cdi

Centraal Diergeneeskundig Instituut

1984

CDI – Postbus 65 – 8200 AB Lelystad

Redactie: Drs. P. W. van Olm
Foto's: F. Propsma, CDI
Druk: Van Haeringen B.V., Den Haag

© CDI, Lelystad

Niets uit deze uitgave mag worden overgenomen zonder voorafgaand overleg met het Centraal Diergeneeskundig Instituut.

Inhoud

Bestuur en directie 4
Organisatie 5
1984 7
Luchtwegaandoeningen bij kalveren 13
Zwoegerziekte 19
Carbadox: een toegift 25
Monoclonale antilichamen: een nieuwe generatie immunologische reagentia 33
Synthetische peptiden vaccins 41
Toepassing van recombinant DNA technieken bij de ontwikkeling van levende herpesvirus vaccins: constructie en biologische eigenschappen van deletiemutanten van Aujeszky's disease virus 45
Project animal vaccine production unit, Lusaka, Zambia 53
Publicaties 57
Projectenlijst 125
Productenlijst 131

Bestuur en directie

In 1984 was de samenstelling van het bestuur van de Stichting Centraal Diergeneeskundig Instituut als volgt:

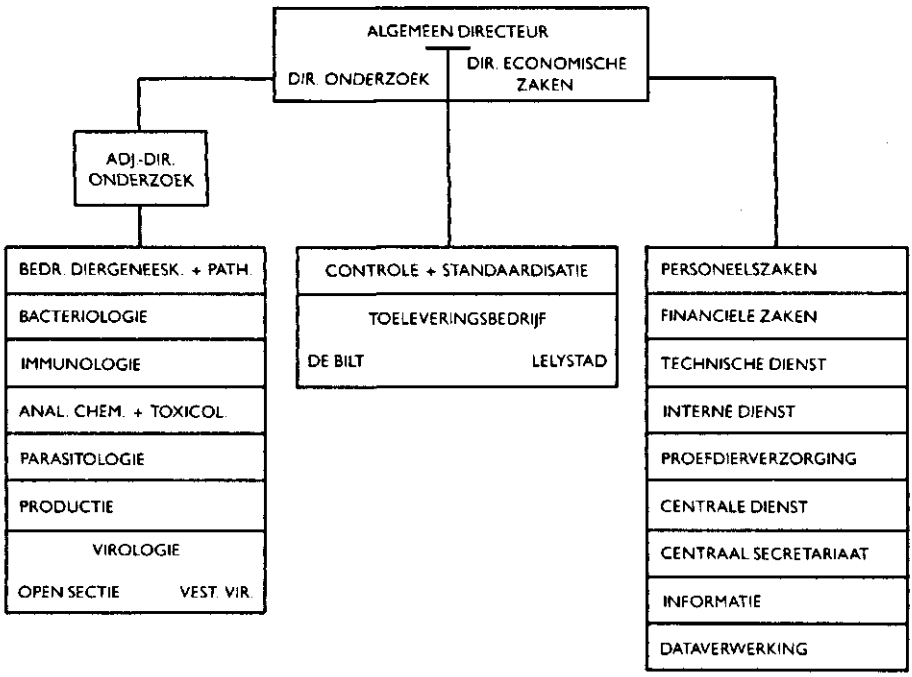
W. J. Lokhorst – *voorzitter*
Prof. Drs. D. J. Vervoorn – *onder-voorzitter*
Drs. H. A. van den Berg – *secretaris*
Prof. Dr. S. G. van den Bergh
Prof. Dr. J. Huisman
Ir. P. P. Koks
Drs. C. D. W. König
J. L. Nysingh
K. P. A. J. Boonen – *adviserend bestuurslid*
Dr. P. Leeflang – *adviserend bestuurslid*
Ir. G. Wansink – *adviserend bestuurslid*

De heer Dr. Ir. A. P. Verkaik neemt aan de vergadering van het bestuur deel als vertegenwoordiger van de Secretaris van de N.R.L.O.

De directie van het Centraal Diergeneeskundig Instituut bestaat uit:
Drs. P. H. Bool – *algemeen directeur*
Prof. Dr. J. G. van Bekkum – *directeur onderzoek*
Drs. C. F. van Nispen – *directeur economische zaken*
Dr. J. M. van Leeuwen – *adjunct-directeur onderzoek*

Organisatie

De CDI organisatie is weergegeven in onderstaand schema



1984

Binnen het instituut werd het jaar 1984 in het bijzonder gekenmerkt door een drietal ontwikkelingen.
In de eerste plaats de evaluatie door de Directie Organisatie en Efficiency van het Ministerie van Landbouw en Visserij van de reorganisatie van het instituut in 1982; vervolgens de door het Ministerie opgelegde personeelsbeperkingen en de hiermee gepaard gaande discussies over de taakstelling van het instituut, in het bijzonder m.b.t. de diagnostische werkzaamheden en tenslotte de, door de bezuinigingen vanwege de centrale overheid groeiende noodzaak tot het verkrijgen van externe financiering van diverse onderzoekprojecten van het instituut. De discussies over de eerste twee genoemde onderwerpen zijn nog in volle gang; de activiteiten m.b.t. het derde punt zullen, naar het zich laat aanzien, in de komende jaren steeds meer aandacht vragen.

Naast deze algemene ontwikkelingen waren er, in het organisatorische vlak, nog een aantal meer specifieke zaken die in dit verslag gemeld moeten worden.
Zo werd t.a.v. het Toeleveringsbedrijf, dat op dit moment nog vestigingen heeft in De Bilt en in Lelystad, definitief besloten dat de vestiging De Bilt zal worden gesloten en dat de activiteiten van De Bilt overgebracht zullen worden naar Lelystad. In de gebouwen van het Toeleveringsbedrijf en in het Hoofdgebouw aan de Edelhertweg zullen daartoe voorzieningen worden getroffen.

De organisatie van de zorg voor de veiligheid van het werk binnen het instituut werd in 1984 afgerond. Naast een groepering in de vestiging Virologie met aan het hoofd een veiligheidsfunctionaris speciaal belast met de zorg voor de externe veiligheid, d.w.z. bescherming van de buitenwereld tegen besmetting door organismen waarmee binnen de Vestiging wordt gewerkt, werd besloten in de Vestiging Virologie, zowel als in het Hoofdgebouw veiligheidsfunctionarissen aan te stellen verantwoordelijk voor de interne veiligheid in het kader van de ARBO-wet. Deze zullen worden ondersteund door een groep van deskundigen, verenigd in een Veiligheidsadviesgroep. Aangezien voor het aantrekken van veiligheidsfunctionarissen geen extra formatieplaatsen worden toegekend, wordt dit werk tijdelijk als deeltijdfunctie door 3 van onze medewerkers uitgeoefend.

In 1984 nam de Directie Materiële Zaken het besluit een onderzoek in te stellen naar de bouwkundige staat van de Vestiging Virologie. Besloten werd tot een omvattende analyse over te gaan, waarbij eventuele noodzakelijke aanpassingen aan de orde komen, zodat een totaalplanning kan worden opgemaakt. Verwacht mag worden dat gedurende 1985 dit plan gereed zal komen.

Aan het eind van 1984 ontving het instituut het door het Ministerie opgezette Administratie Pakket Landbouw, zodat de administratieve organisatie van het instituut, in de loop van 1985 in overeenstemming hiermee zal worden gereorganiseerd.

De in het vorig jaarverslag gesignaleerde reorganisatie waarbij het instituut werd ondergebracht in de Directie Landbouwkundig Onderzoek, zal eerst per 1 januari 1985 worden gerealiseerd.

De nijpende financiële situatie, die nu reeds een aantal jaren bestaat, zet het onderzoek onder toenemende druk. Deze problemen gaan niet aan het CDI voorbij.
Consequenties zijn onder meer:

- De mogelijkheden om de internationale ontwikkelingen te volgen staan onder druk. Doordat introductie van moderne methoden en technieken een kostbare zaak is, is het gevaar aanwezig dat een deel van het onderzoek moet worden uitgevoerd met suboptimale middelen d.w.z. inefficiënt. In bepaalde gevallen zal het gestelde doel daardoor niet bereikt kunnen worden.
- Capaciteitsgebrek noodzaakt tot scherpere prioriteitsstelling. Op zichzelf is hier niets tegen, echter: objectieve prioriteitsstelling blijkt moeilijk. Welke prioriteit moet men toekennen aan diagnostiek, min of meer routinematig, ten dienste van de praktijk t.o.v. het ter hand nemen van nieuwe ontwikkelingen?
  De afgelopen decade heeft het CDI relatief veel aandacht geschonken aan sterfte onder wilde vogels. Onder meer werd een inzicht verkregen in de mate waarin roofvogels, tegen de wettelijke bepalingen, nog het slachtoffer worden van vergifitiging of hagel. Het zal vermoedelijk nodig zijn deze activiteiten te staken, indien geen externe financiering wordt gevonden. Over de aan dit onderzoek toe te kennen prioriteit wordt echter in verschillende kringen zeer ongelijk gedacht.
- De behoefte aan capaciteit en middelen leidt tot het zoeken van alternatieve geldbronnen. Deze zijn in beperkte omvang beschikbaar, hetzij via organisaties als Z.W.O., Fungo, E.G. of S.T.W., hetzij via de industrie.
  De procedures om toegang tot deze middelen te krijgen zijn arbeidsintensief, de einduitkomst van de inspanningen is veelal onvoorspelbaar. De noodzaak tot evaluatie van ingediende plannen o.a. in het kader van „voorwaardelijke financiering" heeft, met name in de kringen van het landbouwkundig onderzoek, geresulteerd in een gigantisch controlecircuit, waarbij iedereen elkaar „evalueert".
  Daarnaast is er, last but not least, een gevaar dat, omwille van de beschikbaarheid van extern geld, capaciteit gebruikt wordt voor het verrichten van

onderzoek dat in feite, vanuit de doelstellingen van het instituut, een lage prioriteit zou moeten hebben.

Deze problemen op zichzelf vormen reeds een belasting voor de onderzoekcapaciteit.

Veewetziekten, vanouds een terrein waarop het CDI actief is, hielden ons in toenemende mate bezig.
De rond de jaarwisseling begonnen mond- en klauwzeerepisode werd relatief snel afgesloten. De in de praktijk genomen maatregelen waren niet in staat verbreiding van de smetstof vanuit de N.O.P. naar de kop van Noord-Holland te voorkomen. Snelle vaccinaties gekoppeld aan veterinaire politiemaatregelen slaagden er echter in het aantal besmette bedrijven beperkt te houden tot zes. Toepassing van stamping-out zal voorkòmen hebben dat er op grote schaal virusdragers achterbleven. De smetstof heeft de varkensstapel niet bereikt òf had er geen affiniteit voor – de gevreesde uitbreiding naar de varkens bleef achterwege.
Het onderzoek naar de herkomst van de smetstof wees uit dat het veldvirus nauw verwant was met de voor de vaccinproductie gebruikte virusstam OBFS 1860. Er werden echter geen aanwijzingen verkregen dat een onvoldoende geïnactiveerd vaccin aan de wieg van de problemen had gestaan: de ziekte was al aanwezig voordat het (vermoedelijk) eerst aangetaste bedrijf werd gevaccineerd.
Daarbij leverde een, mede met inschakeling van een externe deskundige, ingesteld onderzoek binnen het CDI geen aanwijzingen dat er van een smetstofontsnapping uit het instituut sprake kon zijn geweest.
Wel was het incident aanleiding om nog eens voor wat betreft te nemen veiligheidsmaatregelen, de puntjes op de „i" te zetten.

In 1983 kwam, voor het eerst sinds 1977, weer rabies in ons land voor. Het was voor het eerst sinds het begin van de twintiger jaren dat het virus ook vaste voet kreeg. In Zuid-Limburg werden in 1984 niet minder dan 65 gevallen gediagnosticeerd, het merendeel bij vossen (38), maar ook een aantal runderen en schapen werden besmet gevonden.
De toegenomen infectiedruk resulteerde in een sterke toename van het aantal inzendingen voor diagnostisch onderzoek – totaal 1010, ca. ¾ had betrekking op in het wild levende dieren.

Bij rabiesverdenking van huisdieren is er veelal ook sprake van aan de infectie blootgestelde personen, het stellen van een definitieve diagnose is dan een urgente zaak. De belasting die de betreffende onderzoekafdeling ondervond vindt daarom maar een gedeeltelijke afspiegeling in de vermelde aantallen.

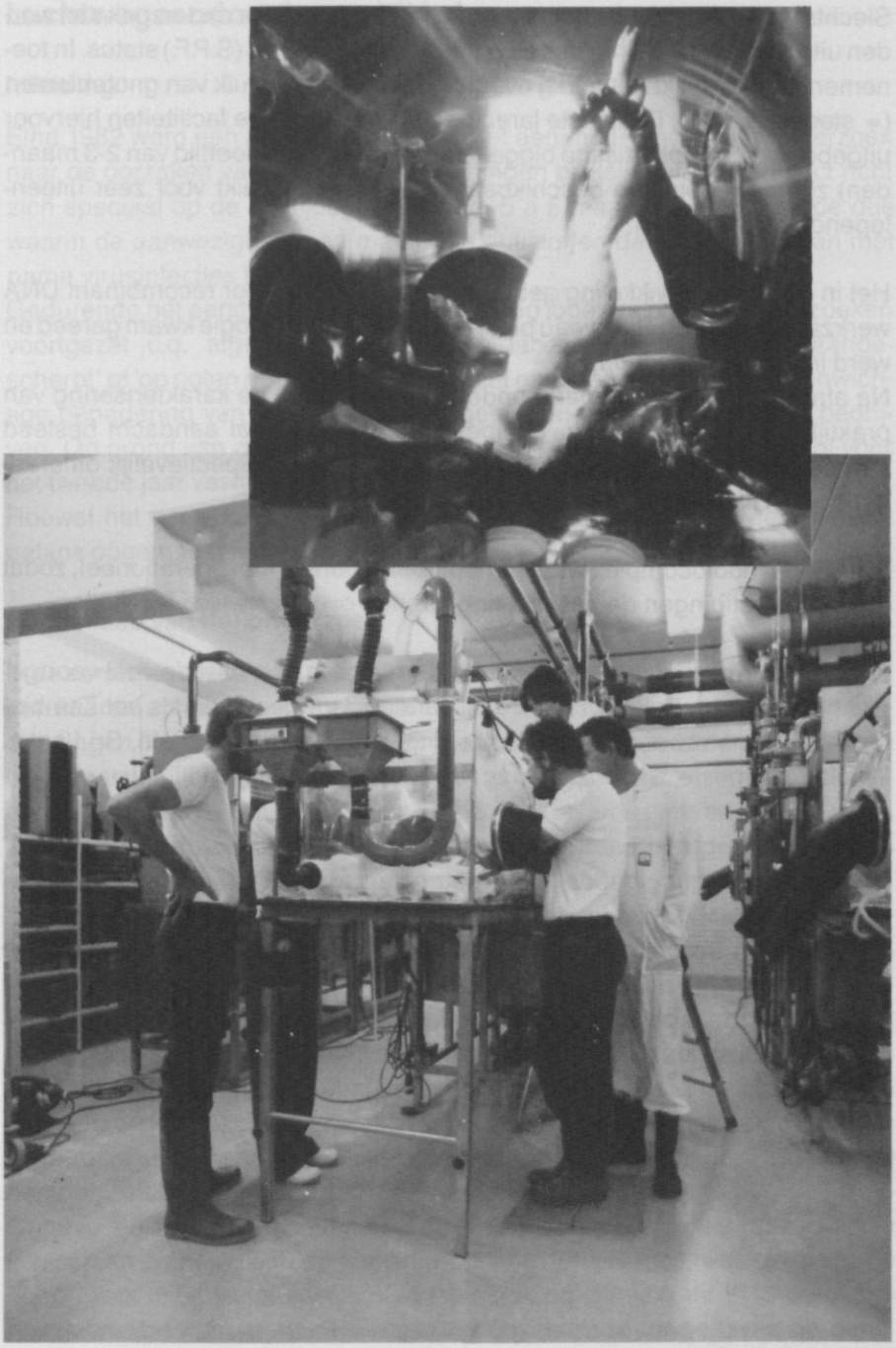
Overigens bleek opnieuw dat hondsdolheid voor het Nederlandse publiek geen levend begrip is.
In natuurbeschermingskringen heeft men neiging om de risico's voor de mens niet al te zwaar te nemen („je kunt immers de honden enten"), terwijl ook het grote publiek zich niet voldoende van het gevaar bewust is.

Ook de varkenspestsituatie ontwikkelde zich onbevredigend.
Het aantal entgebieden moest sterk worden uitgebreid (van 4 tot 13), zodat uiteindelijk ca. éénderde van het Nederlandse grondgebied, maar ca. 75% van de varkensstapel, werd geënt. Dit massale gebruik van vaccin geeft op meerdere gronden reden tot bezorgdheid. De storing van de immuunresponse van de biggen bij de zgn. na-entingen door maternale antistoffen neemt toe. In de praktijk werden daardoor in verschillende gebieden slechts relatief lage percentages serologisch positieve varkens gevonden.
Het diagnostisch onderzoek (ca. 11.000 inzendingen voor virusdetectie, en ruim 25.000 voor serologie) betekende een grote hoeveelheid werk voor de betreffende onderzoekafdeling.
Concentratie van onderzoek en diagnostiek in één hand heeft echter, met name bij een ziekte als varkenspest, eminente voordelen.

De samenwerking met de laboratoria van de regionale Gezondheidsdiensten voor Dieren op het gebied van de virologische diagnostiek ontwikkelde zich in gunstige zin.
Behalve dat bepaalde diagnostica ter beschikking konden worden gesteld, werden in onderling overleg ook commercieel beschikbare kits geëvalueerd. Op een themadag werd een ELISA voor de detectie van BRS-virusantilichamen geïntroduceerd. T.a.v. de landelijke standaardisatie van testprotocollen voor Aujeszky-, IBR- en influenza-antistoffen werden afspraken gemaakt.

Ten dienste van de bestrijding van lymfoïde leukose bij pluimvee is een test ontwikkeld voor het opsporen van het virale P27 antigeen en overgedragen aan de Gezondheidsdienst voor Pluimvee.

Op het gebied van het gebruik van proefdieren doen zich de laatste jaren ingrijpende ontwikkelingen voor.
Enerzijds is er een streven de aantallen gebruikte proefdieren te beperken. De Wet op de Dierproeven stelt regels t.a.v. te voeren administratie en toezicht. Anderzijds stelt het onderzoek zijn eigen eisen.
Meer dan in het verleden richten de vragen zich op ziekteproblemen, vaak met belangrijke infectieuze componenten, die enzoötisch zijn in onze veestapel.



In een steriele isolator verricht men een keizersnee bij een varken teneinde ziektekiemvrije biggen te krijgen.
Inzet: Een kijkje in de 'verloskamer'.

Slechts in een deel van de gevallen kan het noodzakelijke onderzoek dan worden uitgevoerd met dieren met Specified Pathogen Free (S.P.F.) status. In toenemende mate blijkt het nodig over te gaan op het gebruik van gnotobionten (= steriele dieren). De laatste jaren heeft het instituut de faciliteiten hiervoor uitgebouwd. Gnotobiotische biggen en kalveren (tot de leeftijd van 2-3 maanden) zijn nu regelmatig beschikbaar en worden gebruikt voor zeer uiteenlopende onderzoeken.

Het in 1983 tot ontwikkeling gebrachte laboratorium voor recombinant DNA werkzaamheden op CII niveau binnen de vestiging Virologie kwam gereed en werd in gebruik genomen.
Na afronding van een beperkt onderzoek gericht op de karakterisering van praktijkisolaten van pseudovogelpestvirus wordt vooral aandacht besteed aan de ontwikkeling van methoden voor aantonen, respectievelijk differentiatie, van BVD- en varkenspestvirus RNA.

Binnen het hoofdcomplex werd het isotopenlaboratorium operationeel, zodat nu beide vestigingen de beschikking hebben over dergelijke faciliteiten.

De activiteiten m.b.t. ontwikkelingslanden werden op dezelfde voet voortgezet, het project in Pakistan bleef veel aandacht vragen, evenals het Zambia-project. Voorts werden korte missies uitgevoerd naar Indonesië, Sri Lanka, Thailand, Tunesië, Sultanaat Oman en India.

Bij het van de grond brengen van het visziekte-onderzoek binnen het CDI werd geen voortgang geboekt. Met name de onduidelijke situatie met betrekking tot de beschikbare formatie was hier debet aan.
Formatieve problemen waren eveneens de oorzaak van de stagnatie in de ontwikkeling van een groep gericht op ondersteuning van het CDI onderzoek vanuit de epidemiologische discipline.

Luchtwegaandoeningen bij kalveren

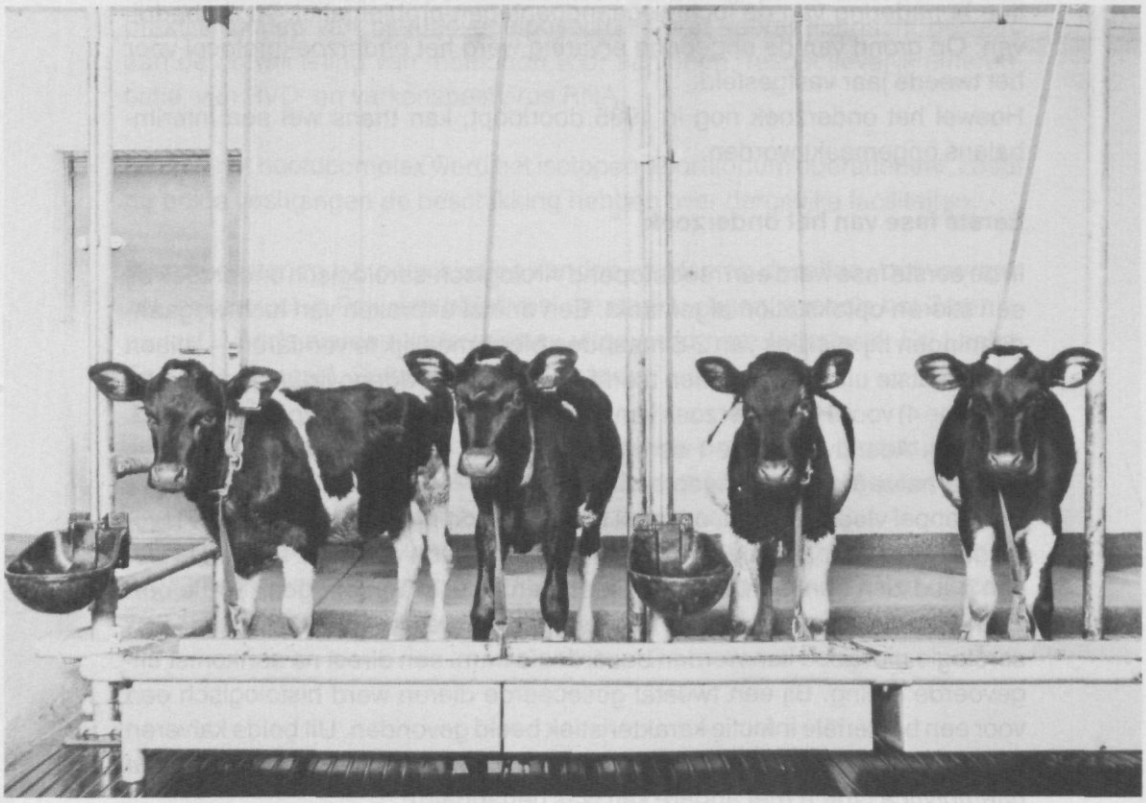
Inleiding

Eind 1982 werd een aanvang gemaakt met een multi-disciplinair onderzoek naar de oorzaken van luchtwegaandoeningen bij kalveren. Het project richt zich speciaal op de leeftijdsgroep tot ca. 5 à 6 maanden, een periode dus waarin de aanwezigheid van maternale antistoffen de diagnostiek van met name virusinfecties kan bemoeilijken.
Gedurende het eerste jaar werden enkele nog lopende praktijk onderzoeken voortgezet c.q. afgemaakt, werden de laboratoriumtechnieken 'aangescherpt' of 'op poten gezet' en werd gezocht naar een effectieve en evenwichtige benadering van de luchtwegaandoeningen-problematiek op de bedrijven. Op grond van de opgedane ervaring werd het onderzoekprotocol voor het tweede jaar vastgesteld.
Hoewel het onderzoek nog in 1985 doorloopt, kan thans wel een interimbalans opgemaakt worden.

