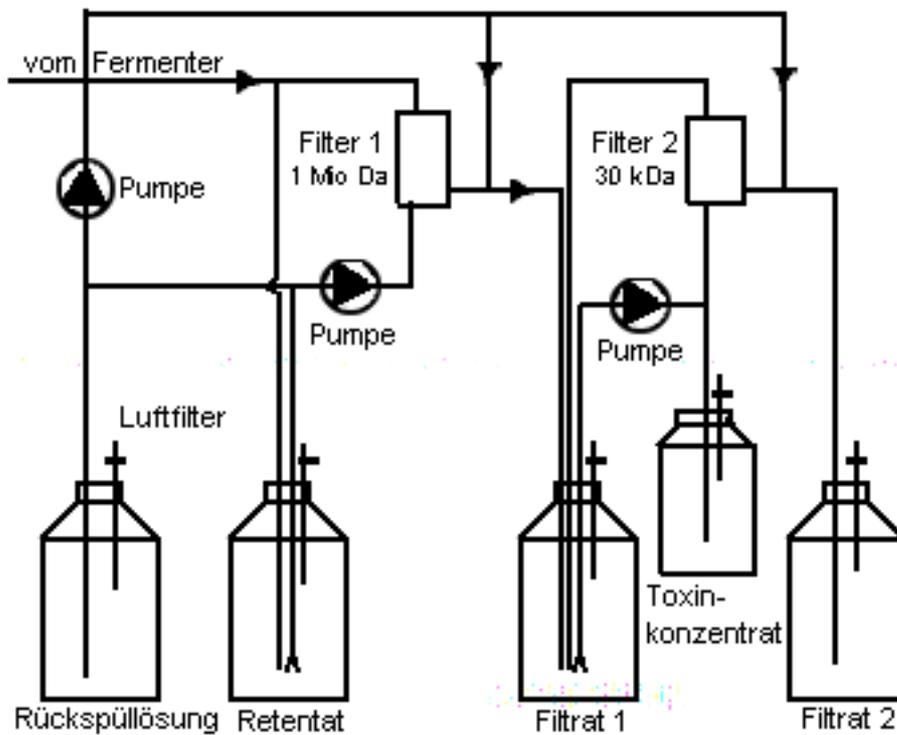
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	48,3 g
NaCl	10,22 g
H_2O bidest.	ad 3500 ml

Lösung A wurde zu Lösung B zugegeben, bis ein pH-Wert von 7,2 erreicht war.

Schematische Darstellung des Aufbaus des Fermentationssystems



Schematische Darstellung des Aufbaus des Filtrationssystems



SDS-Polyacrylamidgele

Lösungen für die Gelelektrophorese:

Sammelgelpuffer (4x):

Tris-Base (SIGMA) 0,5 M	6,055 g
Natriumdodecylsulfat (SDS) 0,4 %	0,4 g
TEMED (SIGMA) 0,4 %	0,4 ml
H ₂ O bidest.	ad 100 ml
pH 8,8 (mit HCl conc.), Lagerung im Kühlschrank	

Trenngelpuffer (4x):

Tris-Base (SIGMA) 1,5 M	18,165 g
Natriumdodecylsulfat (SDS) 0,4 %	0,4 g
TEMED (SIGMA) 0,4 %	0,4 ml
H ₂ O bidest.	ad 100 ml
pH 8,8 (mit HCl conc.), Lagerung im Kühlschrank	

Ammoniumpersulfatlösung:

Ammoniumpersulfat (SIGMA)	0,2 g
H ₂ O bidest.	ad 1,8 ml

Die fertige Lösung wurde in Aliquots von je 500 µl abgefüllt
Lagerung bei -26 °C

Laufpuffer (10x):

Tris-Base (SIGMA) 0,25 M	60,55	g
Glycin 1,92 M	288,27	g
Natriumdodecylsulfat (SDS) 1,0 %	20	g
H ₂ O bidest.	ad 2000	ml

