

6. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit werden erste Schritte zur Untersuchung der immunogenen Wirksamkeit des durch Wärme inaktivierten Exfoliatins von *St. hyicus* unternommen. Da nicht alle Schweine gleichermaßen mit exfoliativen Hautveränderungen auf die Infektion bzw. auf die Applikation toxinhaltiger Kulturüberstände reagieren, lag ein Schwerpunkt der Arbeit in der Suche nach vergleichbar exfoliatinempfindlichen Tieren für Vakzinationsversuche. Es wurden 18 gnotobiotische Ferkel sowie 23 Ferkel aus mutterloser Aufzucht und 85 konventionell gehaltene Schweine verschiedenen Alters auf ihre Empfindlichkeit gegenüber dem exfoliativen Toxin von *St. hyicus* untersucht. Dabei konnte bestätigt werden, daß die Abwehrlage der Tiere während der ersten Lebenswochen ganz entscheidend von der Kolostrumversorgung abhängt. Zur Auslösung exfoliativer Hautveränderungen an insgesamt 12 zwei Wochen alten Ferkeln aus mutterloser Aufzucht war eine vierfach höhere Toxindosis nötig, sofern sie während der ersten 18 Lebensstunden Sauenkolostrum statt Rinderkolostralmilch erhalten hatten.

Bei der Untersuchung von jeweils zwei Ferkeln aus insgesamt 20 konventionell aufgezogenen Würfen reagierten nur sechs Ferkel aus drei Würfen mit Exfoliation auf die Applikation des konzentrierten Kulturüberstandes. Bei weiteren 34 Ferkeln aus 17 Würfen war lediglich eine Rötung und Ödematisierung der Applikationsstelle festzustellen. Die jeweiligen Wurfgeschwister aller 20 Würfe reagierten qualitativ stets vergleichbar auf die Toxinapplikation, was wahrscheinlich ebenfalls mit der Kolostrumversorgung zusammenhängt.

Aufgrund der unterschiedlichen Exfoliatinempfindlichkeit von Schweinen wurde zum Nachweis des exfoliativen Toxins auch das Zellkulturverfahren mit Mäusefibroblastenzellen (L-929) und Baby-hamster-kidney-Zellen (BHK-21) eingesetzt. Während am Ohrgrund vom Schwein zur Auslösung exfoliativer Hautveränderungen mindestens 9 mg Protein des konzentrierten Kulturüberstandes nötig waren, erwiesen sich in der Zellkultur bereits 108 µg Protein als ausreichend, um typische Abrundungseffekte an den Zellen hervorzurufen.

Um das exfoliative Toxin in möglichst reiner Form zur Vakzination einsetzen zu können, wurde der konzentrierte Kulturüberstand von *St. hyicus* durch Gelfiltration in etwa 15 proteinhaltige Einzelfraktionen aufgetrennt. Diese wurden vergleichend in der Zellkultur und an der Haut der exfoliatinempfindlichen Ferkel aus mutterloser Aufzucht auf biologische Wirksamkeit überprüft. Es stellte sich heraus, daß in den Fraktionen Nr. 17 bis 19 das exfoliative Protein in Relation zum ungereinigten konzentrierten Kulturüberstand um den Faktor zehn aufgereinigt vorlag. Der Aufreinigungsfaktor der Fraktion Nr. 20 lag noch bei drei. Daraufhin wurden die Fraktionen 17 bis 20 gepoolt und vergleichend mit dem nicht aufgereinigten Kulturüberstand, jeweils nach einer Wärmeinaktivierung (60°C; 15 min.), zur Vakzination von gnotobiotischen Ferkeln verwandt. Es konnte zwar bei keiner Versuchsgruppe eine belastbare Immunität erreicht werden, wohl aber zeigte sich im Vergleich zur Kontrollgruppe eine protektive Wirkung gegenüber der experimentellen Belastungsinfektion, die in einem deutlich verlangsamten Erkrankungsverlauf zum Ausdruck kam. Die deutlichste Wirkung wurde durch Grundimmunisierung mit zweifacher Wiederholungsimpfung mit dem partiell gereinigten Kulturüberstand erreicht.

Nach diesem Immunisierungsschema wurden je drei bzw. vier Absetzferkel aus zwei Würfen vakziniert, um die Übertragbarkeit der bei den gnotobiotischen Ferkeln gewonnenen Erkenntnisse über die Schutzwirkung gegenüber einer Belastungsinfektion auf konventionell gehaltene Tiere zu überprüfen. Zum Zeitpunkt der Infektion reagierten jedoch weder die vakzinierten Tiere noch die unbehandelten Kontrolltiere mit exfoliativen Hautveränderungen.

Serologisch wurde die immunogene Wirksamkeit der exfoliatinhaltigen Kulturüberstände mittels eines Enzyme-linked immunosorbent assay überprüft. Dabei waren die deutlichsten Antikörperanstiege von etwa 5 auf 400 ELISA-Einheiten bei den vakzinierten Absetzferkeln festzustellen. Bei den gnotobiotischen Ferkel erfolgt bis zum Zeitpunkt der Belastungsinfektion ein Anstieg von 0 auf maximal 50 ELISA-Einheiten. Es war jedoch nicht möglich, aus der Höhe der Antikörperspiegel Rückschlüsse auf den klinischen Schutz der Tiere zu ziehen.