Eerste fase van het onderzoek

In de eerste fase werd een reeds lopend virologisch-serologisch onderzoek bij een stieren-opfokstation afgemaakt. Een drietal uitbraken van luchtwegaandoeningen bij stiertjes van 2-5 maanden bleek moeilijk te verklaren – alleen bij de laatste uitbraak kwamen titerstijgingen tegen adenovirus (gemeten tegen type 4) voor. Het onderzoek van neusswabs leverde niets op; de IBR-, PI-3, BRS- en Adenovirus type-1 serologie evenmin. Een gefundeerd entadvies kon derhalve (nog) niet uitgebracht worden.
Een koppel vleeskalveren, opgezet bij een van de proefbedrijven in de Flevopolder, werd vanaf het begin klinisch en serologisch vervolgd. De eerste weken deed zich een luchtwegziekteprobleem voor, waarvoor geen virale oorzaak kon worden aangewezen. Daarbij moet aangetekend worden dat de IBR serologie niet goed kon worden beoordeeld i.v.m. een direct na aankomst uitgevoerde enting. Bij een tweetal geseceerde dieren werd histologisch een voor een bacteriële infectie karakteristiek beeld gevonden. Uit beide kalveren werden mycoplasma-species geïsoleerd, uit één ervan ook *Pasteurella haemolytica* type A (het andere kalf was behandeld).
Ongeveer 8-10 weken na aankomst deed zich opnieuw een uitbraak voor, die klinisch en pathologisch op pinkengriep leek. Eén van de twee geseceerde dieren was IFT-positief voor BRS-virus. Serologisch kon de BRS-diagnose niet bevestigd worden, noch kon een andere oorzaak aangegeven worden.
Drie maanden later deed zich in dezelfde koppel opnieuw een uitbraak voor. Deze uitbraak deed klinisch en pathologisch weer aan pinkengriep denken. Drie dieren werden geseceerd. Alle waren IFT-negatief t.a.v. IBR-, BVD-, PI-3

en BRS-virusinfecties. Bij 2 van de 3 dieren werd *Mycoplasme bovis* geïsoleerd. Het serologisch onderzoek duidde niet op een BRS-virusinfectie. Een reeds lang met luchtwegaandoeningen te kampen hebbend regionaal onderzoekcentrum werd ruim 6 maanden nauwgezet vervolgd en begeleid. Men had in de zomer van 1982 de aanwezige 2 typen kalverstallen leeggemaakt. Gedurende de onderzoekperiode trad geen ernstig luchtwegprobleem meer op. In de gesloten stal werd wel wat meer hoesten geconstateerd dan in de open stal. Dit zou mogelijk terug te voeren zijn op PI-3 infecties, althans in een bepaalde periode. Daarbuiten konden geen ziektekundige oorzaken aangewezen worden. Enkele secties op acuut zieke dieren gaven een sterk variabel beeld te zien.



Kalveren in proefopstelling.

Bij een koppel vleeskalveren van een proefbedrijf werd nagegaan of regelmatige neusbemonstering bruikbaar zou zijn voor bacteriologisch onderzoek. Een tiental kalveren werd regelmatig bemonsterd; het onderzoek werd kwantitatief uitgevoerd. Hoewel bij de kalveren in deze periode geen enkel symptoom werd waargenomen van een luchtweginfectie, bleken de gevonden

waarden zeer variabel, zowel wat betreft Pasteurellae als mycoplasma's. Een vergelijking met de long-bacteriologie kon niet worden gemaakt door het ontbreken van secties. De variabiliteit van dag tot dag in de gevonden kiemgetallen per swab, bleek echter te groot om dit onderzoek verder voort te zetten. Tenslotte werd in het eerste jaar één 'praktijk' (d.w.z. géén proefbedrijf of opfokstation) probleem-bedrijf met ruim 200 melkkoeien geruime tijd vervolgd. De problemen deden zich steeds voor bij kalveren van 2-3 maanden. De resultaten van het onderzoek toonden aan dat BRS-virus hier de oorzaak van de problematiek was, en dit ondanks een parenterale pinkengriep-enting (BRS-virus) op de leeftijd van 2, 3 en 4 maanden.

Tweede fase van het onderzoek

Op een vijftal melkveebedrijven (W, B, Z, H en G), waar men in het verleden voortdurend problemen ondervond met luchtwegaandoeningen bij kalveren, werden regelmatig controles verricht en monsters verzameld. Alle bloedmonsters werden getritreerd op antistoffen tegen IBR-, BVD-, BRS- en PI-3-virus. Op gestorven (of afgemaakte) ter sectie verkregen kalveren werd pathologisch, histologisch, bacteriologisch en virologisch onderzoek verricht. Cytologisch en microbiologisch onderzoek werd uitgevoerd op longspoelingsvloeistof verkregen via een nieuw-geïntroduceerde onderzoekmethode en op neusswabmateriaal.

Een zelfde onderzoek als boven werd verder ingesteld naar aanleiding van acute, min of meer ernstige, problemen op de bedrijven C (melkvee), K (opfokstiertjes), I (meststiertjes) en P (P-2 melkvee, P-6 meststiertjes).

Ter verkrijging van een (voorlopig) overzicht zijn de gegevens schematiserend en simplificerend in de tabel op pagina 16 weergegeven.

Uiteraard is dit schema niet 'zwart-wit'. Er is bijvoorbeeld rekening gehouden met de gangbare mening in de literatuur ten aanzien van het belang van bepaalde agentia. Bovendien is het mycoplasma-onderzoek nog niet afgerond en verder zijn er nog méér mogelijke virale en bacteriële oorzaken waarop (nog) géén onderzoek verricht is.

Een aantal punten kunnen n.a.v. het schema en vooral uit de er aan ten grondslag liggende gegevens al wel naar voren gehaald worden.

1. Door de introductie van de longspoelingsmethode als diagnostisch hulpmiddel is het aantal geïsoleerde agentia gestegen. BRS-virusisolaten wor-

Karakter van het probleem (bedrijf)	*Management/ huisvesting*	*Vermoedelijke oorzaak*	*Andere (geïsoleerde) agentia van mogelijk belang*
Mild, maar doorlopend:			
–B	slecht/slecht	combinatie factoren	BVD, PI-3. BRS P.m.[1]), H.s., myc.,[2])
mild, beperkte periode:			
–W	redelijk/matig	PI-3	—
–Z	goed/goed	PI-3, BVD, P.h.	—
–H	matig/matig	?	BVD, P.m.
Min of meer acuut:			
–G nov./dec.	matig/matig	BRS	BVD, P.h., H.s.
idem juni		H.s., P.h. Mycoplasma's(?)	BVD
–K	goed/goed	BRS	Myc. arginini
–C	goed/goed	BRS	PI-3, BVD, P.m.
–I, oktober	goed/goed	BRS, BVD	P.m. + P.h., H.s.
idem apr./mei	goed/goed	H.s., P.h., P.m., BVD, PI-3(?)	
–P2	goed/goed	BRS	H.s.
–P6	goed/goed	BRS	H.s., P.M., Myc. bovis, BVD

1) P.m. = *Pasteurella multocida*, P.h. = *Pasteurella haemolytica*, H.s. = *Haemophilus somnus*.
2) Mycoplasma-onderzoek nog niet afgerond; *M. bovirhinis* niet opgenomen.

den nu zeer regelmatig verkregen, terwijl dat op andere wijze altijd buitengewoon lastig was. Ook BVD- en PI-3-virus worden regelmatig geïsoleerd uit longspoelingsvloeistof. Op het belang van de methode voor met name de BRS-virus diagnostiek bij jonge dieren zal gewezen worden in een aparte publicatie. Tot dusverre zijn er geen nadelige gevolgen van de spoeling(en) gemeld. De mogelijkheden die de techniek biedt voor het bacteriologisch onderzoek zijn nog niet duidelijk. Probleem daarbij is de contaminatie met neus-inhoud die optreedt. De mate daarvan zou via vergelijking met bacteriologisch onderzoek van sectie-materiaal kunnen worden geschat, maar bruikbare vroege secties zijn er te weinig geweest.

2. De serologische diagnostiek ten aanzien van BRS-virus, maar ook voor BVD- PI-3-virus, bleek gestoord te kunnen worden door de aanwezigheid

van maternale antistoffen. Het onderzoek van een extra (derde) bloedmonster na nog eens enkele weken bood, althans wat betreft de diagnostiek van BRS-virusinfecties, geen uitkomst.

3. Bij de acute en ernstige ziekte-uitbraken die onderzocht werden bleek vrijwel steeds BRS-virus betrokken te zijn. Het klinisch beeld is dan niet dat van de 'klassieke' pinkengriep bij oudere dieren. Uitbreiding van de gegevens over BRS-virus als oorzaak van acute problemen bij jonge kalveren is daarom gewenst, evenals meer inzicht in de pathogenese, immunologie en epidemiologie van de infectie. Dit klemt temeer omdat zelfs van een driemalige vaccinatie van kalveren onder de vijf maanden met de bestaande vaccins nauwelijks effect mag worden verwacht (onderzoek bedrijf K en C).

4. BVD-virus werd regelmatig geïsoleerd bij jonge kalveren, terwijl op een aantal bedrijven er ook serologische aanwijzingen waren dat het virus al bij de jonge dieren circuleerde. Soms waren er tezelfdertijd ziekteproblemen onder de kalveren (B, H en I) en soms niet of nauwelijks (Z en K). Ook waren er kalveren die '2×' een titerstijging vertoonden of juist helemaal niet. Het in het kader van het BVD-project te verrichten onderzoek zal mogelijk ook wat licht op deze praktijkbevindingen werpen.

5. Para-infleunza-3 virus komt op alle bedrijven voor, maar lijkt slechts incidenteel betrokken bij problemen (B, W en Z). Het is echter niet uitgesloten dat (ook hier) een frequentere toepassing van de longspoelseltechniek méér isolaten zal gaan opleveren.

6. IBR-virus lijkt géén rol te spelen bij de enzoötische kalverpneumonie, noch bij de meer acute uitbraken van luchtwegaandoeningen bij kalveren.

7. De rol van *Haempohilus somnus* verdient verdere aandacht: de isolaten werden tot dusverre vrijwel steeds verkregen van klinisch zieke dieren.

8. Pasteurellae werden regelmatig gevonden, hetgeen op grond van de literatuur verwacht kon worden. Eventueel verder onderzoek zal zich richten op het effect van combinaties met virussen.

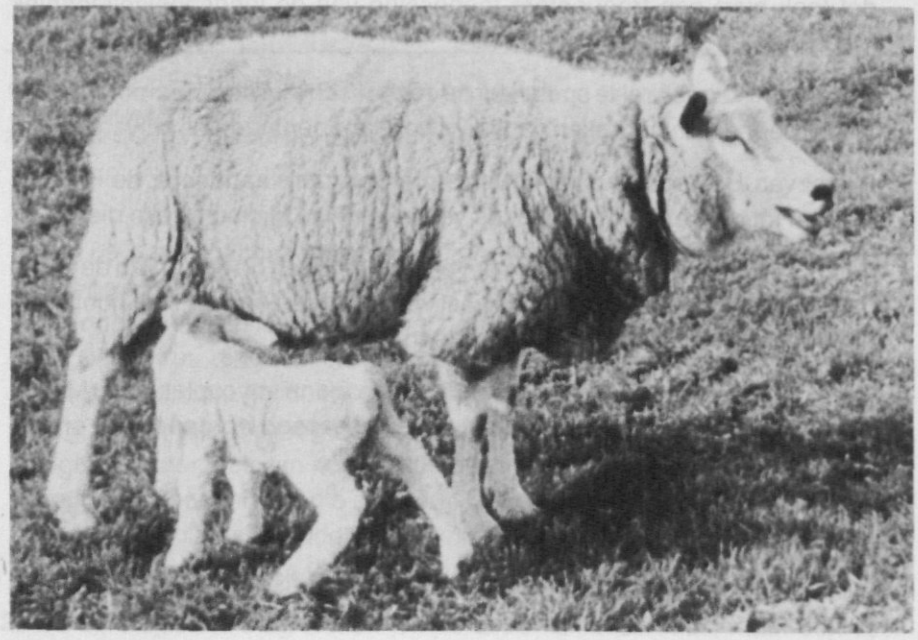
9. Over het vóórkomen en belang van de 'pathogene' mycoplasma's (M. dispar, M. bovis en Ureaplasme) kan nog weinig gezegd worden tot het onderzoek is afgerond.

Toekomst

Gedurende het derde en laatste jaar van dit inventariserende onderzoek zal de aandacht met name gericht zijn op de oorzaken van min of meer massale uitbraken van luchtwegaandoeningen bij kalveren. De waarde van de

longspoelingstechniek voor de bacteriologische diagnostiek en die van een nieuw-ontwikkelde IgM-ELISA voor de BRS-virus-diagnostiek zal onderzocht worden. Tenslotte zal in de verdere toekomst het Mycoplasma-onderzoek afgerond worden, waardoor we een beter beeld van het belang van de betreffende infecties hopen te krijgen.
De verwachting is dat de resultaten van dit inventariserende onderzoek zullen leiden tot een aantal separate vraagstellingen c.q. lijnen van onderzoek. Eén vraagstelling, namelijk die t.a.v. bepaalde aspecten van BRS-virusinfecties zoals geformuleerd onder punt 3, is reeds 'vertaald' in een daarop afgestemd project.

Het onderzoek naar luchtwegaandoeningen bij kalveren wordt uitgevoerd door dr. P. W. de Leeuw, drs. E. M. Kamp, drs. T. G. Kimman, drs. E. A. ter Laak, drs. P. J. Straver, drs. G. M. Zimmer en medewerkers.



Zwoegerziekte.

Zwoegerziekte

Georganiseerde zwoegerziektebestrijding

Op 1 januari 1982 ging de landelijke zwoegerziektebestrijding bij schapen van start. Dit programma van de Stichting Gezondheidszorg voor Dieren werd ontworpen op basis van de uitgangspunten, welke door het CDI op grond van onderzoek zijn omschreven. Het draaipunt van dit programma is een certificaat, dat wordt uitgereikt t.b.v. dieren, die worden aangekocht van een bedrijf, dat aan bepaalde voorwaarden heeft voldaan. De belangrijkste voorwaarde is een tweemalig serologisch onderzoek op antistoffen tegen zwoegerziektevirus van de gehele koppel met negatief resultaat en een tussenperiode van 6 maanden, waarna het bedrijf certificaatwaardig wordt. Om het certificaat te behouden moet een jaarlijks controleonderzoek plaats vinden. Voorts dient de deelnemende schapenhouder te voldoen aan de aan het programma gekoppelde reglementen, welke tot doel hebben de kans op herbesmetting van de koppel zo klein mogelijk te houden om zodoende de koper van gecertificeerde dieren een optimale garantie te bieden dat de aangekochte dieren inderdaad vrij van zwoegerziektevirus zijn. Zoals reeds aangegeven liggen zowel opzet, uitvoering (d.w.z. stimulering, administratie en begeleiding) als voorbewerking van de bloedmonsters in handen van de Gezondheidsdiensten voor Dieren. De bloedmonsters worden afgenomen door de praktiserende dierenarts en opgestuurd naar de regionale Dienst, alwaar het voor het onderzoek benodigde serum wordt gewonnen en 'testklaar' wordt afgevuld.

Serologisch onderzoek

Het eigenlijke serologische onderzoek vindt plaats op het CDI, dat hiervoor in 1979 een speciale test ontwikkelde, de zgn. ELISA. Een zeer gevoelige, efficiënte en betrouwbare test is van essentieel belang voor het welslagen van een dergelijk programma. De ELISA voldeed aan deze eisen, doch gaandeweg bleek in een zeer klein aantal gevallen dat de betrouwbaarheid toch nog te wensen overliet; ontwikkeling van een confirmatietest voor positieve uitslagen bleek noodzakelijk. In eerste instantie werd een zgn. blocking-test ontwikkeld, die gedeeltelijk in de behoefte voorzag. De behoefte aan een optimale confirmatietest bleef bestaan. De, in theorie, ideale oplossing leek te liggen in een test op basis van monoclonale antistoffen en zodoende werd relatief veel tijd gestoken in het produceren daarvan. Alvorens daaraan te beginnen moest een techniek worden ontwikkeld waarmee uit het ontstane scala van antistoffen de juiste zouden kunnen worden geselecteerd. Als basis hiervoor werd een juist beschikbaar gekomen techniek gebruikt, welke voor ons

specifieke doel verder werd ontwikkeld (Western-blot). Vervolgens kon aan de produktie van genoemde antistoffen worden begonnen. Nadat produktie en selektie gevolgd door aanmaak waren afgerond kon worden onderzocht of deze antistoffen inderdaad de, op grond van theorie, verwachte oplossing zouden bieden.

De eerste opstelling die werd beproefd was een zgn. Indirect Double Antibody Sandwich, waarbij de monoclonale antistof wordt gebruikt om het virale antigeen aan het testplaatje te koppelen. Een belangrijk voordeel hiervan is dat het antigeen niet eerst behoeft te worden gezuiverd, maar als het ware op de plaat wordt gezuiverd.
De resultaten die met deze opstelling werden geboekt waren echter teleurstellend; een paar sera bleken sterk vals-positief te reageren. De verklaring hiervan bleek slechts hypothetisch.
De volgende opstelling welke werd getest was een zgn. Double Antibody Sandwich blocking, waarbij evenals in de vorige opstelling een monoclonale antistof het antigeen aan het testplaatje bindt en bovendien een andere monoclonale antistof (tegen het antigeen) gekoppeld aan peroxidase als conjugaat gebruikt wordt. Bij uitvoering in de voor deze opstelling gebruikelijke volgorde werd eveneens geen resultaat geboekt! Na lang zoeken werd ontdekt dat bij uitvoering in een afwijkende volgorde wel resultaat werd verkregen!
Uitvoerige evaluatie leerde dat deze test behalve gevoelig ook nog zeer betrouwbaar was. De nieuwe test kreeg op grond van haar werkingsprincipe de naam Complex Trapping Blocking ELISA, kortweg: CTB.
Momenteel worden alle sera die een positieve reactie in de routine test geven in de CTB aan confirmatie-onderzoek onderworpen, waardoor de uitgaande uitslagen nog eens extra aan betrouwbaarheid hebben gewonnen. Vanzelfsprekend is dit van het grootste belang voor de individuele schapenhouder maar ook voor het welslagen van het zwoegerziektebestrijdingsprogramma in het algemeen.

De praktijk

Dat dit programma op grote belangstelling van de schapenhouderij en met name de stamboekfokkerij kan rekenen mag blijken uit het feit dat aan het einde van 1984 zich ± 1200 bedrijven hadden aangesloten, waarvan 650 de certificaatwaardige status reeds bereikten of behielden. Tengevolge hiervan nam vanaf het begin in 1982 het aantal jaarlijks door ons geteste sera gestaat toe tot bijna 28000 in 1984.
Met het op gang komen van de georganiseerde bestrijding ontstond ook behoefte aan speciale 'zwoegervrije' stamboekkeuringen die zo'n vlucht namen dat ze in het afgelopen jaar de andere keuringen in aantal en belangstelling reeds overvleugelden.

Hoewel de deelname aan het programma zich gunstig ontwikkelde waren er in de eerste twee jaren toch enkele resultaten, die niet erg bemoedigend leken. Op een paar bedrijven werd een abnormaal verloop van de bestrijding geconstateerd en bovendien werden op een tiental gecertificeerde bedrijven bij het jaarlijkse controle onderzoek toch weer positieve dieren gevonden. Dit laatste was in overeenstemming met eigen ervaring op een van onze bedrijven uit de praktijkproef, waar na drie jaar plotseling weer positieve dieren opdoken zonder dat daarvoor een praktische verklaring werd gevonden. Uit eigen en buitenlandse experimenteel onderzoek was gebleken dat het mogelijk zou zijn dat besmette dieren gedurende lange tijd geen of in het geheel geen antistoffen vormen. De uitgebreide praktijkproef van het CDI, die in 1979 van start was gegaan, had echter een zodanig resultaat dat werd aangenomen dat dit fenomeen zich onder praktijkomstandigheden nauwelijks of niet zou voordoen. Dit aanvankelijke optimisme bleek dus niet geheel bewaarheid te zullen worden en was voor betrokken onderzoekers, uitvoerenden en schapenhouders reden de hooggespannen verwachtingen bij te stellen. Echter, in 1984 raakten slechts drie van het sterk toenemend aantal gecertificeerde bedrijven hun status kwijt, hetgeen doet vermoeden dat de tendens van de eerste twee jaar zich niet voortzet en voorzichtig optimisme toch weer op zijn plaats lijkt.

Proef Natuurlijke transmissie-Zwartebroek

In 1980 werd een proef gestart om de eventuele horizontale verspreiding van het virus onder praktijkomstandigheden over langere tijd te bestuderen. Hiertoe werden 18 zwoegerziektevrije en 2 besmette ooien samengebracht onder normale bedrijfsomstandigheden en met regelmaat serologisch onderzocht. De meest ongunstige situatie werd gesimuleerd door de nakomelingen van positieve ooien zoveel mogelijk aan te houden.
Gedurende het eerste jaar van de proef werd geringe spreiding van het virus waargenomen, maar tegen het eind van het tweede jaar werd plotseling relatief sterke spreiding vastgesteld na een periode van zeer slechte voedingstoestand en zware infectie met Melophagus ovinus (schapeluisvlieg; 'schapeteek').

Aan het eind van 1984 waren nog zeven ooien van de oorspronkelijke koppel in leven, waarvan er vijf positief waren geworden. Deze dieren zijn dus via horizontale weg besmet geraakt. De van deze generatie afstammende en aangehouden dieren zijn vrijwel allemaal positief en dus besmet. Het blijft de vraag of dit een gevolg is van lactogene dan wel horizontale verspreiding.
Duidelijk is echter wel dat horizontale verspreiding een rol van betekenis kan spelen in de epidemiologie van deze infectie. Op zich is dit in tegenstelling met onze praktijkwaarnemingen, waaruit blijkt dat horizontale verspreiding nauwelijks een rol speelt. Het is niet onwaarschijnlijk dat de tijdelijke slechte voe-

dingstoestand grote invloed heeft gehad op de verspreiding in deze proefkoppel. Een mogelijke bijdrage van de eveneens tijdelijke besmetting met Melophagus ovinus is niet uit te sluiten, maar gezien de levenscyclus van deze ectoparasiet niet waarschijnlijk.
Recente ervaringen uit de praktijk duiden er eveneens op dat bij hoge uitzondering sterke horizontale verspreiding kan voorkomen. Het is vooralsnog niet duidelijk of slechte voeding of huisvesting (stress) hierbij een rol spelen.

Proef Induratieve mastitis *(in samenwerking met drs. E. J. v. d. Molen en drs. U. Vecht)*

In aansluiting op eerdere resultaten van een praktijkproef en een kleine infectieproef werd in 1981 een proef gestart om eventueel het bewijs te leveren dat een infectie met zwoegerziektevirus ook vrij typische, induratieve afwijkingen in de uier kan veroorzaken.