Lagerung des fertigen Puffers bei Raumtemperatur

Probenpuffer:

Tris-Base (SIGMA) 0,125 M	1,51	g
Natriumdodecylsulfat (SDS) 4,0 %	4,0	g
Glycerol 20 %	20,0	g
EDTA (SIGMA) 2 mM	0,0744	g
H ₂ O bidest.	ad 100	ml

Lagerung des fertigen Puffers bei -26 °C

Probenpuffer mit Zusatz von Dithiothreitol:

Zugabe von 1 ml der folgenden Lösung zum Probenpuffer:

Dithiothreitol (ICN BIOMEDICALS)	30 mg
H ₂ O bidest.	ad 1 ml

Lagerung des fertigen Puffers im Kühlschrank

Gießen von zwei 10%igen diskontinuierlichen denaturierenden Gelen im *Mini-Protean II*- Elektrophoresekammersystem:

2 x Trenngel:

Acrylamid-Bisacrylamidlösung (BIO-RAD)	3,3	ml
Trenngelpuffer (s.o.)	2,5	ml
H ₂ O bidest.	4,1	ml

Entgasen der Lösung; anschließend Zugabe von

Ammoniumpersulfatlösung (s.o.)	0,1	ml
--------------------------------	-----	----

Die Gele zügig gießen und mit Ethanol (96 %) überschichten;
Polymerisationsdauer ca. 20 Minuten.

2 x Sammelgel:

Acrylamid-Bisacrylamidlösung (SIGMA)	0,88	ml
Sammelgelpuffer (s.o.)	1,66	ml
H ₂ O bidest.	4,12	ml

Entgasen der Lösung und Abgießen des Alkohols von den polymerisierten
Trenngelen

anschließend Zugabe von

Ammoniumpersulfatlösung (s.o.)	0,04	ml
--------------------------------	------	----

zügig gießen, Einsetzen von 10-Zähne-Kämmen

Silberfärbung der Gele (AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH Silver Staining Protocol for Proteins):

Färbelösungen:

Fixierungslösung:

Ethanol	100	ml
Eisessig (ALDRICH)	25	ml
H ₂ O bidest.	ad 250	ml

Sensibilisierungslösung:

Ethanol	75	ml
Glutardialdehyd (25 % w/v, s.u.)	1,25	ml
Natriumthiosulfat (5 % w/v, s.u.)	10	ml
Natriumacetat	17	g
H ₂ O bidest.	ad 250	ml

Glutardialdehydlösung 25 %:

Glutardialdehyd (SIGMA)	25	ml
H ₂ O bidest.	ad 100	ml

Natriumthiosulfatlösung 5 %:

Natriumthiosulfat	5	g
H ₂ O bidest.	ad 100	ml

Silberreaktionslösung:

Silbernitrat (2,5 % w/v, s.u.)	25	ml
Formaldehyd 37 %	0,1	ml
H ₂ O bidest.	ad 250	ml

Silbernitratlösung 2,5 % w/v:

Silbernitrat (SIGMA)	2,5	g
H ₂ O bidest.	ad 100	ml

Entwicklungslösung:

Natriumcarbonat	6,25	g
Formaldehyd 37 %	0,05	ml
H ₂ O bidest.	ad 250	ml

Stopplösung

EDTA-Na ₂ x H ₂ O (SIGMA)	3,65	g
H ₂ O bidest.	ad 250	ml

Konservierungslösung:

Ethanol	75	ml
Glycerol (87 % w/w)	11,5	ml
H ₂ O bidest.	ad 250	ml

Protokoll der Silberfärbung:

SCHRITT DER SILBERFÄRBUNG	FÄRBE LÖSUNG	DAUER
Fixierung	Fixierungslösung	30 min
Sensibilisierung	Sensibilisierungslösung	30 min
Waschen	H ₂ O bidest.	3 x 5 min
Silberreaktion	Silberreaktionslösung	20 min
Waschen	H ₂ O bidest.	2 x 1 min
Entwicklung	Entwicklungslösung	bis Banden sichtbar
Stop der Entwicklung	Stoptlösung	10 min
Waschen	H ₂ O bidest.	2 x 1 min
Konservierung	Konservierungslösung	mind. 30 min