Vergleichsweise wurde auch mittels Toxinneutralisation in der Zellkultur eine Bestimmung der Antikörperspiegel durchgeführt. Bei diesem Verfahren war bereits das bei der Geburt der gnotobiotischen Ferkel gewonnene Nabelschnurblut in Serumverdünnungen bis zu 1:8 durch neutralisierende Effekte gegenüber dem Toxin von

St. hyicus gekennzeichnet, obwohl es zu diesem Zeitpunkt nahezu frei von Antikörpern ist. Gegen Ende der Vakzinationsversuche an Absetzferkeln wiesen die Seren der vakzinierten wie auch der unbehandelten Tiere eine vergleichbare toxinneutralisierende Wirksamkeit bis zu Serumverdünnungen von 1:16 bzw. 1:32 auf. Demzufolge scheint dieser Test für die Bestimmung des Antikörperstatus von Schweinen gegenüber dem exfoliativen Toxin von **St. hyicus** nicht geeignet zu sein.

In den vorliegenden Untersuchungen konnten Hinweise auf eine immunogene Wirkung des wärmeinaktivierten Toxins von **St. hyicus** festgestellt werden. In weiteren Untersuchungen bleibt aber abzuklären, ob mit höheren Toxindosen oder mit weiter aufgereinigtem Toxin eine belastbare Immunität zu erreichen ist.

Heinrich Enneking: Investigations on the biological efficacy of exfoliative toxin of *Staphylococcus hyicus*

Summary

In the present investigation first steps were carried out to examine the immunogenic efficacy of the exfoliative toxin of *St. hyicus*, inactivated by temperature treatment. Because not every pig reacted in the same way upon application of toxic culture supernatant and infection, a main part of the investigation consisted of the search for similarly reacting pigs for vaccination trials. 18 gnotobiotic piglets, 23 motherless reared piglets and 85 conventional reared pigs of different age were tested for susceptibility to the exfoliative toxin of *Staphylococcus hyicus*. It was confirmed that the resistance to exfoliative toxin during the suckling period is dependent on supply of colostrum. In trials with 12 motherless reared piglets at an age of two weeks it was necessary to apply four times as much toxin to produce exfoliative skin alterations in piglets if they were provided with sow colostrum instead of bovine colostrum during the first 18 hours of life.

In investigations on always two piglets of each of 20 conventionally reared litters only six piglets of three litters reacted with exfoliation on application of concentrated culture supernatant. Another 34 piglets of 17 litters only showed erythema and oedema at the application site. Littermates of each of the 20 tested litters always reacted similarly on toxin application which is probably due to the colostrum supply they got.

Because of different toxin susceptibility of pigs the exfoliative toxin was determined in a cell culture assay using fibroblast-like cells derived from mouse (L-929) and hamster (baby-hamster-kidney-cells; BHK-21). In the skin of pigs 9 mg protein proved to be the minimum dose to produce exfoliative skin alterations and in the cell culture 108 µg protein already caused a typical rounding effect.

To obtain the exfoliative toxin semipurified for vaccination the concentrated culture supernatant of *St. hyicus* was separated by gelfiltration in about 15 fractions. The biological efficacy of these fractions was tested in cell culture and in the exfoliative toxin susceptible skin of motherless reared piglets. It was found that in relation to the

non-purified culture supernatant the exfoliative protein of fractions no. 17 to 19 was concentrated by a factor of ten. The factor of purification of fraction no. 20 was about three. Fractions 17 to 20 were pooled and used for vaccination of gnotobiotic piglets after inactivation by temperature treatment (60°C; 15 min.). For comparison the non-purified concentrated culture supernatant was inactivated and used for vaccination in the same way. Although neither group showed complete protection, in comparison to the control group a partial protection against experimental infection was observed especially in piglets vaccinated with the partially purified toxin for three times. That became apparent in a protracted course of the disease.

Three or four weaned piglets of two litters, respectively, were vaccinated in the same way to confirm the results obtained with gnotobiotic piglets for conventional reared piglets. However at the time of infection neither the vaccinated nor the non-treated pigs of the control group reacted with exfoliative skin alterations.

The immunogenic effect of vaccination was investigated serologically by enzyme-linked immunosorbent assay. The most evident increase of antibody level from about 5 to 400 ELISA-units was observed in the vaccinated weaned piglets. In the gnotobiotic piglets an increase of 0 to at most 50 ELISA-units was determined at the time of infection. However the antibody level did not correlate with the protective efficacy against experimental infection.

For comparison antibody levels were determined by toxin neutralization in cultured cells as well. However using this technique even umbilical blood of the gnotobiotic piglets obtained during birth showed a neutralizing effect on the toxin of *St. hyicus* up to a serumdilution of 1:8 although this blood does not contain any antibodies at this point of time. At the end of the vaccination trials with weaned piglets the serum of vaccinated and non-treated animals showed neutralizing effects up to a serum dilution of 1:16 and 1:32, respectively. Therefore this test does not seem to be suitable for determination of antibody levels of pigs against exfoliative toxin of *St. hyicus*.

In the present investigation indications for the immunogenic efficacy of the temperature inactivated toxin of *St. hyicus* could be observed. Further investigations are planned to find out whether it is possible to obtain complete protection against infection by using a higher dose of toxin or a more highly purified toxin.