Twintig drachtige anderhalfjarige zwoegerziektevrije ooien werden in twee gescheiden groepjes onder gelijke omstandigheden op een bedrijf ondergebracht. Twaalf ooien werden experimenteel besmet en de resterende acht dienden als controle-dieren. Na 1, 1½ en 2½ jaar werden een aantal dieren geseceerd en inderdaad werden in de besmette groep in vergelijking met de controles de typische induratieve veranderingen aangetroffen. Hiermede wordt een nieuw element aan de door zwoegerziekte veroorzaakte schade toegevoegd in de vorm van niet optimale groei van de lammeren door verminderde melkgift.

Vergelijking schape- en geitelentivirussen

Recent werd bij de geit een virus ontdekt dat nauw verwant is aan zwoegerziektevirus. Het ziektebeeld bestaat uit een aantal componenten; chronische arthritis, encephalitis en in mindere mate interstitiele pneumonie en induratieve mastitis. De internationale naam voor deze aandoening is Caprine Arthritis Encephalitis (CAE). Met name in de V.S. wordt door onderzoekers aandacht aan deze infectie besteed. Uit de beschikbare informatie blijkt dat ook de epidemiologie veel op die van zwoegerziekte lijkt.
Er is tevens serologische kruisreactie, zodat met de bestaande techniek ook antistoffen tegen CAE kunnen worden aangetoond. Tot voor kort werd verondersteld dat zwoegerziekte ook bij de geit kan voorkomen, maar op grond van de huidige inzichten kan het dus ook CAE geweest zijn. Niettemin worden geiten in het kader van de georganiseerde zwoegerziektebestrijging indien ze op het schapenbedrijf voorkomen als schapen beschouwd en dus ook meegetest. Op deze bedrijven bleek dat ruim 10% van 212 op deze wijze geteste geiten antistoffen had. M.b.v. de eerder genoemde Western blot-techniek werd

van een paar sera aangetoond dat het om CAE-antistoffen gaat. Hieruit kan worden geconcludeerd dat CAE-virus ook in Nederland voorkomt.
Door samenwerking op dit gebied met verschillende buitenlandse onderzoekers is het CDI in het bezit gekomen van CAE-virusisolaten van verschillende continenten. Het is om wetenschappelijke en praktische redenen van belang te weten waar de verschillen en overeenkomsten tussen CAE- en zwoegerziektevirus liggen. De Western blot-techniek biedt hiertoe goede mogelijkheden. Vooraf moesten echter wel nog een aantal technische problemen worden opgelost, hetgeen relatief veel tijd in beslag heeft genomen. Hoewel dit onderzoek nog niet is afgerond is al vastgesteld dat de belangrijkste overeenkomst op het core-proteine ligt en het belangrijkste verschil op de beide kleinste eiwitten.

Het zwoegerziekteonderzoek wordt verricht door drs. D. J. Houwers en medewerkers.

Publicaties:

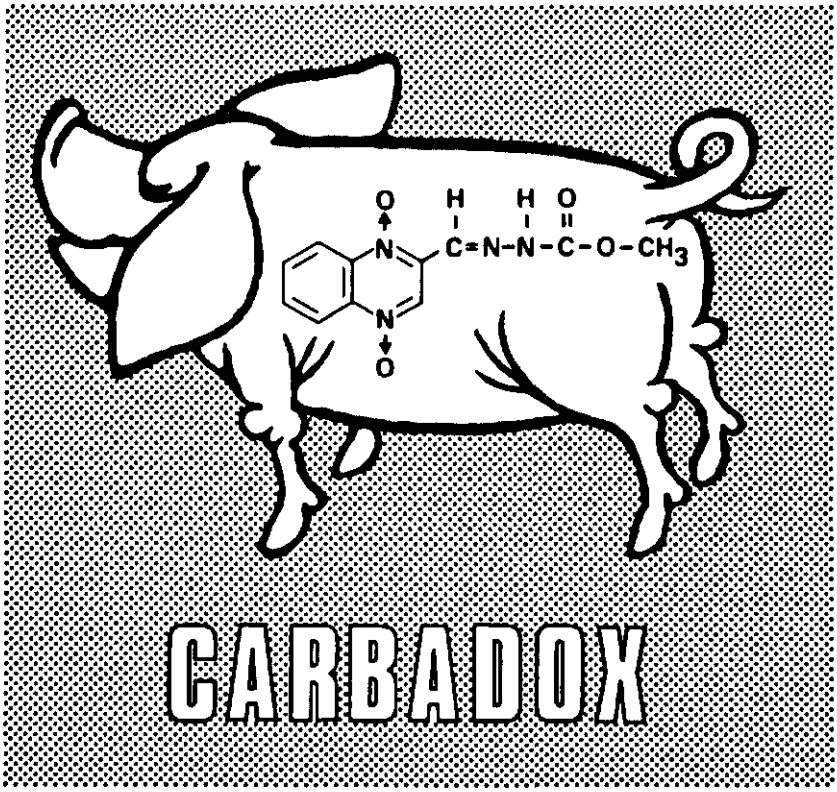
D. J. Houwers, A. L. J. Gielkens en J. Schaake Jr.
An indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies to maedi-visna virus.
Vet. Microbiol., 1982, 7, 209-219.

D. J. Houwers, C. D. W. König, G. F. de Boer en J. Schaake Jr.
Maedi-visna control in sheep.
I. Artificial rearing of colostrum deprived lambs.
Vet. Microbiol., 1983, 8, 179-185.

D. J. Houwers, J. Schaake Jr. en G. F. de Boer.
Maedi-visna control in sheep.
II. Half-yearly serological testing with culling of positive ewes and progeny.
Vet. Microbiol., 1984, 9, 445-451.

D. S. Adams, R. E. Oliver, E. Ameghino, J. C. DeMartini, D. W. Verwoerd, D. J. Houwers, S. Waghela, J. R. Gorham, B. Hyllseth, M. Dawson, F. J. Trigo en T. C. McGuire.
Global survey of serological evidence of caprine arthritis-encephalitis virus infection.
Vet. Rec., 1984, 115, 493-495.

W. Coackley, V. W. Smith en D. J. Houwers.
Preparation and evaluation of antigens used in serological tests for caprine syncytial retrovirus antibody in sheep and goat sera.
Vet. Microbiol., 1984, 9, 591-598.


CARBADOX

Carbadox: een toegift

Binnen de E.E.G. is carbadox toegelaten als veevoederadditief (tot 50 ppm) in de groep: groeibevorderende stoffen (samen met het structuurverwante olaquindox en het tot de nitrofuranen behorende nitrovin). Deze groep veevoederadditieven onderscheidt zich van de groep 'antimicrobiële stoffen' doordat het groeibevorderende effect niet uitsluitend wordt toegeschreven aan een antibacteriële werking. Het farmaceutische bedrijf, dat carbadox ontwikkeld heeft (Pfizer), en dat ook de gegevens heeft verstrekt waarop de E.E.G.-toelating berust, claimt een groeibevorderend effect. Een werkingsmechanisme kan niet worden aangegeven, maar het groeibevorderende effect zou niet of slechts in beperkte mate worden versterkt door de antimicrobiële werking van carbadox. Daarnaast wordt in de aanprijzing van dit middel gewezen op de prophylactische werking van carbadox, met name ter voorkoming van dysenterie Doyle *(Treponema hyodysenteriae;* ook wel genoemd varkensdysenterie of vibrio-dysenterie). Met nadruk wordt door dit farmaceutische bedrijf geen therapeutische werking tegen dysenterie Doyle geclaimd. Carbadox wordt door meerdere chemische industrieën geproduceerd, waardoor het een goedkoop geneesmiddel (een'loco') is geworden, dat veel wordt gebruikt als veevoederadditief. De in ons land dominerende marktpositie van 'loco-carbadox' gaat gepaard met twee andere verschijnselen:

- de farmaceutische formulering van loco-carbadox is meestal slecht. Bij de verwerking in voeder wordt het zeer fijne carbadox-poeder verspreid over de gehele apparatuur waardoor de gewenste gehaltes vaak niet gehaald worden en er een aanzienlijke overdracht is naar andere voeders. Daarbij komt nog dat het droge carbadoxpoeder in zeer fijn verdeelde toestand licht ontbrandbaar is en dat daardoor stofwolken met carbadox zeer explosief zijn.
- het gebruik van loco-carbadox is uitgebreid met een veterinaire toepassing, nl. de behandeling van diarree (in de meest uitgebreide zin van het woord) met een dosering van 100 ppm. Vaak wordt deze dosering toegevoegd aan voeder dat al 50 ppm carbadox als veevoederadditief bevat.

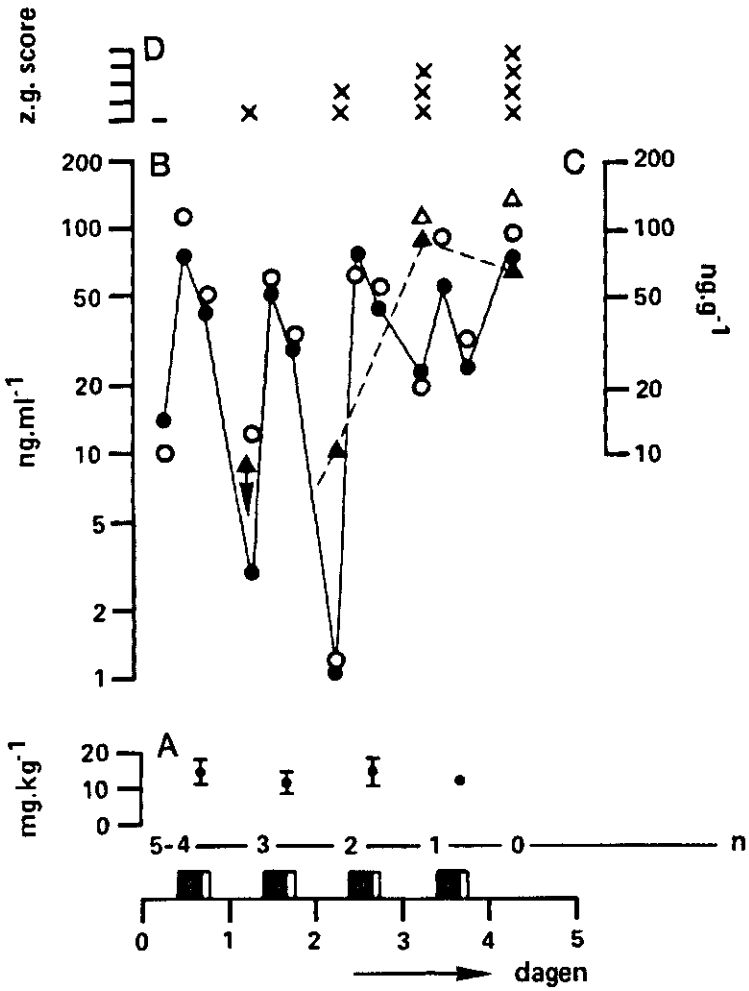
Sinds de introductie van carbadox in het begin van de zeventiger jaren vallen er achteraf twee dingen op, nl. (1) dysenterie Doyle is een afnemend veterinair probleem en (2) vooral tegen het eind van de zeventiger jaren werden er steeds vaker intoxicaties gemeld waarbij carbadox betrokken leek te zijn. De reductie van klinisch manifeste dysenterie Doyle wordt misschien geïllustreerd door het feit dat we er ook in 1984 niet in zijn geslaagd veldisolaten van *T. hyodysenteriae* te verkrijgen.
Al met al is carbadox nu zo ingeburgerd, dat de overgrote meerderheid van de ruim 17 miljoen varkens die jaarlijks (1983) in ons land worden gefokt, carba-

dox wordt toegediend, als additief, als therapeuticum of als verontreiniging in biggevoeder. Toen dan ook in 1981 door het CDI een proef werd uitgevoerd waarin Specol® werd vergeleken met een 'normale' prophylaxe, werd daarvoor carbadox gekozen. Dit Specol® experiment werd aangegrepen om een verkennend onderzoek naar het farmacon carbadox uit te voeren. Sindsdien heeft zich een informele 'carbadox-groep' gevormd binnen het CDI, om de vaak verrassende vondsten in verdere experimenten te bevestigen en nader te analyseren.

De resultaten die in de afgelopen 4 jaar zijn verzameld vormen de basis van de hierna volgende farmacotherapeutische evaluatie van carbadox, waarbij het doeldier – de pasgespeende big tot een leeftijd van 4 maanden – centraal staat.

Antimicrobiële werking

Carbadox heeft *in vitro* een antibacteriële werking op een groot aantal organismen. Het werkingsmechanisme, bij *E. coli* inhibitie van de DNA synthese, is ook niet specifiek, in de zin dat een 'typisch bacterieel proces' wordt verstoord. De *in vitro* werkzaamheid tegen Gram-negatieve bacteriën wordt gekenmerkt door Minimaal Remmende Concentraties (MRC) varierend van 1 tot 25 $\mu g.ml^{-1}$, terwijl bij Gram-positieve MRC-waarden dicht om 25 $\mu g.ml^{-1}$ zijn gemeten. Al met al is de antimicrobiële activiteit als middelmatig te karakteriseren. Er zijn echter enkele gunstige uitzonderingen op deze kwalificatie. Zo zijn er MRC-waarden gerapporteerd tegen *T. hyodysenteriae* van 0,04 tot 2 $\mu g.ml^{-1}$, en variëren de MRC-waarden tegen anaeroob gekweekte enteropathogene *Salmonella* soorten en *E. coli* stammen van 0,5 tot 1,5 $\mu g.ml^{-1}$.
Op grond van deze *in vitro* gegevens mag verondersteld worden dat carbadox in principe een goed bruikbaar antibacterieel middel zou kunnen zijn. Andere eigenschappen van de stof bepalen echter of deze mogelijke toepassing tot uitdrukking kan komen. Carbadox is in hoge mate onoplosbaar in water en in de meeste organische oplosmiddelen. Voor de bestrijding van pathogene kiemen is dus voedermedicatie de meest voor de hand liggende toedieningswijze. Carbadox wordt betrekkelijk snel opgenomen, het is bij wijze van spreken al direct na de eerste hap in het bloed aantoonbaar. Het wordt echter ook snel geëlimineerd uit het bloed (afbraak & uitscheiding), zie ook figuur 1. De voor de bestrijding van systemische infecties noodzakelijke bloedspiegels worden daarom niet gehaald. Het onderzoek naar de toepassingsmogelijkheden van carbadox is dan ook vooral gericht geweest op de bestrijding van enteropathogene infecties. Bij toediening aan biggen via het voeder van 100 en 150 ppm carbadox blijkt er in het voorste deel van het maagdarmkanaal een snelle afname van het carbadoxgehalte in de spijsbrij tot 5 ppm in het orale deel van het jejunum op te treden. In het caecum was met de toen ge-



Figuur 1. Verkennend onderzoek naar de farmacologische kenmerken van carbadox bij een 10-voudige overdosering (500 ppm).

Voor de aanvang van dit experiment waren de 5 varkens (Nederlands Landvarken × Great Yorkshire, 6 maanden oud) reeds twee weken gewend aan het voerderregime, aangegeven op de x-as, nl. slobber ad libitum van 9.00-16.00 uur (zwart blok) gevolgd door 1½ uur water via drinknippels (wit blok). De dieren waren individueel gehuisvest, en iedere dag werd er één dier geseceerd. Met N wordt het aantal nog levende dieren aangegeven.

In deelgrafiek A is weergegeven de hoeveelheid carbadox opgenomen door de dieren (m ± SEM).

Deelgrafiek B geeft het verloop van het gemiddelde van de plasmaspiegels carbadox (●) en desoxycarbadox (○, een metaboliet). Opvallend is het zaagtandkarakter van dit verloop, een weerspiegeling van zowel de snelle opname als de snelle eliminatie van carbodax.

In deelgrafiek C is het verloop van de concentraties in de lever weergegeven (detectielimiet hoger dan voor bloed) voor carbadox (▲) en desoxycarbadox (△).

In deelgrafiek D is een semikwantitatieve histologische score weergegeven van de mate van vacuolisatie of de hydropische veranderingen in de cellen van de zona glomerulosa van de bijnier (zg. score). De score na dag 1 is nog binnen de spreiding van de normaalwaarden hoewel de histologische beelden al afwijken van die van het controledier, maar na dag 2 zijn de afwijkingen onmiskenbaar abnormaal.

bruikte analysemethode (detectielimiet 0,5 ppm) geen carbadox meer aantoonbaar. Extrapolatie van deze farmacokinetische gegevens naar de inhoud van het colon maakt het zeer onwaarschijnlijk dat daar een antimicrobieel werkzame concentratie aanwezig is. Toediening van 50 ppm carbadox in het voeder gedurende enkele weken leidt tot gemiddelde bloedspiegels van 0,03 $\mu g.ml^{-1}$.
Uitgaande van de vuistregel dat voor een effectieve therapie concentraties van enkele malen de MRC moeten worden bereikt is het duidelijk dat alleen in het eerste deel van het maagdarmkanaal effectieve concentraties worden aangetroffen. Een goede prophylactische werking van carbadox is daarom te verwachten, een therapeutische werking, zelf tegen *T. hyodysenteriae,* lijkt echter uitgesloten. Treponema's, die in de mucosa-cellen van het colon zijn binnengedrongen, krijgen waarschijnlijk noch van de kant van het lumen, noch vanuit de bloedbaan een bactericide concentratie.

Voor het ingeburgerde therapeutische gebruik van carbadox bij diarree in een dosering van 100-150 ppm kan de volgende 'verklaring' worden gegeven.
De PD_{50} van carbadox tegen Gram-negatieve organismen is 5 tot 50 ppm, terwijl die tegen Gram-positieve omstreeks 100 ppm is. Nu is een PD_{50} de prophylactische dosering waarbij 50% van de dieren wordt beschermd in een challenge-experiment. De vertaling van een PD_{50} als een therapeutische dosering, waarmee reeds geïnfecteerde dieren worden behandeld, moet als een misvatting worden bestempeld.

Groeibevorderende werking

In twee zeer verschillende experimenten hebben we getracht een groeibevorderend effect van carbadox bij biggen te meten. Noch met betrekking tot de parameter groei per dag, noch met de parameter voederconversie was er een verschil tussen de controle groepen (0 ppm) en de behandelde groepen (25 en 50 ppm). De 0 ppm voeders waren verontreinigd met carbadox (1-2 ppm), het lijkt echter niet waarschijnlijk dat deze vrijwel onontkoombare verontreiniging van het voeder een groeibevorderend effect heeft, vergelijkbaar met dat van 25 of 50 ppm. Het feit dat de dieren onder experimentele condities werden gehouden en gezond waren, tenminste M.D.-kwalificatie, zou een verklaring kunnen zijn. Echter, er bestaat veel literatuur over de groeibevorderende werking van carbadox, daarin wordt naast een 'infectiedruk-afhankelijke' groeibevordering ook een groeibevorderend effect beschreven, dat niet gebaseerd lijkt te zijn op de antibacteriële werking van carbadox. Met name de rapporten betreffende SPF-varkens bevatten geen gegevens waarop een eenvoudige verklaring kan worden gebaseerd waarom wij niets hebben gezien van de 20% hogere groei en 10% betere voederconversie door carbadox, die door anderen is beschreven. Het lijkt echter de moeite waard om een experimen-

tele opzet te zoeken, waarin een echt groeibevorderend effect van carbadox kan worden aangetoond. Dit om de hypothese te toetsen dat het groeibevorderende effect een uiting is van een werkingsmechanisme, dat ook bij intoxicaties een rol speelt.

Toxische werking

Een opvallend kenmerk van de toxische werking van carbadox zijn de snel optredende en selectieve veranderingen in de bijnierschors (zie foto op de omslag en figuur 1). De histologische waargenomen degeneratieve veranderingen in de zona glomerulosa na een 'therapeutische' dosering gedurende enkele weken zijn tot nu toe nog voor geen enkel ander geneesmiddel beschreven. Deze zijn waarschijnlijk specifiek voor de chemische groep waartoe carbadox behoort; het structuur verwante olaquindox is aangetroffen in varkensvoeders, waarbij het histologische beeld van een carbadox-intoxicatie was beschreven. De potentiëring van de toxische effecten, die optreedt bij combinaties van nitrofuranen met carbadox, zou erop kunnen wijzen dat ook de groep van de nitrofuranen een soortgelijk toxisch effect op de bijnier kan hebben.

Een nadere studie is voorgenomen naar de wijze waarop veranderingen in de zona glomerulosa door carbadox worden veroorzaakt. Een voorspelbaar gevolg van een degeneratie, nl. daling van de aldosteronspiegel in het bloed, kon experimenteel worden bevestigd. Bij doseringen van 100 ppm en hoger gedurende 5 weken daalt de aldosteronspiegel tot 1/10 van de normale waarde. In logische samenhang met de daling van de aldosteronspiegel werd een daling van het natriumgehalte en stijging van het kaliumgehalte in het plasma waargenomen. De klinische symptomen van een carbadox-intoxicatie, t.w. zeer droge mest ('schapekeutels'), urine drinken, pica verschijnselen, uitdrogingsverschijnselen, lusteloosheid en geïrriteerdheid tezamen met groeivertraging, zo niet -stilstand, zijn in overeenstemming met een verstoorde bijnierfunctie. Al met al werd in dit onderzoek de effectiviteit van de gebruikte hoge doseringen carbadox bij diarree onderbouwd, maar het is tevens duidelijk dat het middel erger is dan de kwaal.
Een andere toxische eigenschap van carbadox is een mutagene werking in bacteriën en een genotoxische werking in zoogdieren. Deze beide werkingen treden op, in concentraties/doseringen die weinig hoger zijn dan in de praktijk gebruikte. Het lijkt waarschijnlijk dat de mutagene werking van carbadox de antibacteriële werking versterkt, in die zin dat er weinig verkregen resistentie tegen carbadox is waargenomen. Bovendien zijn er aanwijzingen dat de verkregen R-plasmid resistentie tegen andere antimicrobiële farmaca onder invloed van carbadox afneemt. In het verlengde van de mutagene en genotoxische werking van carbadox ligt de carcinogene werking. Al deze effecten lij-

ken verband te houden met de antimicrobiële werking van carbadox. Oorzakelijk kunnen ze worden teruggevoerd tot een beïnvloeding van de DNA-synthese door carbadox. In hoeverre een interferentie van carbadox met de genetische informatie betrokken is bij het nogal specifieke effect op de bijnier valt nu nog niet te zeggen. De mutagene, genotoxische en carcinogene eigenschappen van carbadox zijn voor de toxicologische evaluatie voor het doeldier – het mestvarken – niet relevant. Opmerkelijk is wel dat deze 'oude' informatie niet geleid heeft tot voorschriften ter bescherming van de mens met betrekking tot verwerking van dit geneesmiddel in veevoeders.

Het verkennende CDI-onderzoek en het door anderen gepubliceerde onderzoek overziende, kan voorlopig geconcludeerd worden:
- als prophylactisch toegediend geneesmiddel is carbadox een waardevol middel bij de bestrijding van dysenterie Doyle, waarvoor niet onmiddellijk een vervangend middel kan worden aangegeven;
- het aan carbadox toegeschreven groeibevorderende effect, dat niet berust op een antimicrobiële werking, kon niet gereproduceerd worden maar zou wel eens een eerste, vroeg symptoom van een intoxicatie kunnen zijn;
- het therapeutische gebruik van carbadox bij diarree berust op een toxisch effect, waarvan het twijfelachtig is of het reversibel is;
- carbadox is een goede illustratie van het gegeven dat de meeste gebruikers van geneesmiddelen zich niet realiseren dat een letterlijke vertaling van het woord farmacon vergif is.

Een gevolg van dit uitgegroeide verkennende onderzoek is dat het CDI voornemens is het onderzoek te continueren in een formeel project. In dit project staan twee vragen centraal: werkingsmechanisme en structuur activiteitsrelaties. Enerzijds onderzoek gericht op de specifieke en selectieve bijniertoxiciteit van carbadox: zijn er in de regulatie van de aldosteron-productie specifieke processen waarin carbadox 'past' of wordt carbadox om fysisch-chemische redenen geaccumuleerd in de bijnier. Anderzijds de vraag of andere, met name structuurverwante stoffen ook deze bijniertoxiciteit bezitten.