Lösungen für die Durchführung des Immunoblots

Lösung 1: Transferpuffer

Tris-Base (SIGMA) 25 mM	3,03 g
Glycin 192 mM	14,4 g
Methanol	200 ml
H ₂ O bidest.	ad 1000 ml

Lösung 2: Blocking Puffer

Tween 20 (FLUKA) 0,1 %	1 ml
Magermilchpulver 5 %	5 g
PBS (s. Lösung 4)	ad 1000 ml

Lösung 3: Waschpuffer

Tween 20 (FLUKA) 0,1 %	1 ml
PBS (s. Lösung 4)	ad 1000 ml

Lösung 4: Phosphatpuffer (PBS) Blot

NaCl 137 mM	16,02 g
KCl 2,7 mM	0,4 g
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O 6,01 mM	2,14 g
KH ₂ PO ₄ 1,47 mM	0,4 g
H ₂ O bidest.	ad 2000 ml

Lösung 5: Färbelösung

Färbetabletten (SIGMA Fast™)	1 Tablette
H ₂ O bidest.	10 ml

Der quantitative Proteinnachweis (LOWRY 1951)

Lösungen für den Proteinnachweis:

Lösung 1:

Natriumtartrat (Dinatriumdihydrat)	0,2	g
Natriumcarbonat	10	g
NaOH	2,2	g
H ₂ O bidest.	ad 100	ml

Lösung 2:

Natriumtartrat (Dinatriumdihydrat)	2,0	g
Kupfersulfat (Pentahydrat)	1,0	g
NaOH 1 N	10	ml
H ₂ O bidest.	ad 100	ml

Lösung 3:

Folinreagenz (FLUKA) 1:2 mit H₂O bidest. verdünnen

Lösung 4:

NaOH (2 N)	16	g
H ₂ O bidest.	ad 100	ml

Durchführung des Proteinnachweises:

- 100 µl der Proben wurden mit 350 µl H₂O bidest. vermischt
- Zugabe von 300 µl Lösung 4
- Zugabe von 540 µl Lösung 1
30 Minuten bei Raumtemperatur stehen lassen
- Zugabe von 60 µl Lösung 2
20 Minuten bei Raumtemperatur stehen lassen
- Zugabe von 1800 µl Lösung 3
Gut vermischen (*Vortex-Genie*) und weitere 30 Minuten stehen lassen

Die photometrische Messung der Proben (*Ultraspec 2000 UV / visible Spectrophotometer*) bei 546 nm und die Berechnung der Proteinkonzentration in der Probe erfolgte anhand einer zuvor mit BSA-Verdünnungen erstellten Eichgeraden im Programm *SWIFT-Wavescan*, Vers. 1.01 (AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH)

Pufferlösungen für die chromatografische Aufreinigung des α -Toxins

Anionentauschchromatografie:

Diethanolaminpuffer (20 mM)

Puffer A:

Diethanolamin (SIGMA)	3,8323	ml
H ₂ O bidest.	ad 2000	ml
pH 8,9		

Puffer B:

Diethanolamin (SIGMA)	3,8323	ml
NaCl	58,44	g
H ₂ O bidest.	ad 2000	ml
pH 8,9		

Kationentauschchromatografie:

Tris-Base-Puffer (20 mM)

Puffer A:

Tris-Base (SIGMA)	4,844	g
H ₂ O bidest.	ad 2000	ml
pH 7,8		

Puffer B:

Tris-Base (SIGMA)	4,844	g
NaCl	58,44	g
H ₂ O bidest.	ad 2000	ml
pH 7,8		

HEPES-Puffer (50 mM)

Puffer A:

HEPES (SEROMED)	23,83	g
H ₂ O bidest.	ad 2000	ml
pH 7,8		

Puffer B:

