

6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit werden zwei *In-vitro*-Methoden (KBR, ELISA) zum Nachweis von Antikörpern gegen *C. botulinum* beschrieben. Die Nachweismethoden wurden hinsichtlich ihrer Eignung zur Ermittlung von Impferfolgen optimiert und unter Verwendung von Kulturtoxinen vergleichend untersucht.

Zur Bearbeitung der Fragestellungen des Antikörpernachweises mußten zuerst die in der Arbeit verwendeten Stämme von *C. botulinum* und *C. spp.* identifiziert und differenziert werden. Es wurden sowohl morphologische und biochemische als auch gaschromatographische Untersuchungen herangezogen. Die Mikromethode „Rapid ID 32 A“ erwies sich für veterinärmedizinisch relevante *C. botulinum*-Isolate als ungeeignet. Eine sichere Spezieszuordnung und Typisierung von *C. botulinum* war nur mittels Toxinneutralisation möglich. Der *C. botulinum* Typ D-Referenzstamm wurde als Typ A-Stamm identifiziert. Das im LMBG empfohlene Medium zum Nachweis toxinbildender Clostridien war suboptimal.

Mit den optimierten serologischen Verfahren wurde die Immunantwort geimpfter Kaninchen und Rinder untersucht.

- Selbst hergestellte Impfstoffe aller Typen von *C. botulinum* sowie eine kommerzielle Botulinus-C/D-Toxoid-Vaccine hatten in geimpften Kaninchen eine Antikörperbildung induziert, die sowohl mit der KBR als auch im ELISA quantitativ zu erfassen war.
- Sowohl aus geimpften Kaninchen gewonnene Antisera als auch kommerzielle Antitoxine zeigten in der KBR und im ELISA die klassischen Kreuzreaktionen A, B, F sowie C und D.
- Die KBR erwies sich wegen ihrer geringeren Sensitivität gegenüber dem ELISA als nicht geeignet zum Antikörpernachweis in den untersuchten Rinderseren.
- Die im Rahmen eines Feldversuchs in verschiedenen Rinderbeständen durchgeführten Impfungen mit südafrikanischer Botulinus-Vaccine induzierten bei den untersuchten Rindern im ersten-, zweiten- und dritten Jahr des Impfprogrammes eine im ELISA nachweisbare Immunantwort.
- Bei Kälbern (2-8 d), deren Mütter an dem Impfprogramm teilgenommen hatten, konnten mittels ELISA im Serum Antikörper gegen *C. botulinum* nachgewiesen werden.
- Akut an Botulismus erkrankte Rinder zeigten zwischen dem 7. und 9. Krankheitstag keine im ELISA nachweisbaren Antikörper.

Aufgrund der erzielten Ergebnisse erweist sich der hier erarbeitete ELISA hinsichtlich des Nachweises von Immunreaktionen auf applizierte *C. botulinum*-Vakzine als geeignet. Mit Einschränkungen bezüglich der Sensitivität ist auch die KBR bei hochtitrigen Serumproben einsetzbar. Der Vorteil beider hier vorgestellten *In-vitro*-Methoden gegenüber dem Bioassay ist der geringere zeitliche und finanzielle Aufwand sowie die Reduzierung von Tierversuchen.

6 Summary

Susanne Behrens

Serological investigations for detection of antibodies to *Clostridium botulinum*

In the work presented two *in-vitro* methods (complement fixation test, ELISA) for detection of antibodies to *C. botulinum* are described. Both methods were optimized to study the efficacy of vaccination and were compared using culture toxins. Prior to these investigations, the *C. botulinum* and *C. spp.* strains used in this study had to be identified and characterized. The methods used included morphological, biochemical and gaschromatographical assays. The micromethod „Rapid ID 32 A“ was not able to identify strains of *C. botulinum* of veterinary importance. However, species identification and typing of the strains could only be achieved in toxin neutralisation tests. The reference-strain *C. botulinum* D was identified as being type A. The medium described in LMBG for detecting all types of botulinum toxin has been suboptimal.

Using the optimized serological protocol, the immune response of vaccinated rabbits and cattle was investigated.

- Vaccines of all types of *C. botulinum* prepared in our lab as well as commercial botulinus-C/D-toxoid vaccine elicited an immune response in rabbits. Specific antibodies could be detected in the complement fixation test (CFT) and the ELISA.
- Antisera derived from vaccinated rabbits as well as the commercial antitoxins showed the classical cross-reactions A, B, F as well as C and D in the complement fixation test and in the ELISA.
- The complement fixation test has proven to be unsuitable for the detection of antibodies in the sera of vaccinated cattle due to its low sensitivity.
- Vaccinations made within a field study using a South-African botulinus vaccine in various cattle herds induced an immune response. During the first, second and third year of the vaccination programme, antibodies could be detected using the ELISA.
- In calves (2-8d), whose mothers had participated in the vaccination programme, antibodies against *C. botulinum* could be detected in the sera by using the ELISA.
- Cattle with acute botulism showed no detectable antibodies in the ELISA between the 7th and 9th day of sickness.

Based on the results achieved, the ELISA has proven to be an effective method to determine the specific immune response elicited by *C. botulinum* vaccines. The complement fixation test can also be used, but is restricted to high titred antisera.

Compared to the mouse bioassay, the two methods presented here are cost and time effective and reduce the number of experimental animals required.