Dr. L. P. Jager, mede namens: drs. E. J. van der Molen, drs. M. J. A. Nabuurs, G. J. de Graaf, ir. Th. J. Spierenburg, dr. A. J. Baars, drs. F. G. van Zijderveld.

Publicaties vanuit de carbadox groep:

G. J. de Graaf en Th. J. Spierenburg, Liquid chromatographic determination of carbadox and desoxycarbadox in medicated feed and in procine gastro-intestinal tract, J. Assoc. Off. Anal. Chem. (in press).
E. J. van der Molen, M. J. A. Nabuurs en L. P. Jager, Pathological and clinical changes related to toxicity of carbadox in weaned pigs, Zentralblatt. Vet. Med. (accepted).

Rapportage op het 3e E.A.V.P.T. congres, Gent, aug. 1985:

A porcine pharmacology of carbadox, L. P. Jager, E. J. van der Molen, G. J. de Graaf, Th. J. Spierenburg, M. J. A. Nabuurs en A. J. Baars.
Levels of carbadox in porcine blood and gastro-intestinal contents after in-feed administration, Th. J. Spierenburg, G. J. de Graaf en L. P. Jager.
Clinical and pathological changes related to toxicity of carbadox in weaned pigs, E. J. van der Molen en M. J. A. Nabuurs.
Carbadox-induced changes in aldosterone and ion levels in the blood of weaned pigs, E. J. van der Molen, G. J. de Graaf en A. J. Baars.
High-pressure liquid chromatographic assay for carbadox and desoxycarbadox in medicated feeds and in contents of the porcine gastro-intestinal tract, G. J. de Graaf en Th. J. Spierenburg.
Sensitive analysis of carbadox and desoxycarbadox in plasma and whole blood samples of pigs by direct electrochemical methods, W. J. van Oort en K. R. Kooistra.

Rapportage op de bijeenkomst 'Scheidingsmethoden en Farmaceutische en Biomedische analyse', van de K.N.C.V., Amsterdam, maart 1985:

Determination of carbadox and desoxycarbadox in medicated feeds and in contents of the porcine gastro-intestinal tract by HPLC, Th. J. Spierenburg en G. J. de Graaf.

Rapportage op het Colloquium Spectroscopium Internationale XXIV, Garmisch-Partenkirchen, sept. 1985:

Carbadox-induced changes in aldosterone and ion levels in the blood of weaned pigs, E. J. van der Molen, Th. J. Spierenburg, G. J. de Graaf en A. J. Baars.

Monoclonale antilichamen: een nieuwe generatie immunologische reagentia

Inleiding

Infectieziekten vormen een belangrijke bedreiging voor de gezondheid van landbouwhuisdieren en beïnvloeden derhalve in negatieve zin een succesvolle bedrijfsvoering en een gunstige exportpositie van de Nederlandse veehouderij. Het onderzoek aan infectieziekten richt zich op de besturing van de etiologie, epizoötiologie, de pathogenese van de ziekte en de daarbij optredende immuunresponse, en richt zich uiteindelijk op de ontwikkeling van bestrijdingsmethoden en controle van de ziekte. Immunologische technieken spelen bij dit onderzoek een belangrijke en soms essentiële rol. De basis voor deze technieken wordt veelal gevormd door de beschikbaarheid van specifieke antisera tegen ziekteverwekkers en tegen verschillende componenten van het immuunsysteem (immunoglobuline-klassen en lymfocytensubpopulaties). Deze sera worden meestal verkregen van (experimenteel) besmette dieren en door immunisatie met min of meer gezuiverde antigenen. Deze polyclonale antisera bestaan uit heterogene populaties van antistoffen die gericht zijn tegen verschillende antigene determinanten. Zij vertonen een grote batch tot batch variatie, zijn in beperkte mate beschikbaar en soms onvoldoende specifiek (zelfs na absorptie). Een betrouwbare vergelijking van onderzoekresultaten van verschillende laboratoria, gebaseerd op het gebruik van verschillende antisera, is vaak moeilijk of onmogelijk.
In 1975 werd door Köhler en Milstein, de Nobelprijswinnaars geneeskunde 1984, een techniek beschreven om onbeperkte hoeveelheden identieke antilichamen te produceren van constante kwaliteit, grote specificiteit en hoge titer. Deze zogenaamde monoclonale antilichamen (MCA's) worden (in vitro en in vivo) geproduceerd door hybridecellen die ontstaan zijn door de samensmelting van een B-lymfocyt (die slechts antilichamen van één bepaalde specificiteit produceert) en een myelomacel (die onbeperkt gekweekt kan worden). Deze cellen en de gevormde antilichamen zijn tot nu toe meestal van muize-origine.
De toepassing van MCA's heeft verschillende medisch-biologische onderzoekgebieden de afgelopen jaren in een stroomversnelling gebracht. Ook het diergeneeskundig onderzoek heeft van de ontwikkeling van de hybridomatechnologie geprofiteerd, maar tal van toepassingen liggen nog in het verschiet. Voor het diergeneeskundig onderzoek aan infectieziekten betreft dit de volgende gebieden:

1. Onderzoek aan de structuur en de biologische eigenschappen van microorganismen en hun bouwstenen.
2. Diagnostiek, differentiaal diagnose en epizoötiologie.

3. Vaccinontwikkeling, produktie en kwaliteitscontrole.
4. Passieve immunisatie.
5. Onderzoek aan bouw en functie van het immuunsysteem van landbouwhuisdieren, gezelschapsdieren en vissen.

Organisatie en faciliteiten

De hybridomatechniek werd begin 1982 door de Afdeling Virologie ter hand genomen. Aanvankelijk waren de werkzaamheden gecentraliseerd in één laboratorium, maar ze zijn thans ten gevolge van de toenemende behoefte aan MCA's verspreid over drie verschillende laboratoria, waaronder één in de Open Sectie Virologie van het Hoofdgebouw. De produktie van MCA's, die erg arbeidsintensief is en een goede motivatie vergt, vindt plaats door direct in de betreffende MCA's geïnteresseerde medewerkers in samenwerking met en onder begeleiding van enkele specialisten.
Na de verhuizing van de Rotterdamse afdelingen naar Lelystad kon ook in de nieuwe behuizing door de afdeling Immunologie een hybridomalaboratorium ten behoeve van het Hoofdgebouw in gebruik genomen worden. Hier hebben enkele medewerkers de taak MCA's ook voor andere geïnteresseerde onderzoekers te produceren.
Het instituut beschikt thans over voldoende technische faciliteiten om de toepassing van MCA's tot volle bloei te brengen. De vereiste mankracht blijkt echter de beperkende factor. Desondanks zijn inmiddels een groot aantal waardevolle MCA's bereid tegen diverse virussen, bacteriën en immunoglobulineklassen en gedetailleerd gekarakteriseerd (tabel 1). Hun eigenschappen en toepassingen worden hieronder kort beschreven.

Mond- en klauwzeervirus (MKZV)

MCA's tegen MKZV type A en O werden gebruikt om de virusstructuur te bestuderen en met name om de antigene determinanten, verantwoordelijk voor de inductie van neutraliserende beschermende antilichamen, te identificeren. Op grond van de verkregen resultaten kan geconcludeerd worden dat de belangrijkste neutraliserende determinant van intact MKZV ontbreekt op subvirale deeltjes en geïsoleerd VP_1 (het oppervlakte eiwit van MKZV). Op geïsoleerd VP_1 werd wel een neutraliserende determinant van secundaire betekenis geïdentificeerd, die herkend werd door MCA's die zowel MKZV type A als O neutraliseren. Deze determinant werd m.b.v. een pepscan (zie synthetische peptiden vaccins) en MCA's gelokaliseerd in de aminozuren 200-210. De met geïsoleerd VP_1 opgewekte neutraliserende antilichamen bleken, in tegenstelling tot antilichamen tegen de belangrijkste neutraliserende determinant, slecht te correleren met bescherming. Derhalve lijkt 'natief' of 'recombinant' VP_1 door het ontbreken van de belangrijkste neutraliserende determi-

Tabel 1. *Monoclonale antistoffen CDI Lelystad.*

MCA-specificiteit		*Onderzoeker(s)*
MKZV	type O neutraliserend niet-neutraliserend	Meloen, Barteling
MKZV	type A neutraliserend niet-neutraliserend	Meloen, Barteling
VPV	Brescia neutraliserend	Wensvoort, Terpstra
IBV	D207 M, N, S_2 H120 D274 D212, S_1, S_2 D3896	Koch, De Boer
ALV	p 27, pp 19	De Boer, Osterhaus*
BLV	p 24	De Boer, Osterhaus*
ZZV	p 24, p 15, gp	Houwers
ADV	NIA-3 neutraliserend niet-neutraliserend	Van Oirschot
E. coli	K99, F41, K88	Van Zijderveld
runder Ig-klassen	IgG, IgG_1, IgG_2 IgM, IgA, L-chain	Van Zaane
varkens Ig-klassen	IgG, IgG_1, IgG_2 IgM, IgA, L-chain	Van Zaane
Kippe Ig-klassen	IgA, IgG	Koch

* RIVM, Bilthoven.

nant geen geschikte kandidaat voor een alternatief MKZ-vaccin. Een ELISA m.b.v. MCA's voor diagnostische doeleinden is in voorbereiding.

Varkenspestvirus (VPV)

In het kader van de varkenspestbestrijding wordt de diagnose gesteld m.b.v. een immunofluorescentietechniek die geen onderscheid maakt tussen veldvirus, vaccinvirus (C-virus) en het antigeen verwante bovine virus diarree virus (BVDV), waartegen 15-20% van de Nederlandse slachtzeugen antilichamen bezit. Postnatale BVDV-infecties bij varkens verlopen altijd subklinisch, infecties van drachtige zeugen leiden soms tot een congenitale infectie, waarbij de betreffende biggen kunnen sterven. De differentiaal diagnose vereist een tijdrovende neutralisatietest of dierproeven en is niet in overeenstemming met de noodzaak tot snelle destructie van met VPV besmette varkensstapels.

Met behulp van twee MCA's is het mogelijk gebleken varkenspestvirussen direct te typeren in sectiemateriaal van verdachte dieren. Slecht één van beide MCA's reageert met C-virus, terwijl geen van beide reageert met BVDV. De meeste VPV stammen worden door één of beide MCA's herkend, slechts enkele VPV stammen door géén van beide (zie figuur 1, 2 en 3). Door deze mogelijkheid tot typering is er nog slechts een geringe noodzaak tot het uitvoeren van het traditionele tijdrovende differentiaal diagnostisch onderzoek.
Een twaalftal nieuwe MCA's wordt nog onderzocht op de bruikbaarheid om tot een 100% zekere diagnose te komen. Tevens wordt onderzocht of t.b.v. een serologische differentiaal diagnostiek antilichamen tegen VPV en BVDV te onderscheiden zijn in een ELISA met specifieke MCA's.

Infectieuze Bronchitis virus (IBV)

Het voorkomen van verschillende IBV variantstammen wordt verantwoordelijk gesteld voor de onvoldoende bescherming, die de gebruikelijke vaccins op basis van IBV-H120 bieden. Daar de differentiatie van variantstammen met de gebruikelijke laboratoriumtechnieken nogal moeizaam verliep, werd de bereiding van MCA's tegen verschillende IB-stammen ter hand genomen. Van de MCA's tegen verschillende IBV eiwitten (M, N en S_2) bleken die tegen S_2 in vitro neutraliserende activiteit te bezitten. Met deze MCA's kon een aantal Nederlandse IBV isolaten in drie groepen onderverdeeld worden. Na bereiding van MCA's tegen S_1 zal onderzocht worden of een verdere differentiatie van IBV stammen mogelijk is. Tevens zal de rol van neutraliserende determinanten van S_1 en S_2 in vivo bestudeerd worden.

Aviair Leukose virus (ALV)

Het bestrijdingsprogramma van lymfoïde leukose bij de kip is gebaseerd op de detectie van moederdieren die ALV congenitaal overdragen. Hiertoe worden eiwit-monsters in een ELISA getest op de aanwezigheid van het groepsspecifieke p27 antigeen van ALV. Toepassing op grote schaal van deze test bleek niet mogelijk vanwege problemen bij de productie van antisera van voldoende kwaliteit. Dit probleem werd opgelost door de bereiding van vijf MCA's tegen de structurele ALV eiwitten p27 en pp19*. Met behulp van twee MCA's gericht tegen verschillende epitopen van p27 werd een zeer gevoelige en specifieke double antibody sandwich (DAS) ELISA uitgewerkt, waardoor de detectie van p27 aanzienlijk werd verbeterd. Vanwege de storende aanwezigheid van een lage concentratie p27 van endogene origine in het testmateriaal werd echter voor de toepassing in de praktijk een minder gevoelige MCA combinatie gekozen. Door de onbeperkte beschikbaarheid van gestan-

* Deze MCA's werden geproduceerd in een samenwerkingsverband met Dr. A. D. M. E. Osterhaus van het RIVM te Bilthoven.

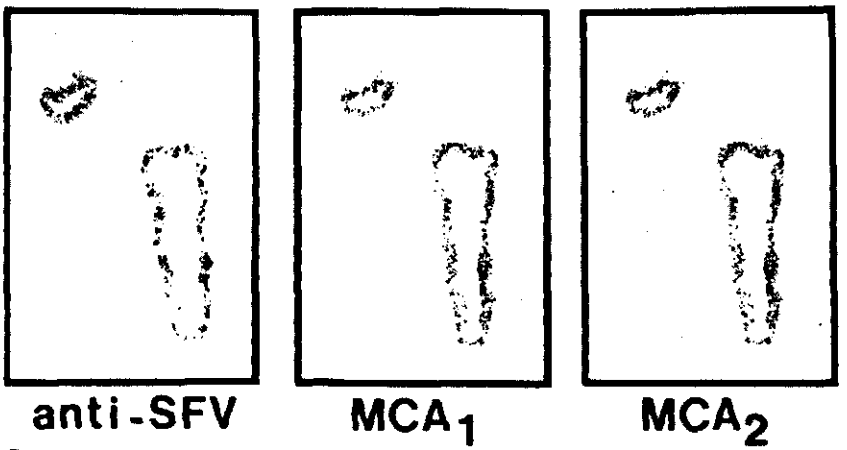


Fig. 1: + + + —— definitief VPV

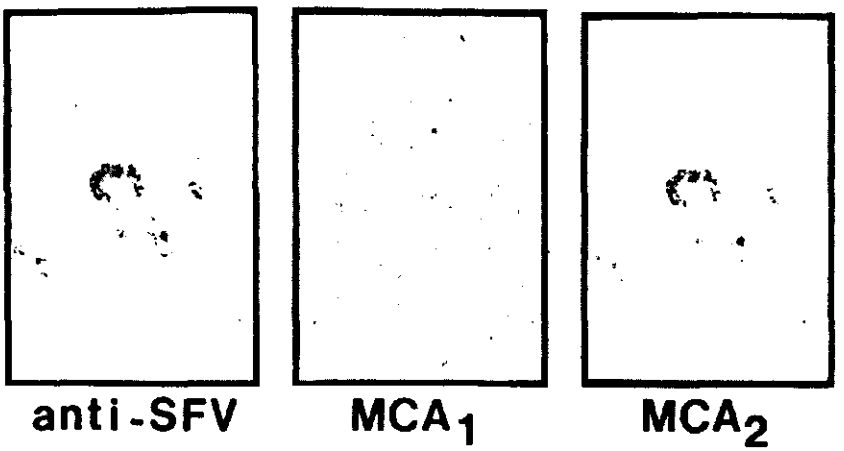


Fig. 2: + – + —— waarschijnlijk C-virus

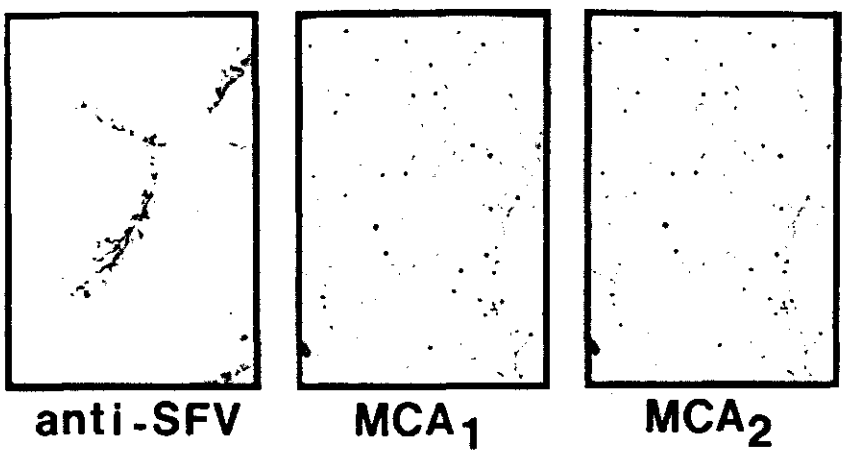


Fig. 3: + – – —— waarschijnlijk BVDV.

Typering van togavirussen in sectiemateriaal van varkens verdacht van varkenspest met een hyperimmuun serum tegen VPV (anti-SFV) en twee MCA's tegen VPV.

daardiseerde reagentia voor deze test is een grootschalig bestrijdingsprogramma van lymfoïde leukose mogelijk geworden.

Enzoötische Runderleukose virus (BLV)

Enzoötische runderleukose komt in Nederland sporadisch voor en betrof in 1984 slechts enkele geïmporteerde dieren. De diverse Gezondheidsdiensten voor Dieren voeren een screeningsprogramma uit m.b.v. de agar gel precipitatie techniek op serummonsters. Vervanging van deze test door een ELISA zou de screening efficiënter doen verlopen, maar de tot dusver beschikbare ELISA systemen waren nauwelijks gevoeliger en vertoonden veel aspecifieke reacties. De bereiding van MCA's gericht tegen structurele BLV-eiwitten werd ter hand genomen*, ten einde de testprocedures te verbeteren en eventueel ook toepasbaar te maken voor onderzoek van individuele melkmonsters.

Zwoegerziekte virus (ZZV)

Bij de bestrijding van zwoegerziekte bij schapen neemt Nederland internationaal gezien een vooraanstaande plaats in. De bestrijding is gebaseerd op de opsporing en verwijdering van seropositieve, en dus besmette, dieren uit een kudde. Hiertoe worden serummonsters halfjaarlijks in een ELISA op aanwezigheid van antilichamen onderzocht. Vals-positieve en vals-negatieve uitslagen hebben grote consequenties voor de betrouwbaarheid en het welslagen van het zwoegerziekte-bestrijdingsprogramma. Met behulp van MCA's tegen ZZV is een test ontwikkeld waarmee twijfelachtige uitslagen van de conventionele ELISA gecontroleerd kunnen worden. Deze nieuwe test, de CTB-ELISA, lijkt gevoeliger en zeer specifiek en wordt momenteel als enige confirmatietest gebruikt. De invoering van de CTB-ELISA als standaard screeningstest wordt overwogen. De beschikbare maar nog niet gekarakteriseerde MCA's tegen ZVV worden thans nader onderzocht en o.a. gebruikt bij een vergelijkende studie van schape- en geite lentivirinae-eiwitten en hun antigene determinanten.

Ziekte van Aujeszky virus (ADV)

Zeer onlangs werd een groot aantal MCA's tegen ADV bereid. Deze MCA's zullen toegepast worden bij de mogelijke differentiatie van ADV stammen, het micropathogenese onderzoek en bij de identificatie en lokalisatie van ADV-genen in het kader van o.a. de bereiding van goed gekarakteriseerde levende vaccins via recombinant DNA technologie.

Escherichia coli aanhechtingsfactoren

Enteropathogene E. coli stammen dragen fimbriën die verantwoordelijk zijn

voor de aanhechting van de bacteriën aan de darmwand. Dit is noodzakelijk voor hun kolonisatie. Mede door de uitscheiding van toxinen is een aantal van deze stammen verantwoordelijk voor het ontstaan van diarree. De enteropathogene E. coli stammen kunnen o.a. onderscheiden worden door verschillen in antigene kermerken van de fimbria-eiwitten (o.a. K99, F41, K88, P987). Hiervoor wordt vaak een agglutinatietest gebruikt met specifieke antisera of een ELISA gebaseerd op antisera opgewekt tegen gezuiverde fimbria eiwitten.

Door de produktie van agglutinerende MCA's tegen K99, F41 en K88 zijn thans zeer specifieke antilichamen in onbeperkte hoeveelheden en hoge titer beschikbaar voor het onderzoek aan enteropathogene E. coli stammen en de ontwikkeling van alternatieve detectie technieken.

Runder- en varkens immunoglobuline(Ig)klassen

Bij de bestudering van o.a. het mucosale immuunsysteem, dat gekenmerkt wordt door de uitscheiding van IgA als belangrijkste Ig-klasse, zijn reagentia die onderscheid maken tussen verschillende Ig-klassen (IgM, IgD, IgG, IgA en IgE) van essentieel belang. Daarnaast kunnen IgM-specifieke reagentia aangewend worden voor een vroege diagnose van een acute infectie d.m.v. de detectie van IgM-antilichamen tegen het oorzakelijke agens. Omdat conventionele antisera vaak onvoldoende specifiek bleken in gevoelige tests zoals ELISA's werden MCA's bereid tegen runder- en varkens Ig-klassen en gedetailleerd gekarakteriseerd. Thans beschikken we over meerdere MCA's tegen zowel runder, als varkens IgG, IgG_1, IgG_2, IgM en IgA. Ten behoeve van het onderzoek aan het mucosale immuunsysteem werden deze MCA's met succes toegepast in verschillende technieken zoals klassespecifieke ELISA's voor de detectie en kwantificering van runder- en varkens Ig-klassen en antilichamen tegen rotavirus, de zuivering van Ig-klassen d.m.v. affiniteitschromatografie en de detectie van plasmacellen in weefselcoupes.

Kippe immunoglobuline-klassen

De bereiding van hybride cellijnen die MCA's produceren gericht tegen de diverse immunoglobuline klassen van de kip werd onlangs gestart. In de eerste plaats werden een aantal MCA's bereid, die gericht zijn tegen IgA, en welke zullen worden aangewend voor de bestudering van het mucosale immuunsysteem van de kip. Dit onderzoek sluit aan bij de projecten welke worden bewerkt door de afdeling aviaire tumorvirussen.

Slotopmerkingen

Naast de door het instituut bereide MCA's worden ook commercieel verkregen MCA's gebruikt zoals bijvoorbeeld voor de diagnostiek van chlamydia in-

fecties bij het rund m.b.v. een immunofluorescentie test op weefselcoupes. Het is de bedoeling op korte termijn de reeds beschikbare panels MCA's uit te breiden met MCA's tegen bovine respiratory syncytial virus, BVDV, diverse VPV stammen en virussen die een rol spelen bij bigge diarree. Het instituut bezit daarnaast een goede positie om door uitwisseling met andere laboratoria voor ons interessante MCA's te verkrijgen. Het zal duidelijk zijn dat MCA's een belangrijke en vaak essentiële rol spelen in het diergeneeskundig onderzoek en dit in grote mate vooruit zullen helpen.