HEPES (SEROMED)	23,83	g
NaCl	58,44	g
H ₂ O bidest.	ad 2000	ml
pH 7,8		

Hydrophobe Interaktionschromatografie:

Tris-HCl-Puffer (20 mM)

Puffer A:

Tris-HCl (SIGMA)	6,3	g
H ₂ O bidest.	ad 2000	ml
pH 7,9		

Puffer B:

Tris-HCl (SIGMA)	6,3	g
(NH ₄) ₂ SO ₄ (SIGMA)	198,15	g
H ₂ O bidest.	ad 2000	ml
pH 7,9		

Gelfiltrationschromatografie:

Phosphatpuffer:

Na ₂ HPO ₄ x 12 H ₂ O	4,21	g
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	0,66	g
H ₂ O bidest.	ad 1000	ml

pH 7,2

Lösungen zur Aufbereitung von Cellulosemembran-Dialyseschläuchen

Natriumcarbonatlösung 0,3 %:

Natriumcarbonat	4,5	g
H ₂ O bidest.	ad 1,5	l

EDTA-Lösung 1%:

EDTA (SIGMA)	15	g
H ₂ O bidest.	ad 1,5	l

LEBENS LAUF

Name: Katja Jansen

Geburtsdatum: 25.02.1969

Geburtsort: London, UK

Schulbesuch:

1975 – 1979 Grundschule Hörn, Aachen

1979 – 1988 Viktoriaschule Aachen (Gymnasium)
Abitur

Studium:

1988 – 1995: Fachbereich Biologie, Abschluß **Diplom**

Diplomarbeit angefertigt im Institut für Forstzoologie,
Fachbereich Forstwissenschaften

Titel der Diplomarbeit:

„Untersuchungen zum Entwicklungserfolg von *Dendrolimus pini*
(*Lasiocampidae*, *Lepidoptera*) und *Lymantria monacha*
(*Lymantriidae*, *Lepidoptera*) an Kiefer (*Pinus sylvestris* L.) in
Abhängigkeit vom physiologischen Zustand der Fraßpflanze“

1996 – 2000: Am Institut für Pflanzenbau und Tierhygiene in den Tropen
und Subtropen, Bereich Tierhygiene
Fachbereich Agrarwissenschaften

Zur Anfertigung einer Dissertation mit dem Titel:

„Methodische Untersuchungen zu Produktion, Nachweis, Reini-
gung und Antigenität des α -Toxins von *Clostridium septicum*“

Göttingen, 18.5.2000

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Dr. H. Böhnel für die Überlassung des Themas und die Unterstützung bei der Erstellung der vorliegenden Arbeit.

Bei Herrn Prof. Dr. G. Gottschalk bedanke ich mich für die Übernahme des Korreferates.

Herrn Professor Dr. H.S.H. Seifert danke ich für seine geleistete Hilfe und für die Durchsicht des Manuskriptes.

Frau Dr. F. Roth gilt mein Dank für ihre Unterstützung in den vergangenen Jahren und für den Beistand in den letzten Monaten und Wochen bei der Erstellung der vorliegenden Arbeit.

Den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Abteilung Tierhygiene des Institutes für Pflanzenbau und Tierproduktion in den Tropen und Subtropen danke ich für die freundliche Zusammenarbeit und die Hilfsbereitschaft.

Danke sage ich auch zu Herrn Sören Petzke, Frau Dr. Petra Loch und Herrn Dr. Alfredo Wong González für ihren Beistand und ihre praktische Hilfe. Herrn Dr. Alfredo Wong González danke ich darüberhinaus für die Durchführung der in der vorliegenden Arbeit zitierten Untersuchungen.

Ich bedanke mich bei Frau Antje Clarke für ihr offenes Ohr.

Allen weiteren Personen aus meinem sozialen Umfeld gilt ebenfalls ein besonderer Dank für die Unterstützung, Ausdauer und Blumen.