Personalia

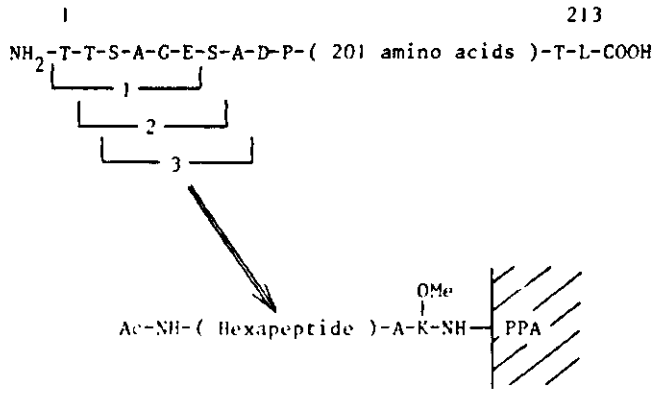
De produktie en toepassing van de diverse MCA's is het resultaat van samenwerking tussen enkele 'hybridoma technologen' (Dr. D. van Zaane, Dr. R. M. S Wirahadiredja, Dr. G. Koch en hun medewerkers J. IJzerman, J. Anakotta en L. Hartog) en de directe gebruikers (zie tabel 1):
Dr. R. Meloen en Drs. S. J. Barteling (MKZV), Drs. G. Wensvoort en Dr. C. Terpstra (VPV), Dr. G. Koch en Dr. G. F. de Boer (IBV), Dr. G. F. de Boer en Dr. A. D. M. E. Osterhaus (RIVM, Bilthoven) (ALV en BLV), Drs. D. Houwers (ZZV), Drs. J. Th. van Oirschot (ADV), Drs. F. van Zijderveld (E. coli), Dr. D. van Zaane (runder- en varkens Ig-klassen), Dr. G. Koch (kippe Ig-klassen). De steun en inbreng van hun medewerkers bleek hierbij onontbeerlijk.

Synthetische peptiden vaccins

Hoewel tegen veel virussen en bacteriën werkzame en veilig vaccins geproduceerd kunnen worden, zijn er ook waartegen dit niet mogelijk of heel moeilijk is. Met name bij vaccins tegen sommige virusziekten treden nog wel eens problemen op ten gevolge van onvolledige inactivatie of terugmutatie naar het virulente agens. Om deze redenen is men al vroeg gaan zoeken naar vaccins op basis van geïsoleerde virale eiwitten. In de meeste gevallen bleek deze aanpak onbevredigend, omdat men altijd van een grote hoeveelheid goed immunogeen agens moet uitgaan om een kleine hoeveelheid minder immunogeen eiwit te kunnen produceren. Bij de opkomst van de DNA-recombinant technieken leek dit probleem opgelost: er zou net zoveel van het benodigde eiwit gemaakt kunnen worden als nodig was. Echter spoedig bleek dat deze producten dikwijls niet de juiste conformatie bezitten en daarom niet goed werken. Door het recombinant DNA werk kwamen echter wel veel sequenties van eiwitten beschikbaar. Op grond hiervan proberen verschillende onderzoeksgroepen te voorspellen welke (korte) aminozuursequenties (peptiden) bruikbaar zouden kunnen zijn in vaccins. Deze prognoses worden bijv. gedaan op grond van hydrofiliciteitswaarden van de aminozuren en/of voorspellingen van de secundaire structuur, gepaard aan een tamelijk willekeurig splitsen van het gegeven eiwit en testen van de onderdelen in dieren.

Tot op heden heeft deze weinig selectieve benadering geen enkel bevredigend vaccin opgeleverd. Het enige peptide waarvan aangetoond werd dat het een redelijke immuun-respons produceerde is een gedeelte van het virusproteine (VP_1) van Mond- en Klauwzeer (MKZ) virus. Dit peptide werd echter op geheel andere gronden geselecteerd. De boven beschreven benadering geldt bovendien alleen voor continue epitopen d.w.z. epitopen waarvan de samenstellende aminozuren naast elkaar op het eiwit voorkomen. Veel epitopen zijn waarschijnlijk discontinu, de aminozuren waaruit ze zijn opgebouwd liggen niet naast elkaar op de eiwitstreng. Ze worden door een ruimtelijke schikking bij elkaar gebracht. Om deze laatste soort epitopen op te sporen is de hierboven beschreven benadering natuurlijk ongeschikt en moet uitgegaan worden van de driedimensionale structuur van het eiwit dat meestal niet bekend is.
Hoewel dit drie jaar geleden nog niet allemaal zo duidelijk was leek zo'n niet-systematishe aanpak zijn nadelen te hebben. Op dat moment werden wij bezocht door Dr. M. H. Geysen van de Commonwealth Serum Laboratories (Melbourne). Samen met hem hebben wij toen een idee ontwikkeld om dit probleem wel systematisch aan te pakken. Dit leidde na een jaar werken tot de methode die nu aangeduid wordt als PEPSCAN.

Hierbij worden alle overlappende peptiden van een gegeven sequentie gesynthetiseerd volgens onderstaand schema en wordt hun reactiviteit met speciale antilichamen vervolgens getest in een ELISA.



Opsplitsing van het eiwit (in dit geval VP_1 van MKZ) in hexapeptiden die aan een vaste drager (PPA) worden gesynthetiseerd.

Vrijwel onmiddellijk waren we in staat met deze methode, waarop inmiddels patent is aangevraagd, een hexapeptide op te sporen dat mogelijk de harde kern vormt van het eerder genoemde 20 aminozuur lange MKZ peptide. Verder waren we in staat om van dit peptide te bepalen welke aminozuren noodzakelijk zijn en welke niet. Ten slotte werd het ook al meteen duidelijk dat veel epitopen uitsluitend op deze wijze gevonden konden worden, omdat een kleine verschuiving van de sequentie over het genoom met één aminozuur, de activiteit te niet doet.
In samenwerking met de groep onder leiding van Geysen in Melbourne zijn inmiddels meer dan 20.000 peptiden gesynthetiseerd en getest. De resultaten hebben geleid tot een aantal nieuwe inzichten zowel op fundamenteel als op meer toegepast moleculair immunologisch gebied.

Op het meer fundamentele vlak bleek de veronderstelling dat epitopen voornamelijk uit hydrofiele aminozuren zouden bestaan niet juist te zijn. Valine bijvoorbeeld, een zeer hydrofoob aminozuur, komt relatief veel voor in antilichaambindende peptiden, terwijl het hydrofiele lysine of arginine juist minder voorkomt. Dit leidde tot de veronderstelling dat het oppervlak gevonden met behulp van röntgenanalyse wel eens een ander zou kunnen zijn dan dat 'gezien' door een antilichaam. Verder blijkt dat de aminozuren van peptiden die reageren met monoclonale antilichamen ingedeeld kunnen worden in drie groepen: 1) onvervangbare, 2) gedeeltelijk vervangbare en 3) geheel vervangbare. De regels hiervoor proberen we op het ogenblik vast te stellen; ze kun-

nen mogelijk iets te maken hebben met de secundaire structuur in situ en/of bindingsenergie van de antilichaam-epitoop reactie.
Wanneer intact virus wordt ingespoten bij een dier blijkt een scala van paratopen tegen elke epitoop te worden opgewekt (paratopen zijn de structuren op antilichamen die gericht zijn tegen epitopen). Wordt een peptide corresponderend met een bepaald epitoop ingespoten dan ontstaat er een reeks paratopen die groter is dan na toediening van het virus, maar die kleiner is dan op grond van statistische overwegingen verwacht kon worden. Verder blijkt het paratopenspectrum gedurende een response te veranderen terwijl ook de manier van koppelen van peptide aan drager het specturm kan beinvloeden. Het lijkt er dus op dat met onze methoden het paratopenspectrum in detail geanalyseerd kan worden. Dit opent de mogelijkheid om het op een rationele manier te manipuleren, wat noodzakelijk is om ooit tot goede peptide vaccins te komen.
Direct inzicht verschafte de vinding dat het epitoop op geisoleerd VP_1 van MKZ-virus of op VP_1 verkregen met DNA-recombinant technieken op een atypische plaats ligt. Dit verklaart het ongewone gedrag van dit geisoleerde eiwit wanneer het vergeleken wordt met VP_1 in situ. Het onderbouwt de waarneming dat neutraliserende activiteit opgewekt met VP_1 veel minder goed correleert met bescherming dan wanneer dezelfde activiteit wordt opgewekt met intact virus.

Bij analyse van een groot aantal PEPSCAN patronen werd het duidelijk dat er geen enkel verband is tussen secundaire structuurvoorspellingen, hydrofiliciteitsprofielen en reactieve peptiden. Bovendien suggereert het feit dat sommige reactieve peptiden bij verlenging of verkorting hun activiteit verliezen, dat PEPSCAN waarschijnlijk de enige manier is om inzicht te krijgen in de continue epitopen die liggen op een gegeven eiwitsequentie.
Verdere toepassingen zullen zich ongetwijfeld nog aandienen. Zo moet het bijv. mogelijk zijn om met behulp van de in dit kader ontwikkelde technieken antilichamen te detecteren tegen agentia, waar wel de aminozuursequenties van bekend zijn, maar die niet of nauwelijks te kweken of te isoleren zijn.
Onverwacht was de grote belangstelling van diverse zijden voor onze mogelijkheid om op efficiente wijze anti-peptide sera te produceren tegen korte peptiden (o.a. als hulpmiddel bij DNA-recombinant werk).

Tot zover heeft het onderzoek uitsluitend te maken gehad met continue epitopen. Verleidelijk is om in dit verband te speculeren over de mogelijkheid uitgaande van een monoclonaal antilichaam de bijbehorende (continue of discontinue) epitoop op te sporen, of iets te construeren dat er op lijkt. Als dit mogelijk is zou dat een omwenteling betekenen niet alleen bij ziektepreventie, maar ook op het gebied van diagnostiek en therapie. Hoewel het nog te vroeg

is om hierover uitspraken te doen lijkt het erop dat er misschien mogelijkheden zijn.

Aan dit project werken mee:
Drs. S. J. Barteling, J. Boerke, H. Lankhof, J. Meier, Dr. R. H. Meloen (projectleider), Drs. W. P. A. Posthumus, W. C. Puyk, Ir. W. M. M. Schaaper en R. J. Woortmeyer.

Toepassing van recombinant DNA technieken bij de ontwikkeling van levende herpesvirus vaccins: constructie en biologische eigenschappen van deletiemutanten van Aujeszky's disease virus.

Inleiding

De ziekte van Aujeszky (Aujeszky's disease: AD) is een acute en vaak dodelijke aandoening van landbouwhuisdieren en in het wild levende dieren, die wordt veroorzaakt door een herpesvirus (H. suis). De ziekte heeft een wereldwijde verspreiding en is economisch van grote betekenis. De natuurlijke gastheer van het virus is het varken. De infectie komt langs respiratoire weg tot stand. De primaire vermenigvuldiging van het virus vindt plaats in het slijmvlies van het neuskeelgebied en vervolgens verspreidt het virus zich via de zenuwbanen naar de hersenen. Na de reproductieve fase kan het virus in met name het zenuwweefsel latent aanwezig blijven.
Om de economische gevolgen van sterfte en groeivertraging bij varkens te beperken worden vaccinaties uitgevoerd. Hiervoor zijn levende en geïnactiveerde AD virus-vaccins beschikbaar.
De conventionale methoden voor de bereiding van levende virus-vaccins zijn attenuering via passage van virulent of mild-virulent virus in heterologe celsystemen of chemische mutatie. Door voortgezette passage van AD-virus in bebroede kippeëieren en heterologe weefselkweekcellen worden waarschijnlijk mutanten geselecteerd. De uitgeoefende selectiedruk is moeilijk controleerbaar en het resultaat van een combinatie van een aantal factoren, variërend van de 'multiplicity of infection' (aantal infecterende virusdeeltjes per cel) tot de frequentie waarmee veranderingen in de genetische informatie worden geïntroduceerd.

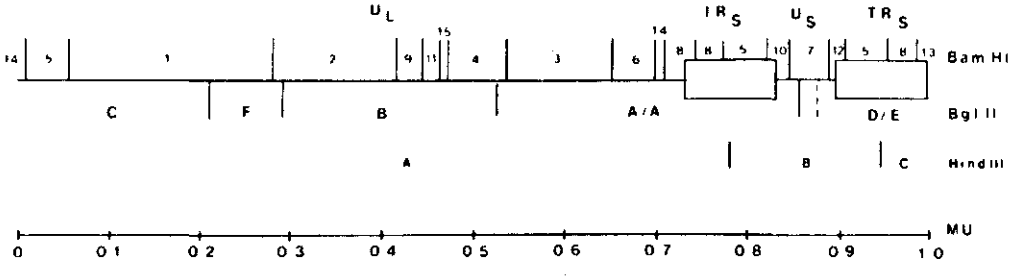
Hoewel het moeilijk zal zijn de genetische basis van attenuering te ontrafelen, kunnen een aantal belangrijke wijzigingen die het virale DNA tijdens dit proces ondergaat zichtbaar worden gemaakt. Uit eigen onderzoek van het DNA van een aantal AD virus-vaccins blijkt dat:

1. de vaccins genetisch niet homogeen zijn, d.w.z. vaccin-preparaten bevatten een kleiner of groter aantal verschillende virus-varianten;
2. de genetische informatie van vaccinstammen belangrijke wijzigingen heeft ondergaan. In vergelijking met wild-type virus missen de vaccinvirussen genetische informatie, soms in een aantal gebieden van het virale DNA, en heeft er tevens een beperkte herrangschikking van genetische informatie plaatsgevonden.

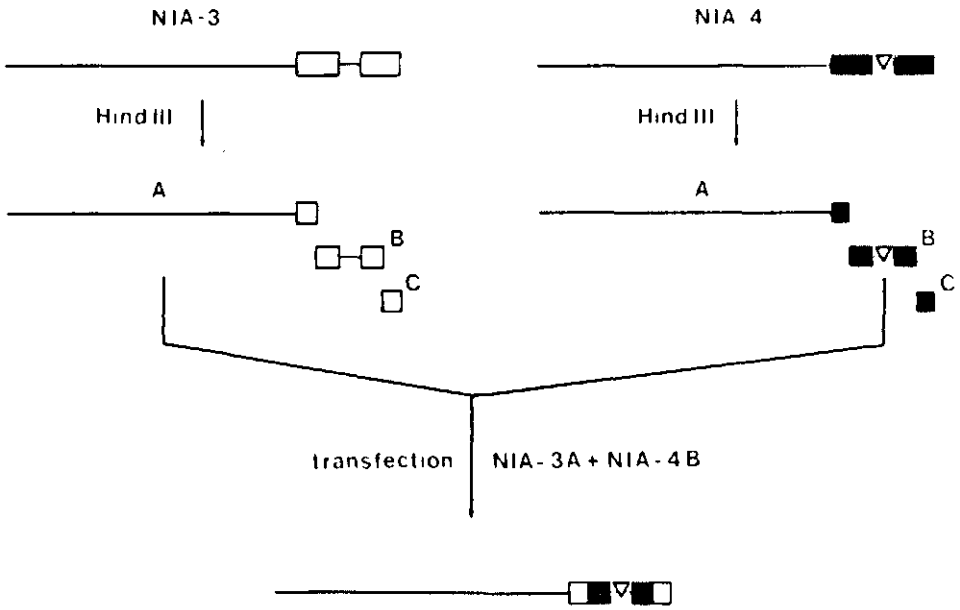
Naast genoemde goed aantoonbare veranderingen is te verwachten dat ook op sequentie(base-volgorde)-niveau wijzigingen in het vaccin-virus DNA zijn

geïntroduceerd (o.a. puntmutaties). Het is dus zeer wel mogelijk dat, via de conventionele technieken voor het verkrijgen van levende AD-vaccins, niet alleen genen geïnactiveerd worden die van belang zijn voor virulentie, maar ook genen die mede bepalend zijn voor het immunogeen vermogen.
Om deze redenen en omdat de huidige AD virus-vaccins voor verbetering vatbaar zijn, zijn we gestart met de ontwikkeling van een nieuwe generatie levende vaccins.
Daartoe worden, gebruikmakend van recombinant DNA technieken, deleties aangebracht in bepaalde gebieden van het DNA-genoom afkomstig van een virulente AD-virusstam.
Het onderzoek richt zich met name op de inactivering van genen welke van belang zijn voor virulentie en latentie.
Inactivering van genen door deletie zou belangrijke voordelen kunnen hebben ten opzichte van de conventionele benadering, omdat (1) op meerdere plaatsen deleties kunnen worden geïntroduceerd, zodat reversie naar virulentie vrijwel onmogelijk wordt; (2) introductie van deleties met recombinant DNA technieken zeer gericht kan geschieden en (3) genen die essentieel zijn voor het immunogeen vermogen van het vaccin-virus zoveel mogelijk kunnen worden ontzien.

Het AD-virus genoom is een dubbelstrengig DNA-molecuul van ongeveer 150 kilobaseparen (kbp), dat door geïnverteerde repeat-sequenties (R_S; herhaalde base-volgorden) is verdeeld in een lang en een kort uniek gebied (U_L en U_S resp.) (Figuur 1.).



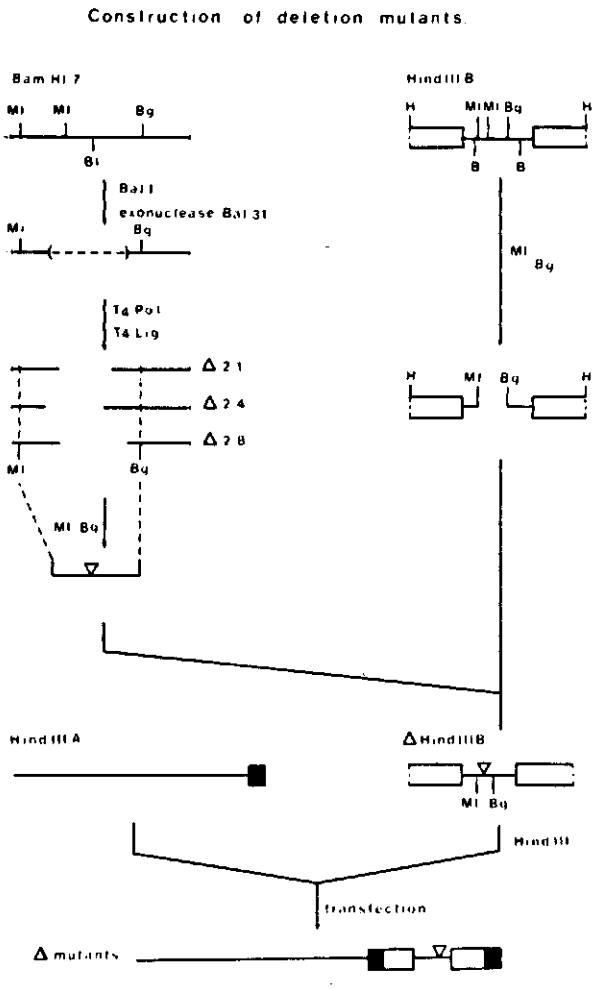
Figuur 1.
Restrictie-endonuclease kaart van de virulente AD-virusstam NIA-3. Fragmenten worden aangeduid met letters of cijfers, waarbij in numerieke volgorde wordt bepaald door de fragmentlengte.
Het virale DNA is opgebouwd uit een kort en een lang uniek gedeelte, U_S en U_L, resp.; U_S wordt begrensd door base-volgorden, aangeduid met terminal en internal repeat sequence (TR_Sen IR_S, open rechthoeken), die in spiegelbeeld liggen en complementair zijn. M.U.: afkorting van map units.



Figuur 2.
Constructie van hybride AD-virussen opgebouwd uit subgenoomfragmenten afkomstig van de virulente stam NIA-3 en de avirulente stam NIA-4.
Het constructieschema wordt in de tekst nader toegelicht.

Constructie van hybridevirus

Om inzicht te verkrijgen in de structuur van het genoom van AD-virus vaccinstammen en veldisolaten, werden de virale DNA's vergeleken met behulp van restrictie-enzym mapping. Restrictie-enzymen herkennen een bepaalde volgorde van basen in DNA. Bijvoorbeeld, het restrictie-enzym BamHI dat geïsoleerd is uit de bacterie *Bacillus amyloliquefaciens* H, herkent de volgorde GGATCC. Binnen een DNA-molecuul kan het enzym deze volgorde opsporen en vervolgens op die plaats de keten doorknippen. Uit dit vergelijkend onderzoek bleek dat de meeste vaccins een deletie van variabele grootte bevatten in het U_S gebied. Of het verlies van genetisch materiaal in U_S van vaccin-virus DNA correleert met sterk gereduceerde virulentie is op elegante wijze vast te stellen door een deletie te introduceren in het U_S gebied van een virulente stam. Het intacte ADV genoom (150 kbp) is echter moeilijk toegankelijk voor genetische manipulatie. Daarom werd gebruik gemaakt van subgenoomfragmenten. Het volgende experiment illustreert (1) dat na transfectie (infectie van een cel met geïsoleerd DNA of RNA van een virus) in gevoelige cellen van een beperkt aantal subgenoomfragmenten, reconstitutie van viraal DNA mogelijk is, en (2) dat genetische informatie uit het U_S gebied van belang is voor de virulentie.
DNA van de virulente stam NIA-3 en de avirulente stam NIA-4, met een deletie



Figuur 3.
Constructie van deletiemutanten. De toelichting op het schema is opgenomen in de tekst. ter vereenvoudiging van de presentatie zijn de circulaire vectormoleculen, plasmiden, die de virale inserts BamHI 7 en HindIII B bevatten in een lineaire vorm getekend.
Van het vector DNA is slechts het aan de virale inserts grenzende deel weergegeven, aangeduid door een golvende lijn. Afkortingen van restrictie-endonucleases: B, BamHI; H, HindIII; ML, MluI; Bg, BglII; BI, BalI. △ 2.1, △ 2.4 en △2.8, aanduidingen voor plasmiden met een deletie van respectievelijk 2.1, 2.4 en 2.8 kbp in het virale insert BamHI 7.

in U_S, werd geïsoleerd en vervolgens geknipt met het restrictie-enzym HindIII (Figuur 1 en 2). Digestieprodukten zijn de HindIII fragmenten A, B en C. Aangezien de terminale sequentie HindIII C in omgekeerde oriëntatie aanwezig is in het HindIII fragment A, bevatten de HindIII fragmenten A en B de totale genetische informatie van het virus. Het HindIII fragment A van NIA-3 werd tezamen met het HindIII fragment B van NIA-3 of NIA-4 getransfecteerd in ge-

voelige cellen. De NIA-3/NIA-4 transfectie leverde een hybride virus (NIA-3A-4B) op, dat de genetische karakteristieken bevat van de beide uitgangstammen. Het U_L segment en een deel van de interne en terminale repeat zijn afkomstig van de virulente stam NIA-3, terwijl U_S en de omringende repeat sequenties afkomstig zijn van de avirulente stam NIA-4.
Voorts bleek dat tijdens het reconstitutie-proces kleine deleties worden geïntroduceerd aan de fragmentuiteinden die in de cel 'verlijmd' worden.
Aansluitend werden de biologische eigenschappen van de ouder-stammen en de gereconstitueerde virussen NIA-3A-4B en NIA-3A-3B (opgebouwd uit de HindIII fragmenten A en B van NIA-3) vergeleken. Het virulentie onderzoek wees uit, dat het NIA-3A-4B hybride virus (deleties in beide repeats en U_S) avirulent was in 10 weken oude biggen. Dit moet met name worden toegeschreven aan de deletie in U_S, aangezien de virulentie van de reconstructie NIA-3A-3B (deleties in beide repeats) slechts een geringe vermindering had ondergaan.

Constructie van deletiemutanten

De biologische eigenschappen van het hybride virus tussen de virulente stam NIA-3 en de avirulente stam NIA-4 illustreren dat de genetische informatie in een deel van het U_S-gebied van NIA-3 DNA, in belangrijke mate de virulentie van dit virus bepaalt. Naar verwachting betreft dit de unieke sequenties gelegen in BamHI fragment 12 en in dat deel van BamHI 7 afgegrensd door de BglII restrictie-plaats (Figuur 1.). Hiermee is echter niet uitgesloten dat ook U_L en R_S genen bevatten die een rol spelen bij de virulentie.

Teneinde te bewijzen dat deleties in het rechterdeel van U_S geassocieerd zijn met gereduceerde virulentie, werden deletie-mutanten van de virulente stam NIA-3 geconstrueerd. Een vereenvoudigd constructieschema is weergegeven in Figuur 3. Het HindIII fragment B en het BamHI fragment 7, beide afkomstig van NIA-3 DNA, werden ingebouwd in een plasmide-vector en gecloneerd. Vervolgens werden deleties aangebracht in het BamHI 7 bevattende plasmide. Daartoe werd dit partieel geknipt met het enzym Bal I en werden DNA moleculen die enkelvoudig geknipt waren geïsoleerd. Vanaf de vrije uiteinden van deze moleculen werden basen verwijderd door digestie met het enzym Bal 31 (exonuclease).

Een op lengte geselecteerde populatie van deze DNA moleculen werd vervolgens behandeld met T4 polymerase en de vrije uiteinden werden met elkaar verbonden met T4 DNA ligase. Hierna werden de gedeleteerde plasmidemoleculen gecloneerd en werden plasmiden met een deletie van 2.2, 2.4 en 2.8 kbp in het ingebrachte virale DNA (virale insert) geselecteerd voor verdere manipulatie. De MluI-BglII fragmenten van deze plasmiden werden geïso-

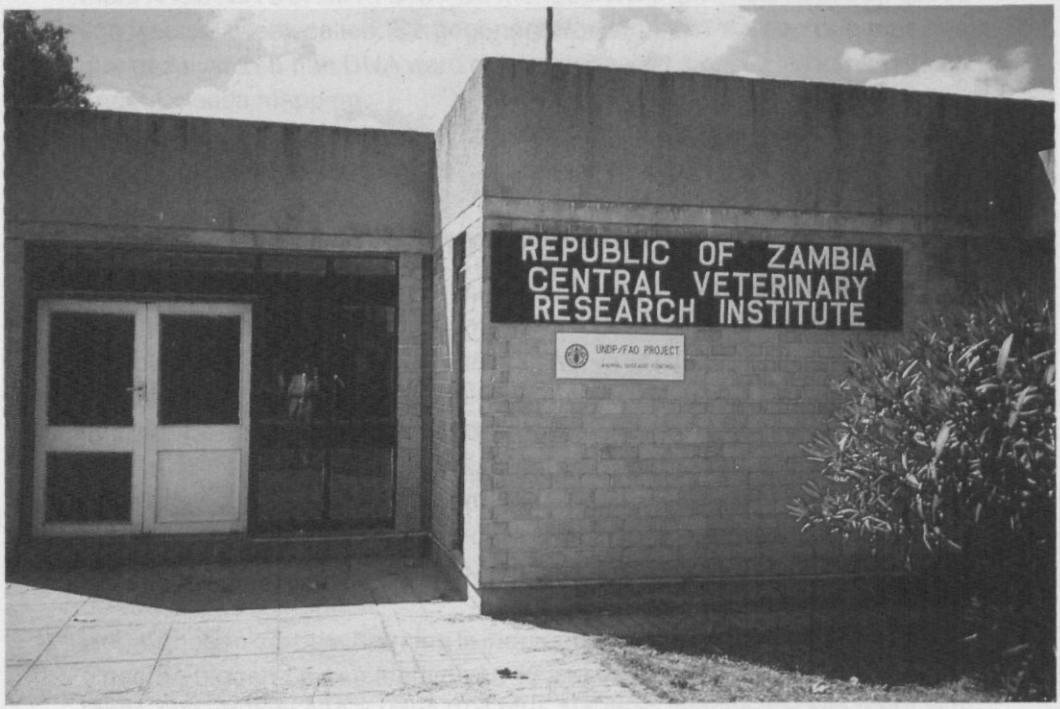
leerd en vervolgens teruggeplaatst in het gecloneerde HindIII fragment B, dat vooraf was behandeld met MluI-BglII.
Op deze wijze werden drie recombinant plasmiden verkregen die een deletie bevatten van respectievelijk 2.1, 2.4 en 2.8 kbp in de virale insert HindIII B.
De virale inserts werden geïsoleerd (HindIII) en gemengd met het HindIII fragment A van NIA-3 of NIA-4 DNA. Dit mengsel werd getransfecteerd op gevoelige weefselkweek-cellen. De gegenereerde virussen werden drie maal plaque gezuiverd en hun DNA werd gekarakteriseerd met behulp van restrictie-endonuclease mapping.
De resultaten bevestigden een correcte inbouw van de gedeleteerde fragmenten in de virale constructen.

Virulentie en beschermend vermogen van deletiemutanten

De virulentie van de deletiemutanten werd onderzocht in de natuurlijke gastheer het varken. Daartoe werden 10 weken oude biggen, vrij van antilichamen tegen AD-virus, intranasaal besmet met AD-virus (10^5 pfu). Onder deze condities, bleek de virulentie van de deletiemutanten sterk gereduceerd in vergelijking met de ouder virusstam NIA-3. Bijvoorbeeld, biggen geïnoculeerd met de mutant 2.4N3A hadden nauwelijks of geen temperatuurverhoging, geen groeivertraging en slechts een geringe vermindering in eetlust tussen dag 2 en 5 na inoculatie. Op grond van deze resultaten mogen we concluderen dat deleties in het U_S gebied van AD-virus resulteren in een sterke reductie van de virulentie voor biggen.
Het vermogen om bescherming te induceren werd onderzocht door de gevaccineerde biggen op een leeftijd van 16 weken bloot te stellen aan een challenge met virulent NIA-3 virus (10^5 pfu). Na deze infectie werden geen klinische symptomen en geen groeivertraging waargenomen. De gemiddelde lichaamstemperatuur van de biggen gevaccineerd met 2.4N3A en 2.8N3A bleef onder 40°C.
Opmerkelijk was dat ook de excretie van virulent virus na challenge aanzienlijk lager was dan in de controles, hetgeen voor de eliminatie van veldvirus circulatie van essentieel belang is.

De beschreven eigenschappen van de NIA-3 deletiemutanten indiceren dat het mogelijk moet zijn goed gedefinieerde levende AD virus-vaccins te bereiden, die voldoende immunogeen zijn om een goede bescherming te bieden tegen een veldvirus infectie.

Dit onderzoek wordt verricht door:
A. L. J. Gielkens[1]), J. T. van Oirschot [1]), J. Briaire[1]), W. Quint[1]) en A. J. M. Berns[2]).
[1]) CDI, Afdeling Virologie.
[2]) Universiteit Nijmegen, Afdeling Biochemie.



Het CVRI - Zambia

Project animal vaccine production unit, Lusaka, Zambia

Sedert december 1983 begeleidt het CDI de realisatie van een laboratorium voor de bereiding van veterinaire vaccins in Zambia. Het laboratorium wordt opgezet met financiële steun van het Europees Ontwikkelingsfonds van de EEG en het zal gaan funktioneren binnen de struktuur van het Department of Veterinary and Tse-tse Control Services van het Ministry of Agriculture and Water Development. Het laboratorium zal worden gebouwd op een terrein naast het Central Veterinary Research Institute, dat gevestigd is te Balmoral, op een afstand van ongeveer 25 km van de hoofdstad Lusaka. Intensieve samenwerking tussen beide laboratoria is daarmede gewaarborgd.

Volgens het projectvoorstel zal het laboratorium per jaar gaan produceren:

Vaccin tegen Anthrax	500.000 doses
Vaccin tegen Boutvuur	500.000 doses
Vaccin tegen Hemorrhagische septicemie	500.000 doses
Vaccin tegen Mycoplasma mycoides	200.000 doses
Vaccin tegen Brucellose	300.000 doses
Vaccin tegen Rabies	150.000 doses
Vaccin tegen Newcastle Disease	3.000.000 doses

De belangrijkste reden voor Zambia om de productie van deze vaccins in eigen hand te nemen is dat het goedkoper is om locaal te produceren dan om overeenkomstige hoeveelheden te importeren. In principe zal het laboratorium de jaarlijkse behoefte van Zambia aan vaccins tegen de belangrijkste inheemse dierziekten kunnen dekken wanneer bovengenoemde productie wordt gerealiseerd.
Op beperkte schaal vindt reeds een aantal jaren in Zambia productie van veterinaire vaccins plaats. Deze activiteiten werden gesubsidieerd door de Nederlandse Overheid. Daarbij moet men zich realiseren dat Zambia voor Nederland een zogenaamd concentratie-land is en dat een intensieve samenwerking plaatsvindt op het gebied van de verbetering van de dierlijke productie met name in de Western Province. Beschikbaarheid van vaccins tegen inheemse dierziekten speelt daarin een belangrijke rol.

Het project omvat in principe de constructie van een aantal gebouwen voor vaccinproductie, kwaliteitscontrole en ondersteunende diensten, alsmede een aantal proefdierstallen. Het project voorziet ook in de aankoop en installatie van laboratorium-apparatuur voor productie en controle-activiteiten, alsmede de aanschaf van grondstoffen en andere noodzakelijke materialen.
Na het starten van het productieproces zal in een periode van 4 jaar de bijdrage van de EEG in de lopende kosten geleidelijk verminderen. In totaal

heeft de EEG een bedrag van 2 miljoen europese rekeneenheden als lening tegen lage rente ter beschikking gesteld. Daarnaast is een schenking van 1 miljoen europese rekeneenheden beschikbaar ten behoeve van technische ondersteuning die ondermeer zal omvatten: bouwkundige-, werktuigbouwkundige- en procestechnische expertise gedurende de bouwfase, begeleiding van het productieproces bij het opstarten en gedurende de eerste jaren daarna. De technische ondersteuning ligt in handen van het CDI.

De activiteiten in 1984 waren er voornamelijk op gericht het project op papier te concretiseren. In de eerste plaats moesten gedetailleerde bouwtekeningen worden gemaakt op basis van een programma van eisen dat reeds beschikbaar was. Het maken van bouwkundige tekeningen en het ontwerpen van de noodzakelijke technische installaties, alsmede de gehele procedure van de aanbesteding is een taak van de Rijksgebouwendienst van de Overheid in Zambia.
De ontwerpen werden door het CDI bestudeerd en vervolgens in detail besproken met functionarissen van de Rijksgebouwendienst te Lusaka. Er werden door het CDI gedetailleerde voorstellen gedaan ten aanzien van technische installaties ten behoeve van air-conditioning en steriele luchtvoorziening bij ent- en vulkamers, koel- en broedcellen, waterdruk. mest- en wateraf-voer bij de stallen, bouwkundige uitvoering van laboratoria enz.
Daarnaast werden concrete voorstellen gedaan voor het bereiken van een goede coördinatie van alle bij ontwerp en constructie betrokken disciplines; deze coördinatie is van belang met name gezien het specifieke karakter van een laboratorium. Het bleek dat juist op het punt van deze coördinatie door de bouwdeskundigen in Zambia problemen werden ondervonden. De verwachting is nu dat de bestekken voor de gebouwen en de installaties gereed zullen zijn in maart 1985. De bestekken zullen door het CDI worden gecontroleerd. Door de problemen die zich in deze fase van het werk hebben voorgedaan is een vertraging van ongeveer een jaar ontstaan.

In het afgelopen jaar werd door het CDI een gedetailleerde beschrijving van het toe te passen productieproces van de genoemde vaccins gemaakt. Op basis van de procesbeschrijving werden tevens lijsten gemaakt van benodigde grondstoffen en andere materialen die noodzakelijk zijn voor het functioneren van het laboratorium. Ten behoeve van de aanschaf van laboratoriumapparatuur, die zal verlopen via een internationale inschrijvingsprocedure volgens EEG-normen, werden door het CDI gedetailleerde beschrijvingen gemaakt van de noodzakelijke apparatuur en laboratoriuminrichting.

Wanneer de ontwerpen van de gebouwen en installaties gereed zullen zijn, zal het project in 'blauwdruk' geheel uitgewerkt zijn. Op dat moment zal het

mogelijk zijn een tamelijk nauwkeurige raming te maken van de kosten van het project. Het moet dan blijken of het project gerealiseerd kan worden in de vorm waarin het dan op tafel ligt voor het beschikbare bedrag.
Indien de kostenraming van het project aanzienlijk hoger zal uitvallen dan het bedrag dat beschikbaar is, zal een her-evaluatie onvermijdelijk zijn.

Noord-Zuid overleg

Het is te verwachten dat in 1985 het CDI ook gevraagd zal worden een raming te maken van de kosten die gemoeid zijn met het functioneren van het te bouwen laboratorium. Deze bedrijfseconomische analyse is onder meer van belang om inzicht te krijgen in de hoeveelheid vreemde valuta die nodig zal zijn om de productie op peil te houden. Immers, een aanzienlijk deel van de grondstoffen voor de vaccinproductie zal moeten worden geïmporteerd.

Wanneer het project onbelemmerd doorgang zal kunnen vinden is te verwachten dat het laboratorium in de eerste helft van 1987 operationeel zal kunnen zijn.

Het samenwerkingsproject met Zambia wordt van Nederlandse zijde begeleid door dr. F. van Vugt (CDI) en door ir. G. J. Kaper (architectenatelier Kaper en Brommer, Arnhem).

Publicaties

CONTENTS

	pag.
Diarrhoea in piglets around weaning	58
Neonatal diarrhoea in calves	59
Toxicological research on farm and environmental problems	61
Investigation of botulism	62
Anaerobic infections other than botulism	63
Atrophic rhinitis in pigs	64
Colibacillosis in piglets	66
Diagnosis, causes and control of mastitis in cattle	67
Manipulation of the humoral and cellular immune response	68
Systematic epidemiological investigations of helminths	72
Ascaris infections in cattle	73
Resistance to anthelmintics	74
Foot-and-mouth disease	75
Swine fever	79
Virus infections in cattle	82
Virus infections in sheep (other than Maedi/Visna)	84
Aujeszky's disease	85
Avian leukosis	97
Marek's disease	99
Local immunity	101
Maedi/Visna	104
Aleutian disease	108
Porcine parvovirus infections	109
Research on disinfectants for veterinary use	110
Diagnosis of diseases of cattle in the field	111
Diagnosis of diseases of pigs in the field	112
Diagnosis of diseases of other animals in the field	114
The development of laboratory techniques	115
Synthetic peptide vaccines	118
Other investigations	120
Other publications	124

Thermostable factor(s) in soyabean products stimulating small intestine secretion in the LGT-model

M. J. A. NABUURS[1])

Proceedings of the 8th International Pig Veterinary Society; Belgium, Ghent, 1984, p. 319

Several factors may be involved in the aetiology of diarrhoea in pigs. Enterotoxigenic strains of *E. coli* are among the most important infectious agents.
To examine strains of *E. coli* for enterotoxin production, the ligated gut test (LGT) has been developed. In this test the net secretion excess in a ligated gut segment of a young pig is measured after injection of an *E. coli* culture.
Because solid pig food has been associated with diarrhoea we decided to examine food components in the same manner as *E. coli* strains, i.e. by testing them in a LGT. Soyabean products are one of the major protein sources in pig food and were therefore tested first. Here we report some preliminary results.

Full text in English.

[1]) CDI - Department of Herd Health and Pathology.

NEONATAL DIARRHOEA IN CALVES
(PROJECT 03)

Epidemiological observations on cryptosporidiosis in dairy herds in the Netherlands

P. W. DE LEEUW[1]), A. MOERMAN[2]), J. M. A. POL[1]), F. P. TALMON[2]), and F. G. VAN ZIJDERVELD[3])

Proceedings 13th world Congress on disesase of cattle, Durban, Rep. of South Africa, September 1984, p. 104-109.

The epidemiology of *Cryptosporidium* infections was studied in 11 dairy herds, involving 375 calves, as part of a neonatal calf diarrhoea (NCD) survey. The organism was present in all herds, but it was not found continuously and in varying percentages of calves. No seasonal or other clear-cut pattern of oocyst shedding was found. The first oocyst shedding was observed on the fifth day of life, but the majority of calves started to excrete the organism on day 10 to 12.
Cryptosporidium closely followed rotaviruses on the list of agents associated with NCD in these herds. However, in one extensively studied herd the data suggested that *Cryptosporidium* was the major agent involved. The diarrhoea in this well managed herd of high hygienic standard was mild, but not insignificant, and occurred around the 12th day of life. Experimental infections of SPF calves of 4 weeks of age with the strain prevailing confirmed that it was capable of inducing diarrhoea.

Full text in English.

[1]) CDI-Department of Virology.
[2]) CDI-Department of Herd Health and Pathology
[3]) CDI-Department of Bacteriology

Laboratory experiments on oral vaccination of calves against rotavirus or coronavirus induced diarrhoea.

P. W. DE LEEUW[1]) and J. W. A. TIESSINK[1])

Zentrallblatt für Veterinärmedizin Reihe B, in press.

The efficacy of oral vaccination of calves with a modified live virus vaccine (Scourvax^{R}-2, Smith Kline) against rotavirus and/or coronavirus induced diarrhoea was examined under controlled conditions. Calves were vaccinated one hour after the first feeding. Challenge was done orally with a mixture of virulent bovine rotavirus and bovine coronavirus.
In the first experiments calves received colostrum free of antibodies against these viruses. Three control calves, challenged on the sixth day of life, developed severe diarrhoea after two to three days. Diarrhoea lasted for five to twelve days and on average the calves lost 12.5 per cent body weight. Rotavirus and coronavirus shedding was found in all three. In contrast, no diarrhoea was observed in two vaccinated calves challenged on day 6. After vaccination one shed rotavirus and one rotavirus plus coronavirus, but no virus excretion was found after the challenge.
Three other vaccinated calves, that were not held completely isolated, all developed diarrhoea within three days, i.e. before the experimental challenge was performed. In each calf the beginning of diarrhoea coincided with rotavirus and coronavirus excretion. These calves lost six to seven per cent body weight.
In further experiments calves were fed 'positive' colostrum (from a pool collected on a Dutch dairy farm) for two days. Antibody titres of this pool against rotavirus and bovine coronavirus were as expected for mixed first-day colostrum of dairy cows under the Dutch conditions. One out of three control calves, fed colostrum from this pool, developed severe diarrhoea after challenge on day 6; the others only passed somewhat loose or yellow faeces for a few days. The first calf shed both viruses, the last two either rotavirus or coronavirus. Weight losses were limited or did not occur. More severe diarrhoea was observed in six vaccinated calves, three of which were challenged on day 6 and three on day 8. None of these calves excreted rotavirus or coronavirus before the challenge. Two to four days after the challenge all six developed diarrhoea, the beginning of which coincided with the start of rotavirus excretion. In three calves coronavirus excretion was also found, but this started a few days later. The calves challenged on day 6 were less severely affected than those challenged on day 8; body weight losses averaged four and eight per cent, respectively.
These results show that effective oral vaccination of calves against rotavirus or bovine coronavirus induced diarrhoea may be blocked by specific antibodies present in colostrum and thereby confirm an earlier hypothesis based on observations in the field.

Full text in English.

[1]) CDI-Department of Virology.

TOXICOLOGICAL RESEARCH ON FARM AND ENVIRONMENTAL PROBLEMS
(PROJECT 12)

A case of chronic zinc poisoning in calves fed with zinc-contaminated roughage

G. H. WENTINK[1]), TH. J. SPIERENBURG[2]), G. J. DE GRAAF[2]) and A. C. A. VAN EXSEL[1])

Veterinary Quarterly, in press

A case of zinc intoxication in young female cattle is described. The clinical signs consisted of reduced appetite, emaciation, submandibular oedema and diarrhoea.
The source of zinc proved to be roughage harvested in the vicinity of a factory galvanizing steel tubes. In this roughage zinc levels between 3000 and 7300 mg/kg dry weight were found. In the liver of four animals zinc levels varied between 420 and 1600 mg/kg and between 910 and 1680 mg/kg dry weight in the kidneys.

Full text in English.

[1]) Animal Health Service in Noord-Brabant, Boxtel, the Netherlands.
[2]) CDI - Department of Analytical Chemistry and Toxicology.

INVESTIGATION OF BOTULISM
(PROJECT 15)

Epidemiology of waterfowl botulism in the Netherlands

J. HAAGSMA[1])

In: Avian botulism: An International Perspective, Section III: Epidemiology of Avian Botulism, in press

This paper describes the occurrence of avian botulism in the Netherlands, diagnosed for the first time in 1970 and since then recurring every year in the summer months. However, even in autumn and winter some cases are occurring. These cases are attributed to thermal water pollution or persistent botulinum toxin. Mortality is highest among duck with 70% of all victims.
Toxin type C-alpha was demonstrated in all laboratory confirmed cases, except a limited outbreak in June 1975 with toxin type E.
The areas where botulism has occurred are highly infected with *C. botulinum* type C, soil, mud and water as well as waterfowl, other birds, mammals, fish and various vertebrates. Decaying cadavers and maggots are considered to be the source of the botulinum toxin and the preventive measures are based hereupon.

Full text in English.

[1]) CDI - Department of Bacteriology.

Diarrhoea in one to three week-old piglets associated with *Clostridium perfringens* type A.

M. J. A. NABUURS[1]), J. HAAGSMA[2]), E. J. VAN DER MOLEN[1]), and PH. J. VAN DER HEIJDEN[3])

Annales de Recheches Vétérinaires 14; 1983, 408-411

Investigation on the aetiology of diarrhoea in piglets of one to three weeks of age revealed high numbers of *Clostridium perfringens* type A in intestinal contents of severely affected animals. Experimental infections with hysterectomy derived, colostrum deprived piglets performed in an isolator resulted in a clinical picture indistinguishable from the clinical signs observed under field conditions i.e. creamy diarrhoea, emaciation, abundant gas in the gut but usually low mortality rate. The predominant *post-mortem* findings were the presence of gas in the intestinal lumen and in the mucosa, superficial necrosis and villus atrophy.

Full text in English.

[1]) CDI - Department of Herd Health and Pathology.
[2]) CDI - Department of Bacteriology.
[3]) CDI - Department of Immunology.

Partial purification and characterization of a heat-labile dermonecrotic toxin from *Pasteurella multocida*

PH. J. VAN DER HEIJDEN[1]), C. D. M. VAN ES[1]), E. M. KAMP[2]) and J. W. PALS-VAN DAM[1])

In: Atrophic Rhinitis. CEC-report, Denmark: Copenhagen, 1983, p. 114-120 (EUR 8643)

A method is described for the isolation of a heat-labile dermonecrotic toxin (DNT) from culture filtrates of *Pasteurella multocida*. The method involves ammonium sulfate precipitation, gel filtration and ion exchange chromatography. Immunological methods showed that the final toxic material consists of at least three components. Trypsin treatment destroyed the toxicity, indicating that the DNT is of protein nature. The molecular weight was estimated between 80,000 and 110,000 and the isoelectric point about 5.

Full text in English.

[1]) CDI - Department of Immunology.
[2]) CDI - Department of Bacteriology.

Isolation and characterisation of a heat-labile dermonecrotic toxin from *Pasteurella multocida*

PH. J. VAN DER HEIJDEN[1]), E. M. KAMP[2]), J. W. PALS[1]) and G. J. TETENBURG[2])

Proceedings of the 8th International Pig Veterinary Society, Belgium. Ghent, 1984, p. 155

Rabbits and piglets, experimentally infected with dermonecrotic toxin (DNT)-producing *Pasteurella multocida* (Pm) strains have shown to develop severe turbinate atrophy. Furthermore, instillation of a cellfree supernatant of DNT-producing Pm strain results in AR like lesions. A cellfree supernatant of a non DNT-producing strain does not induce this kind of lesions. If DNT indeed proves to be the important factor in AR, screening of farms on the presence of DNT-producing Pm isolates may be needed. Since bacteriological methods are rather insensitive and only produce a temporary impression, a serological test, specific for DNT, would be prefered. The establishment of the role of DNT in the pathogenesis of AR and the development of a suitable serological test require purified DNT. In a previous study we attempted to purify DNT. The endproduct still appeared to be impure and the contaminations strongly interfered with serological tests.
The aim of this study was to purify the DNT further.

Full text in English.

[1]) CDI - Department of Immunology.
[2]) CDI - Department of Bacteriology.

The ELISA as a diagnostic tool for the detection of enterotoxigenic strains of *E. coli* (ETEC) in pig faeces

F. G. VAN ZIJDERVELD[1]), M. J. A. NABUURS[2]), L. P. HAM[1]),
A. M. VAN ZIJDERVELD[1]) and R. M. S. WIRAHADIREDJA[3])

Proceedings of the 8th International Pig Veterinary Society, Belgium: Ghent, 1984, p. 80.

The diagnosis of ETEC induced diarrhoea in new-born piglets should be based on the detection of both the presence of adhesins and enterotoxins. However, for reasons of convenience and based on the assumption that adhesin-carrying *E. coli* strains also produce enterotoxins, routine diagnostic work is usually limited to the detection of the adhesins. K99 and/or F41 or P987 positive *E. coli* strains appear to produce STa only, whereas K88-positive strains may produce ST and/or LT. As a rule the detection of adhesive antigens is done by a combination of standard bacteriological cultural methods and slide agglutination tests (bacteriological examination: BE). In our institute specific enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA's) have been developed for the direct detection of adhesins in faecal samples.
This report compares the results of BE and ELISA for the detection of K99, P987 and F41. In addition, all strains found positive for these antigens were checked for enterotoxin production.

Full text in English.

[1]) CDI - Department of Bacteriology.
[2]) CDI - Department of Herd Health and Pathology.
[3]) CDI - Department of Immunology.

Spiramycin and the antibacterial treatment of mastitic cows.

J. H. M. VERHEIJDEN[1]), U. VECHT[2]), W. VAN LEEUWEN[3]) and
A. S. J. P. A. M. VAN MIERT[4])

Tijdschrift voor Diergeneeskunde 109, 1984, 554-556

The Minimum Inhibitory Concentrations (MIC) for 18 strains of staphylococci isolated from the national randomized mastitis surveys were determined. The antibiotics used were penicillin-G, cloxacillin and spiramycin. On the basis of these findings in addition to literature data concerning clinical efficacy trials it is concluded, that spiramycin is indicated for the treatment of persistent chronic udder infections caused by penicilline-G resistant strains of *Staphylococcus aureus*.

Full text in English.

[1]) State University of Utrecht:
Dept. of Herd Health and Ambulatory Clinic.
[2]) CDI - Department of Bacteriology.
[3]) Dept. of Obstretic, Gynaecology,State University of Utrecht.
[4]) Dept. of Veterinary Pharmacology, Pharmacy and Toxicology, State University of Utrecht.

MANIPULATION OF THE HUMORAL AND CELLULAR IMMUNE RESPONSE
(PROJECT 32-34)

Restricted recognition of H-2 subregion coded alloantigens in delayed-type hypersensitivity

A. T. J. BIANCHI[1]), H. BRIL[2]), L. M. HUSSAARTS-ODIJK[2]) and R. BENNER[2])

Immunogenetics 20, 1984, 347

Subcutaneous (sc) immunization of mice with H-2K, I or D incompatible spleen cells induces a state of host-versus-graft (HvG) delayed-type hypersensitivity (DTH). The DTH reaction is elicited by challenging the immunized mice in a hind foot with similar allogenetic spleen cells and is measured as the subsequent foot swelling. DTH effector T cells specific for H-21-coded alloantigens, but not for H-2K/D-coded alloantigens, can be induced in a graft-versus-host (GvH) model as well.
In this paper we report that under HvG as well as under GvH conditions the recognition of class II antigens by DTH effector T cells is restricted by class I molecules. Furthermore, DTH effector T cells induced by sc immunization with class I antigens appear to be restricted by class II molecules.

Full text in English.

[1]) CDI - Department of Immunology.
[2]) Erasmus University, Dept. of Cell Biology and Genetics, Rotterdam.

Modifications of immune induction by adjuvant

A. T. J. BIANCHI[1]), PH. J. VAN DER HEIJDEN[1]) and B. A. BOKHOUT[1])

Advances in Experimental Medicine and Biology, in press

The role of adjuvanticity in the modification of the immune induction was studied by separate application of antigen and adjuvant in mice. An antigen specific plaque forming cell (PFC) test and a delayed type hypersensitivity (DTH) assay were used for these studies. Antigen (SRBC) and adjuvant were applicated separately in time and place. A stable well defined water-in-oil emulsion without antigen was used as adjuvant. Our studies have shown that intraperitoneal (i.p.) injection of this adjuvant stimulates the intravenous (i.v.) induced PFC response, while the DTH response is suppressed. This effect can be demonstrated even when adjuvant has been injected i.p. 5 days prior to i.v. antigen injection. The stimulation of the PFC response depends on the dosage of i.v. injected antigen.

Full text in English.

[1]) CDI - Department of Immunology.

Suppression of delayed type hypersensitivity to third party 'bystander' alloantigens by antigen-specific suppressor T cells

A. T. J. BIANCHI[1], L. M. HUSSAARTS-ODIJK[2]) and R. BENNER[2])

Cellular Immunology, 81, 1983, 333

Delayed type hypersensitivity (DTH) against alloantigens can be induced by sc immunization with allogeneic cells. The induction of DTH can be suppressed by iv preimmunization of the mice with similar allogeneic spleen cells, provided the cells are irradiated before injection. The suppression is mediated by T cells. The suppressor activity can be induced not only by H-2 and non-H-2 coded antigens, but also by H-2 subregion coded antigens. Suppression induced by K, I or D subregion coded antigens is specific for that particular subregion as well as for its haplotype. I-J coded alloantigens were found to be not necessary for the induction of antigenspecific suppressor T cells. After restimulation of suppressor T cells by the 'specific' alloantigens, the DTH to simultaneously administered third party alloantigens becomes suppressed as well. This nonspecific suppression of DTH to third party 'bystander' alloantigens also occurs when the 'specific' and third party antigens are presented on separate cells, provided that both cell types are administered together at the same site. The simultaneous presentation of both sets of alloantigens during the induction phase of DTH only is sufficient to prevent the normal development of DTH to the third party antigens.

Full text in English.

[1]) CDI - Department of Immunology.
[2]) Erasmus University, Dept. of Cell Biology and Genetics, Rotterdam.

The long-lasting state of specific nonresponsiveness induced by intravenous immunization with alloantigens is due to the generation of recirculating suppressor T cells

A. T. J. BIANCHI[1]), L. M. HUSSAARTS-ODIJK[2]), H. BRIL[2]), H. DE RUITER[2]) and R. BENNER[2])

Advances in Experimental Medicine and Biology, in press

We investigated whether the long-lasting state of nonresponsiveness that is induced by intravenous immunization with alloantigens is mediated by suppressor T cells, or is caused by inactivation or deletion of the relevant alloreactive T cell clones. The data from parabiosis and thoracic duct drainage experiments suggest that the state of nonresponsiveness depends on recirculating non-proliferating Ts memory cells.

Full text in English.

[1]) CDI - Department of Immunology.
[2]) Erasmus University, Dept. of Cell Biology and Genetics, Rotterdam

Suppression of antigraft immunity by preimmunization. II. Characterization of the suppressor cells.

A. T. J. BIANCHI[1]), L. M. HUSSAARTS-ODIJK[2]), Th. H. VAN DE KWAST[2]) H. BRIL[2]) and R. BENNER[2])

Transplantation 37, 1984, 490

Immunization of mice with irradiated (20 Gy) or non-irradiated allogeneic spleen cells iv induces delayed type hypersensitivity (DTH) reactive T cells, as well as suppressor T cells, against histocompatibility (H) antigens. The suppressor T cells are unable to suppress the induction and functional activity of the simultaneously activated DTH reactive T cells. However, the suppressor T cells do suppress the generation of DTH reactive T cells after subsequent sc immunization of the same mice and after transfer into secondary recipients.
Systemic transfer of suppressor T cells is effective the first few days fter their induction only, and affects the afferent limb of the DTH response. The population of suppressor T cells which is essential for the systemic transfer of suppression, appeared to be Lyt-1^+2^+. Splenectomy experiments showed that the spleen is not essential for induction of the suppressor T cells. The precursors of the suppressor T cells belong to the pool of recirculating T lymphocytes; they are insensitive to adult thymectomy and can be depleted by anti thymocyte serum treatment.

Full text in English.

[1]) CDI - Department of Immunology.
[2]) Erasmus University, Dept. of Cell Biology and Genetics, Rotterdam

Adjuvant application without antigen for prevention of diseases in piglets.
Effect obtained by manipulation of the immune system.

B. A. BOKHOUT[1]), PH. J. VAN DER HEIJDEN[1]), M. J. A. NABUURS[2]),
J. W. PALS[1]), J. W. SCHOLTEN[1]) and W. STOK[1])

In: Adjuvants, interferon and non-specific immunity, CEC-report, EUR 8675, 1984, p. 101-107

Shortly before weaning, piglets were injected intraperitoneally (i.p.) with a stable water-in-oil emulsion which served as an adjuvant without any antigen added. A statistically significant positive effect was shown by adopting experimental schemes involving alternate treatment with adjuvant and physiological saline, or adjuvant treatment and no treatment at all. So far more than 100,000 piglets were treated on a number of farms. On these farms the need for antibiotic treatment sharply declined. Research done in CBA and C3H mice i.p. injected with the same adjuvant indicates an adjuvant induced modification of the specific immune response to sheep red blood cells which were administered via the gastrointestinal tract.

Full text in English.

[1]) CDI - Department of Immunology.
[2]) CDI - Department of Herd Health and Pathology.

SYSTEMATIC EPIDEMIOLOGICAL INVESTIGATION OF HELMINTHS (PROJECT 36)

Helminth parasites of wild foxes *(Vulpes vulpes* L.*)* in the Netherlands

F. H. M. BORGSTEEDE[1])

Z. Parasitenkd. 70, 1984, 281-285.

To study the helminth fauna of wild foxes *(Vulpes vulpes)* in the Netherlands, material was collected from 139 foxes. The following parasites were found. Cestodes: *Taenia* spp. 53.3%, *Hymenolepis* spp. 1.5%; Trematodes: *Alaria alata* 10.9%, *Cryptocotyle lingua* 3.6%, *Euparyphium melis* 1.5%, *Apophallus donicus* 0.7%; Nematodes: *Toxocara canis* 73,7%, *Uncinaria stenocephala* 59.9%, *Capillaria aerophila* 46.8%, *C. plica* 23.5%, *Molineus patens* 5.1%, *Crenosoma vulpis* 4.5%, *Strongyloides* spp. 0.7%. The tapeworms *Mesocestoides* spp. and *Echinococcus* spp. were not seen. No relationship was observed between worm burden and sex, time of year or place of origin.

Full text in English.

[1]) CDI - Department of Parasitology.

Experimental Ascaris-infections in mice

W. P. J. V/D BURG[1]), F. H. M. BORGSTEEDE[1])

Tropical and geographical medicine 36; 1984, 103

In a series of experimental infections with Ascaris-eggs in mice it was shown that a dose of 50.000 eggs with slaughter of mice at 6 days after infection proved to be optimal to collect fourth stage larvae from the lungs after 3 hours of Baermannization.

Full text in English.

[1]) CDI - Department of Parasitology.

A survey on the occurrence of benzimidazole resistance in nematodes of sheep in the Netherlands

J. H. BOERSEMA[2]), F. H. M. BORGSTEEDE[1]), M. E. EYSKER[2]), W. M. L. HENDRIKX[2]), J. JANSEN[2]), P. MUDDE[2]) and C. M. C. SMITH-BUYS[1])

Tropical and geographical medicine 36; 1984, 105-106.

Out of 57 flocks, 49% showed an $LC^{50} > 0.12$ µc/ml for thiabendazole.
Almost all cases were seen in populations with *Haemonchus contortus* as dominant species. Results of efficacy trials *in vivo* did not show a clear correlation with the results of the egg hatch assay.

Full text in English.

[1]) CDI - Department of Parasitology.
[2]) State University of Utrecht, Department of Helminthology and Entomology.

Resistance of nematodes to anthelmintics: A growing problem?

C. M. C. SMITH-BUYS[1]) and F. H. M. BORGSTEEDE[1])

Tropical and geographical medicine 36; 1984, 106

The history of anthelmintic resistance and the present status in the world are discussed. Experiments with a susceptible and a fenbendazole resistant strain of *Haemonchus contortus* showed that storage of eggs at 4°C for 72 hours did not influence the LC_{50}-values.

Full text in English.

[1]) CDI - Department of Parasitology.

FOOT-AND-MOUTH DISEASE
(PROJECT 45-47)

The scull fermentor

S. J. BARTELING[1])

5th General Meeting of ESACT, Copenhagen, Denmark, 1982. Develop. Biol. Stand. Vol. 55, pp. 143-147 (S. Karger, Basel, 1984).

The scull type mechanical energy transmitting principle is used for mixing BHK-suspension cultures. The shaft is either hanging in a rubber membrane (2-10 l scale) or in a silicon tubing (50 l) or in a 'ball-joint' (300 l). In the latter two cases silicon tubing isolates the gyration point of the agitator. In all cases the sealing mechanism is characterized by absolute sealing properties, the absence of contamination of the vessel contents by grinding particles (as in mechanical or oil seal systems), and the simplicity and cheapness of construction.
At the 10 l scale the rubber membrane used by us is the fibromixer seal (Chemap AG, Männedorf, Switzerland). In general, these membranes lasted for at least a year and withstood repeated sterilization cycles at weekly intervals either in the autoclave or in situ. At the 50 l scale the principle was realized by hanging the shaft in a stainless steel funnel-shaped fitting by thick walled (3 mm) silicon tubing. The gearing on top of the shaft was connected to the shaft by silicon tubing as well, giving some flexibility to the orientation of the gearing. Since the agitation was performed in a 50 l Q-shaped glass fermentor (Bilthoven Unit, Contact-Roestvrijstaal, Ridderkerk, the Netherlands), the mixing device had to pass the relatively small neck of the vessel. Therfore, thick walled (5 mm) silicon tubing was used that was fitted on side branches of the shaft. This whole system has been used for over 1 year now, with a weekly in situ sterilization at 110°–115° for 3 hrs.
The over 10^7 mixing movements that were made so far did not optically damage the sealing silicone tube.
At the 300 l scale and higher the shaft may become too heavy to be hung in the silicone tubing. Therefore, we used a 'ball-joint' support. For neutralization of the gyration forces a gaff was connected to the shaft. A conducting bar kept the gaff in position. Silicon tubing again isolated the gyration point from the inside of the fermentor.
If one considers the mixing movements of a four branch anchor type stirrer, one gets a very intensive agitation. Near the wall of the vessel the medium follows the overall movement of the agitator.
In a series of parallel BHK-suspension cultures cell yields were compared at the 50 l scale. Table I shows that cell densities that were reached in three day cultures were higher in the scull fermentor than in the same vessel equipped with an impeller system.
No comparisons have been made yet at the 300 l scale.

Full text in English.

[1]) CDI-Department of Virology.

Serological response in cattle vaccinated with oil emulsion vaccines prepared from highly concentrated inactivated antigen stocks stored at −70°C.

S. J. BARTELING[1]) and S. FRENKEL[1]).

Report of a session of the research group of the standing technical committee of the European commission for the control of foot-and-mouth disease, Italy, Brescia, 1984, pp. 23-29.

Single and double oil emulsion vaccines were prepared from concentrated purified aziridin-inactivated antigen, that had been stored at −70°C for several years. The activity of these (trivalent) vaccines were compared with formaldehyde inactivated Al-hydroxyde-saponin (Quil A) vaccines from our routine production. The vaccines contained comparable amounts of 146S antigen. Although the Al-hydroxyde-saponin vaccines induced somewhat higher neutralizing activities shortly after vaccination on the long term the double oil emulsion vaccines remained slightly higher. For type C_1-virus mean neutralizing activities dropped below the 95% protection level in six to eight months, while this level was approached at approx. nine months in case of type A_{10} and O_1. The single oil emulsion formulation was found inferior to the other two vaccines.

Full text in English.

[1]) CDI-Department of Virology.

Formaldehyde inactivation of foot-and-mouth disease virus. Conditions for the preparation of safe vaccine.

S. J. BARTELING[1]) and R. WOORTMEYER[1]).

Archives of Virology, 1984, 80, 103-117.

The inactivation of foot-and-mouth disease virus by formaldehyde was studied under different conditions, both as free virus and (as in routine vaccine production) after adsorption of the virus to aluminium hydroxide gel (alhydrogel). In the latter case infectivity was monitored after elution of the virus from the gel by isopycnic ultracentrifugation of the virus-alhydrogel mixture in CsCl. By this method good virus recoveries were obtained. Adsorption of the virus to alhydrogel (without formaldehyde) did not reduce infectivity significantly. Both adsorbed and non-adsorbed virus lost infectivity at a rate of about one $\log_{10}$ per day (at pH 8.5, 25°C - no formaldehyde).
Kinetics of formaldehyde inactivation of adsorbed and non-adsorbed virus were also identical, with a fast reduction in the initial phase (in case of O_1 and A_{10}-virus approximately one $\log_{10}$/hour. After this initial phase inactivation became lineair and rather slow (for O_1 and A_{10}-virus 0.2 $\log_{10}$/hour). No 'tailing of' was observed. Under standard

conditions (0.04 per cent formaldehyde, pH 8.5, 25°C)C_D-virus was inactivated approximately 1.5 times faster than O_1 and A_{10}-virus. At 4°C the inactivation of the three strains continued at about one $\log_{10}$/day.
Increased lactalbumin hydrolysate concentrations reduced the inactivation rate, especially at the formaldehyde concentration of 0.02 per cent, which was originally applied. Quaternary amines like Tris strongly inhibited formaldehyde activity. These findings might explain some data of others who observed 'tailing-off'.
Analysis of formaldehyde inactivated antigen by SDS-PAGE and electrofocusing showed that extensive cross-linking occurs especially of VP_1 probably with other virus proteins but also with non-virus proteins from the medium. VP_2 and VP_3 are less affected. Cross-linking was enhanced when the virus had been adsorbed to alhydrogel during inactivation.
Progressive cross-linking was observed during storage of the vaccine at 4°C, which also indicated that inactivation continued at this temperature.
These data show that formaldehyde inactivated adsorbate vaccines can be safe.

Full text in English.

[1]) CDI-Department of Virology.

Further study of the neutralizing antigenic determinants of FMDV type 0_1-BFS and A_{10} with the aid of monoclonal antibodies

R. H. MELOEN[1]) and S. J. BARTELING[1])

Report of the session of the Research Group of the standing technical committee of the European Commission for the control of foot-and-mouth disease, The Netherlands, Lelystad, 1984, p. 20-23.

Ascites fluids containing monoclonal antibodies against FMDV type 0_1-BFS and A_{10} were tested in the MNT, in a RIA and in ELISA against different antigens. In case of type 0 virus one group of neutralizing antibodies was found. These antibodies only reacted with 140S. Neutralizing monoclonal antibodies against type A_{10} could be divided into 4 distinct groups. Two of these groups reacted with 140S and 12S, but only one of them reacts with trypsin 140S. Two other groups reacted with 140S particles only, one of them reacted with trypsin treated 140S as well. The different groups of antibodies had similar neutralizing activities. This study again indicates that the reliability of the ELISA in case of FMDV is debatable.

Full text in English.

[1]) CDI - Department of Virology.

The thermal death time curve for foot-and-mouth disease virus contained in primarily infected milk

J. S. WALKER[1]), P. W. DE LEEUW[2]), J. J. CALLIS[1]) and J. G. VAN BEKKUM[2])

Journal of Biological Standardization (1984) 12, 185-189.

Whole and skim milk obtained from cows after intramammary and intravenous inoculation with foot-and-mouth disease virus (primarily infected milk) were exposed to various temperatures ranging from 80 to 148°C for various times ranging from 2.5 s to 27 min then tested for viral infectivity. The average pretreatment titre of the 53 lots of milk used was $10^{5.9}$ plaque-forming units of virus per millilitre (range $10^{3.7}$-$10^{6.8}$). A thermal death time curve was plotted using the data obtained. The curve demonstrates that in order to inactivate the virus, times of over 20 min are necessary at 'low' temperatures (100°C) while 2.5 s is sufficient at a temperature of 148°C.

Full text in English.

[1]) Plum Island Animal Disease Center, Greenport, USA.
[2]) CDI - Department of Virology.

SWINE FEVER (INVESTIGATIONS AND DIAGNOSIS)
(PROJECT 49)

Hog cholera

J. T. VAN OIRSCHOT[1]) and C. TERPSTRA[1])

Viral diseases of vertebrates, vol. 2 (Viral infections of swine) in press.

Hog cholera (HC; synonym: swine fever) is a contagious viral disease of pigs that can run an acute, subacute, chronic, or clinically inapparent course. The mortality rate can range from nil to virtually 100 per cent. Under natural conditions, the pig is the only animal to become infected.
The first outbreaks were reported from Ohio, USA, in the early 1830's. At present, HC has a worldwide distribution. In the last decades, some countries, e.g. USA, Canada and Great Britain have been successful in eradicating the disease. In countries where HC is enzootic, the disease is of high economic importance.

Full text in English.

[1]) CDI - Department of Virology.

The neutralizing peroxidase-linked assay for detection of antibody against swine fever virus

C. TERPSTRA[1]), M. BLOEMRAAD[1]) and A. L. J. GIELKENS[1])

Veterinary Microbiology, 9, 1984, p. 113-120.

The neutralizing peroxidase-linked antibody (NPLA) assay was standardized and compared with the micro-plaque reduction test (PRT) on series of sera from pigs infected with different strains of swine fever virus (SFV) and bovine virus diarrhoea virus (BVDV), swine fever reference sera and field sera. The NPLA system was found to be as sensitive as the PRT, it detected SFV antibody in 17 out of 18 pigs 3 weeks after intranasal exposure and differentiated between antibody against SFV and BVDV. With varying concentrations of SFV parallel lines of neutralization with a slope of about 120° were obtained with sera of different origin. The regression coefficient of approximately −1.74 implies that a 10-fold increase in the virus dose will result in an approximate 3.8-fold decrease in the serum titre.
The NPLA assay has a high capacity and has been found to be a great asset in large scale surveys for detection of neutralizing antibody against SFV.

Full text in English.

[1]) CDI - Department of Virology.

Experience with a modified neutralising peroxidase linked assay for detection of antibody against swine fever virus.

C. TERPSTRA[1]) and G. WENSVOORT[1])

Proceedings of the 8th International Pig Veterinary Society, Belgium: Ghent, 1984, p. 64.

The sensitivity of the neutralising peroxidase-linked assay (NPLA) was compared with the micro plaque reduction test (PRT) using sera from three groups of 6 pigs, which had been exposed by intranasal route to the low virulent Henken, Bergen and Zoelen strain of SFV, respectively.
The average PRT and NPLA titres for each group of 6 pigs were very close at any time, indicating that the sensitivity of the two methods is very much the same.
Reading of the NPLA test with the naked eye, however, was not always possible. The mild aceton fixation made the intracytoplasmic SF antigen insufficiently accessible for the indirect staining. The fixation and staining procedure, therefore, have been modified as follows. After growing to confluency, the monolayers are rinsed with saline, dried for 30 min at 37°C and stored at −20°C for at least 20 min. Cell sheets are then fixed with 4% cold paraformaldehyde in PBS and stained with a direct HRPO conjugate of monoclonal antibodies against SFV. These modifications have resulted in an extremely clear signal, which enables a quick and indisputable reading of the test with the naked eye. A comparison between the original and modified fixation and staining procedure on the sera of the 18 pigs exposed to low virulent strains of SFV yielded a perfect regression equation ($\hat{y} = 0.97x + 0.07$) and a high correlation coefficient ($r = 0.95$).
The NPLA has greatly increased the number of samples that can be handled and has proven a valuable asset in large scale investigations for the detection of neutralising antibody against SFV.

Full text in English.

[1]) CDI - Department of Virology.

Classical swine fever: a changing clinical picture. Varkenspest: Een veranderend ziektebeeld

G. WENSVOORT[1]) and C. TERPSTRA[1])

Tijdschrift voor Diergeneeskunde, in press

Signs of disease typical for classical swine fever are often absent in outbreaks caused by virus strains of low virulence. The clinical picture and epizootiology of these strains of swine fever in the Netherlands are elucidated on the basis of experimental infections and field outbreaks, respectively. Both high and low virulent strains occur in the present epizootic. The lack of symptoms hinders an early detection in the field.
Intra uterine infections can occur in a high proportion of the pregnant sow population. On one farm 43% of these sows appeared to be infected intra uterine. Piglets born from such sows may live for weeks or sometimes months without conspicious symptoms, through which the virus can persist for a long time, also in vaccinated herds.

Full text in Dutch.

[1]) *CDI - Department of Virology.*

VIRUS INFECTIONS IN SHEEP (OTHER THAN MAEDI/VISNA) (PROJECT 52)

Nairobi sheep disease

C. TERPSTRA[1])

Viral infections of vertebrates, vol. 1 (Viral diseases in ruminants) in press.

Nairobi sheep disease (NSD) is a non-contagious tick-transmitted virus disease of small ruminants, characterized by fever, haemorrhagic gastro-enteritis, abortion of pregnant animals and a high mortality, especially in sheep. The disease was first observed in the vicinity of Nairobi among sheep and goats, originating from dry zone areas in the northern and southern parts of Kenya and reported by Montgomery (1917). NSD is known to occur in East and Central Africa, but from antibody surveys the virus is suspected to be present as far north as Ethiopia and Somalia and as far southward as Botswana and the Mozambique coastal plain.

Full text in English.

[1]) CDI - Department of Virology.

Restriction endonuclease patterns of the genome of Aujeszky's disease virus isolated from latently infected pigs.

A. L. J. GIELKENS[1])

Latent herpesvirus infections in veterinary medicine; Boston: Nijhoff, 1984, p. 385-386.

Latency of the virulent Northern Ireland Aujeszky three (NIA-3) strain of Aujeszky's disease virus (ADV) was established in seronegative pigs, vaccinated pigs and pigs with high maternal antibody. The latent virus was reactivated by in vivo and in vitro methods (Van Oirschot, 1984).
The present study was conducted to determine whether the viruses isolated after primary infection and reactivation were identical based on DNA restriction profiles.
Four months after infection of maternal immune pigs with NIA-3, virus was reactivated by corticosteroid treatment.
Virus recovered from oropharyngeal fluid (OPF) samples was grown in pig kidney cells and infected cell DNA was analysed with the restriction en donuclease Bam HI in combination with Southern blot hybridization (Gielkens and Berns, 1982). The DNA fragment patterns of viruses isolated from swabs after primary infection and corticosteroid treatment were shown to be parental-like. However, they both revealed an additional Bam HI DNA fragment of approximately 3 kb, not present in the parental NIA-3 virus stock.
Virus isolated from cultured ganglionic tissue of these pigs showed the same pattern. We are presently characterizing the 3 kb DNA fragment to determine whether it originates from defective genomes.
By analysis of DNA of virus isolated from ganglionic and tonsillar tissue of several seronegative pigs infected with NIA-3 1-2 months previously, it was shown that the restriction profiles were identical to that of NIA-3 isolated shortly after primary infection (NIA-3 pi).
In OPF of pigs intranasally vaccinated with Bartha's K strain virus can be detected for several days after vaccination. The DNA-fragment patterns of these isolates were shown to be Bartha-like. After challenge of these pigs with NIA-3 some virus containing OPF samples were grown in pig kidney cells and infected cell DNA was analysed.
The Bam HI restriction profiles obtained were indistinguishable from that of NIA-3 pi. Ten weeks after challenge the pigs were treated with corticosteroids and sentinel pigs were introduced (Van Oirschot, 1984). Again, virus isolated from the reactivated pigs and the sentinel pigs could not be distinguished from the NIA-3 pi isolates. No evidence was obtained for simultaneous excretion of the avirulent Bartha's K strain.
In conclusion, by restriction endonuclease analysis of ADV reactivated from latently infected pigs, it was shown that the state of the viral genome during establishment and maintenance of the latent phase presumably does not result in structural changes in the viral DNA.

Full text in English.

[1]) CDI-Department of Virology.

Genome differences among plaque isolates of Aujeszky's disease virus vaccines

A. L. J. GIELKENS[1]), J. BRIAIRE[1]) and J. T. VAN OIRSCHOT[1])

Proceedings of the 8th International Pig Veterinary Society-congress; Belgium: Ghent, 1984, p. 19.

In several European countries attenuated vaccines are applied in the control of Aujeszky's disease (AD). Most of the attenuated vaccines have been produced by passage of virus from a clinical outbreak of AD in embryonated eggs and/or tissue culture. In addition, strains of low virulence have been selected by growth of virulent virus in the presence of mutagens or passage at low temperatures.
Previously, a number of commercially available vaccine strains have been studied by restriction endonuclease analysis. This method employs enzymes cleaving DNA at points along the genome where specific target sequences are recognized. The fragments generated can be separated by gel electrophoresis and the cleavage pattern obtained gives information about the genetic make-up of the DNA examined.
The vaccine strains had characteristic cleavage patterns which were distinctly different from another and from those of wild-type strains.
In this report we will describe experimental evidence indicating the presence of closely related variants in the parent virus stocks of most attenuated AD-virus vaccines.

Full text in English.

[1]) CDI-Department of Virology.

Restriction endonuclease analysis of Aujeszky's disease virus DNA

A. L. J. GIELKENS[1]), J. T. VAN OIRSCHOT[1]), F. W. VAN SCHIE[2]) and B. TOMA[3])

Recent advances in virus diagnosis; Boston: Nijhof, 1984, p. 101-114.

Restriction endonuclease analysis of virus DNA provides a suitable method to differentiate field isolates of Aujeszky's disease virus (ADV). In most cases the differences that have been recognized in cleavage profiles of wild-type strains involved variations in the electrophoretic mobility of certain restriction fragments.
Differences with respect to the presence or absence of cleavage sites were less frequently observed. Live-virus vaccine strains of ADV demonstrated unique DNA fragment patterns which were clearly different from one another and from those of wild-type virus isolates.
Restriction endonuclease analysis appeared to be a highly effective tool for
(1) the identification of live-virus vaccine and wild-type virus in field cases of AD;
(2) the demonstration of structural changes within the virus DNA during attenuation of virulent virus in tissue culture;

(3) the study of persistence and spread of ADV within a pig herd and to trace the origin of infection;
(4) the identification of the virus(es) excreted after corticosteroid treatment of latently infected pigs.

Full text in English.

[1]) CDI-Department of Virology.
[2]) Regional Animal Health Service, Velp, Holland
[3]) Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort Cedex, France

Intranasal vaccination of pigs against Aujeszky's disease. 3. Comparison with inactivated vaccines in pigs with low maternal antibody titres

P. W. DE LEEUW[1]) and J. T. VAN OIRSCHOT[1])

Research in Veterinary Science - in press

Intranasal vaccination with an attenuated Aujeszky's disease virus strain was compared with parenteral vaccination with 2 inactivated virus vaccines, in 10 week old pigs with low levels of maternal antibody.
Intranasal vaccination conferred a much better protection than parenteral vaccination with the 2 inactivated vaccines against challenge two months later, as evidenced by shorter periods of growth arrest and fever and a greater reduction of virulent virus shedding after challenge-exposure.

Full text in English.

[1]) CDI-Department of Virology.

Vaccines against Aujeszky's disease: evaluation of their efficacy under standardized laboratory conditions.

P. W. DE LEEUW[1]) and J. T. VAN OIRSCHOT[1])

The Veterinary Quarterly, in press.

A standardized test was developed to compare the efficacy of Aujeszky's disease virus (ADV) vaccines under laboratory conditions. Per test 3 groups of 6 to 8 sero-negative pigs were used.
The first vaccination was done at 10 weeks of age. One group was vaccinated once, another was vaccinated twice and the 3rd served as control.
Pigs were challenge exposed to the virulent NIA-3 strain of ADV 12 weeks after the first vaccination. Apart from mortality, average periods of growth arrest, fever and virus

shedding after challenge were used as parameters to evaluate vaccine efficacy.
Two inactivated and 4 attenuated vaccines were tested. Two attenuated vaccine viruses were excreted. After vaccination, despite maximal standardization, a considerable variation still existed between the experiments in mortality and growth arrest periods of control pigs after challenge. However, the controls were always more severely affected than the vaccinated pigs. All vaccines except one were effective in preventing death after challenge, but none conferred complete protection.
Most vaccinated pigs still lost weight, developed fever and shed virus after challenge. Revaccination after 3 or 4 weeks had little effect, particularly with the attenuated vaccines. The results of the present study indicate that 2 of the attenuated vaccines conferred the best protection, 1 attenuated vaccine appeared to be as effective as the 2 inactivated ones, and the 4th attenuated vaccine was least effective.

Full text in English.

[1]) CDI-Department of Virology.

Latency of virulent Aujeszky's disease virus in pigs is not prevented by passive or active immunization

J. T. VAN OIRSCHOT[1])

Latent herpes virus infections in veterinary medicine; Boston, Nijhoff, 1984, p. 417-427.

The NIA-3 strain of Ausjeszky's disease virus (ADV) established latent infections in seronegative pigs, in pigs having high or low levels of maternal antibody and in intranasally vaccinated pigs. One to 4 months after the primary infection latency of ADV was demonstrated by in vitro and in vivo reactivation procedures.
Explants of trigeminal ganglion produced infectious ADV after 4 days in culture. Administration of high doses of corticosteroids to previously infected pigs resulted in shedding of virus in oral secretions after a lag period of 4-11 days. The recrudescent shedding was not accompanied by severe clinical signs. In a number of pigs the recurrent infection resulted in a rise of neutralizing antibody. Most pigs re-excreted ADV to such a level that in contact pigs became infected.
The findings reported here indicate that pigs, whether immunized or not at the time of virulent ADV infection, must be regarded as potential shedders of ADV.

Full text in English.

[1]) CDI - Department of Virology.

In vivo and in vitro reactivation of latent pseudorabies virus in pigs born to vaccinated sows

J. T. VAN OIRSCHOT[1]) and A. L. J. GIELKENS[1])

The American Journal of Veterinary Research, Vol. 45, 1984, p. 567-571.

Latency of pseudorabies virus (PRV) was established in 8 of 9 pigs born to 2 vaccinated sows. Pigs had high, low, or no maternal antibody titers at the time of the initial inoculation. At postinoculation months 3 to 4, latent PRV could be reactivated in vivo by the administration of large doses of corticosteroids. In most pigs, the stress-simulating treatment resulted in recrudescence of virus shedding after lag periods of 4 to 11 days.
In 3 pigs, virus shedding was without clinical signs of disease, whereas clinical signs that developed in 4 pigs appeared to be due to the corticosteroid treatment, rather than to the reactivation of PRV. Pigs with a $\log_{10}$ neutralizing antibody titer of $\geq$ 2.55 at the onset of corticosteroid treatment had a booster response. Reactivated PRV spread to sentinel pigs housed with the inoculated pigs.
Reactivation of PRV was also demonstrated in vitro. Explant cultures of trigeminal ganglia from pigs killed between postinoculation months 4 to 5 produced infectious virus.
Restriction endonuclease analysis indicated that the reactivated PRV was indistinguishable from virus isolated shortly after the primary infection.
Seemingly, pigs with maternal antibodies can become latently infected and therefore may be regarded as potential sources of dissemination of PRV.

Full text in English.

[1]) CDI - Department of Virology.

Intranasal vaccination of pigs against pseudorabies: Absence of vaccinal virus latency and failure to prevent latency of virulent virus

J. T. VAN OIRSCHOT[1]) and A. L. J. GIELKENS[1])

American Journal of Veterinary Research, Vol. 45; 1984, p. 2099-2103.

The avirulent Bartha's K strain of pseudorabies virus (PRV) was used to vaccinate 8 pigs at 10 weeks of age by the intranasal route (experiment 1).
On postvaccination days (PVD) 63 and 91, pigs were treated with corticosteroids. Viral shedding could not be detected. Explant cultures of trigeminal ganglia and tonsils did not produce virus.
Four pigs with maternal antibody were vaccinated intranasally with Bartha's (attenuated) K strain of PRV at 10 weeks of age and were challenge exposed with a virulent strain of PRV on PVD 63 (experiment 2). Corticosteroid treatment, starting on

postchallenge exposure day 70 (PVD 133) resulted in viral shedding in 1 of 4 pigs. In another pig of these 4, a 2nd corticosteroid treatment was required to trigger reactivation. In both pigs, sufficient reactivated virus was excreted to infect susceptible sentinel pigs.
Restriction endonuclease analysis indicated that viruses isolated from the 2 pigs after challenge exposure and corticosteroid treatment were indistinguishable from the virulent virus. Evidence was not obtained for simultaneous excretion of vaccinal and virulent virus.
Of 4 pigs without maternal antibody vaccinated twice with 1 of 2 inactivated PRV vaccines, challenge exposed on PVD 84, and treated with corticosteroids on postchallenge exposure day 63 (PVD 147), 1 was latently infected, as evidence by the shedding of PRV (experiment 3). However, its sentinel pig remained noninfected.
Seemingly, vaccinal virus could not be reactivated from vaccinated pigs; intranasal or parenteral vaccination failed to prevent the establishment of latency by virulent PRV.

Full text in English.

[1]) CDI - Department of Virology.

Latency of virulent Aujeszky's disease virus in immunized pigs

J. T. VAN OIRSCHOT[1]) and A. L. J. GIELKENS[1])

Proceedings of the 6th International Congress of Virology, Japan: Sendai, 1984, p. 95.

Like other herpes viruses, Aujeszky's disease (pseudorabies) virus can induce latent infections. The importance of the latently infected pigs in the epizootiology of the infection is not yet established. We examined whether i) passively or actively immunized pigs could become latently infected, ii) reactivated virus spread to sentinel pigs, and iii) attenuated vaccine virus could be reactivated.
Pigs with high maternal antibody titres and pigs vaccinated intranasally with the attenuated Bartha strain were intranasally inoculated with 10^5 plaque forming units of the virulent NIA-3 strain. Two to 4 months postinoculation, Aujeszky's disease virus was reactivated in passively as well as actively immunized pigs after the administration of high doses of corticosteroids. In some pigs shedding of reactivated virus was without clinical signs. Reactivated virus spread to sentinel pigs. Explant cultures of trigeminal ganglia from infected pigs also produced infectious Aujeszky's disease virus. Restriction endonuclease analysis showed that the reactivated virus was indistinguishable from the virulent virus and that there was no evidence for excretion of vaccine virus. In another experiment, the attenuated Bartha strain given intranasally could not be reactivated by the procedures described above. Thus, passively or actively immunized pigs can become latently infected and spread the virus upon (subclinical) reactivation to susceptible pigs.

Full text in English.

[1]) CDI - Department of Virology.

Some characteristics of four attenuated vaccine virus strains and a virulent strain of Aujeszky's disease virus

J. T. VAN OIRSCHOT[1]) and A. L. J. GIELKENS[1])

The Veterinary Quarterly, vol. 6, no. 4, 1984, p. 225-229

In the present study four attenuated virus strains, used as vaccines, and a virulent strain of Aujeszky's disease virus (ADV) were compared with respect to their virulence in mice, their ability to induce virus-specified thymidine kinase (TK) in infected cells, and their cleavage profiles of viral DNAs after treatment with the restriction endonuclease KpnI.
The survival time of mice inoculated with the B-KAL or the virulent NIA-3 strain was comparable, whereas the Bartha and BUK strains required significantly longer periods to kill mice.
Mice were resistant to the MK-25 strain of ADV.
The strains were assayed for TK phenotype by plaque autoradiography after ^{3}H-thymidine labelling of infected cells. MK-25 proved to be the only strain defective in induction of TK in pig kidney cells.
Restriction endonuclease analysis of viral DNAs revealed that each vaccine strain showed a characteristic fragment pattern that could easily be differentiated from that of other vaccine and field strains of ADV. The present results demonstrate that the mouse virulence test and the TK assay detect differences in biological properties of ADV strains, but the restriction endonuclease analysis is required for unambiguous identification of vaccine and field strains of ADV.

Full text in English.

[1]) CDI - Department of Virology.

Antibody active in ADCC after vaccination and infection of pigs with Aujeszky's disease virus

J. T. VAN OIRSCHOT[1]), D. DE JONG[1]) and D. VAN ZAANE[1])

CEC seminar, Dublin, 1984, p. 332-340

The development of antibody active in antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC Ab) and neutralizing antibody (NAb) in sera of pigs vaccinated against Aujeszky's disease with an inactivated vaccine was examined. In 5 pigs which were seronegative at the time of vaccination, the mean ADCC Ab titre was higher than the mean NAb titre, except on day 7 post vaccination. A significant correlation was found between ADCC Ab and NAb titres in sera obtained late after vaccination. In 5 pigs with maternal antibody at the time of vaccination there was a virtual absence of ADCC Ab formation, whereas they did produce NAb. After challenge all animals had high ADCC

Ab titres. The mechanism responsible for the transient and selective impairment of ADCC Ab production remains to be clarified.
Although the period of growth arrest generally decreased with increasing ADCC Ab or NAb titre, no evident correlation was found between protection after challenge and ADCC Ab or NAb titre in serum of pigs vaccinated once or twice. However, when the data of both groups were taken together, NAb titres were significantly correlated with protection, which is in contrast to earlier observations. These findings suggest that ADCC Ab activity in serum probably does not play an exclusive role in protection against Aujeszky's disease, while the role of NAb should be further analyzed.

Full text in English.

[1]) *CDI* - Department of Virology.

Development of antibody active in ADCC after vaccination of pigs against Aujeszky's disease

J. T. VAN OIRSCHOT[1]), D. DE JONG[1]) and D. VAN ZAANE[1])

Proceedings of the 6th International Congress of Virology, Japan: Sendai, 1984, p. 168.

Vaccination confers protection in pigs against an infection with virulent Aujeszky's disease (pseudorabies) virus. The mechanisms underlying the protective immunity are not well understood. Therefore, the development of serum antibody active in antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCCab) after vaccination was examined.
Seronegative pigs given attenuated vaccine intranasally or parenterally, or inactivated vaccine parenterally elicited ADCCab and neutralizing antibody (Nab), ADCCab titres usually being 2 to 3 times higher than Nab titres. A significant correlation existed between ADCCab and Nab titres. There was no correlation between pre-challenge ADCCab titres and degree of protection after challenge. In pigs with maternally derived antibody the response upon parenteral vaccination was impaired, particularly the ADCCab response, resulting in 3 or 4 times higher Nab than ADCCab titres. However, in pigs vaccinated intranasally the impairment was only transient.
Between 1 and 2 months after vaccination, these pigs, in contrast with pigs vaccinated parenterally, did develop a marked ADCCab response.
Pigs vaccinated intranasally were better protected than parenterally vaccinated pigs. Thus, pigs given attenuated or inactivated Aujeszky's disease virus vaccines produced ADCCab, that did not correlate with degree of protection after challenge, indicating that serum ADCCab do not play a decisive role in protection of pigs against Aujeszky's disease.

Full text in English.

[1]) CDI - Department of Virology.

Experience with intranasal vaccination of pigs with maternal antibody against Aujeszky's disease

J. T. VAN OIRSCHOT[1]) and P. W. DE LEEUW[1])

Office International des Epizooties, Vienna; in press

Aujeszky's disease virus (ADV) was isolated for the first time in the Netherlands in 1932 (Burggraaf and Lourens, 1932). It was not until the early 1970's, that Aujeszky's disease (AD) became a serious problem for the Dutch swine husbandry. The increase in the number of outbreaks of AD was associated with an increase in number as well as size of swine herds. Since 1975, vaccination has been practised and its use is still augmenting. In the Netherlands, breeding pigs are usually given inactivated vaccines twice a year, either during pregnancy (about 1 month before farrowing) or during the lactation period.

If fattening pigs are vaccinated, atteNuated vaccines are most frequently used. Shortly after the introduction of ADV vaccines, there was a relative lack of information on these vaccines, a.o. with regard to efficacy. The results that were available could often not be compared, because of great differences in experimental conditions.

Therefore, a standardized test has been developed (De Leeuw and Tiessink, 1980 a, b; De Leeuw and Van Oirschot, 1984), in which objective criteria such as mortality, growth rate, fever and virulent virus shedding after challenge were used to compare the efficacy of ADV vaccines in pigs.

It was found that attenuated vaccines based on the Yugoslavian B-KAL strain or on the Hungarian Bartha strain conferred a better protection than 2 inactivated or 2 other attenuated vaccines that are commercially available in the Netherlands (De Leeuw and Van Oirschot, 1984).

After the introduction of attenuated vaccines in our country, methods were needed to discriminate between vaccine virus strains and wild-type ADV strains. For that purpose, DNA restriction endonuclease analysis has been developed in our laboratory (Gielkens and Berns, 1982). This method proved to be an adequate tool for unambiguous identification of vaccine and wild-type strains of ADV. In addition, the vaccine virus strains could easily be distinguished from one another.

Before vaccination was widely applied, AD was a problem on breeding rather than on fattening farms. Since the disease has been controlled on breeding farms by vaccination, fattening farms encounter more and more AD-outbreaks (Akkermans, 1980).

Full text in English.

[1]) CDI - Department of Virology.

Intranasal vaccination of maternal-immune pigs against Aujeszky's disease is more effective than parenteral vaccination.

J. T. VAN OIRSCHOT[1]) and P. W. DE LEEUW[1])

Proceedings of the 6th International Congress of Virology, Japan: Sendai, 1984, p. 264

Aujeszky's disease (pseudorabies) is caused by a herpes virus. The disease has a worldwide distribution. Vaccination is practised to reduce the great economical losses in the swine husbandry.
However, the efficacy of parenteral vaccination is impaired by the presence of maternally derived antibody (MDA) in pigs born to seropositive sows. We investigated the ability of intranasal vaccination to overcome this interference. In a series of comparative experiments, pigs with various levels of MDA were vaccinated and challenge-exposed 2 or 4 months later.
Intranasal vaccination was done with 10^6 plaque forming units of the attenuated Bartha strain, and parenteral vaccination with several commercially available attenuated or inactivated vaccines. Pigs were challenge-exposed intranasally to 10^5 plaque forming units of the virulent NIA-3 strain of Aujeszky's disease virus. The results demonstrate that intranasal vaccination conferred better protection than 1 or 2 parenteral vaccinations, as evidenced by shorter growth arrest and fever periods, and a greater reduction of virulent virus shedding after challenge. However, the efficacy of intranasal vaccination decreased, as MDA titres were higher at vaccination.
To what extent local immunity underlies the better protection after intranasal vaccination is subject of current research.

Full text in English.

[1]) CDI - Department of Virology.

Evaluation of efficacy of Aujeszky's disease virus vaccines in pigs under standardized conditions

J. T. VAN OIRSCHOT[1]) and P. W. DE LEEUW[1])

Proceedings of the 8th International Pig Veterinary Society-congress; Belgium, Ghent, 1984, p. 29

Vaccination of pigs against Aujeszky's disease (AD) is a common practice in numerous countries. Data on efficacy of Aujeszky's disease virus (ADV) vaccines often can not be compared, because of different experimental conditions. This report presents results of a standardized test that was developed to compare the efficacy of ADV vaccines.

Full text in English.

[1]) CDI - Department of Virology.

Intranasal vaccination of pigs against Aujeszky's disease. 4. Comparison with one or two doses of an inactivated vaccine in pigs with moderate maternal antibody titres

J. T. VAN OIRSCHOT[1]) and P. W. DE LEEUW[1])

Veterinary Microbiology, in press.

Intranasal (IN) vaccination of pigs with low levels of maternally derived antibody (MDA) has previously been shown to confer good protection against challenge with virulent Aujeszky's disease virus (ADV). The objective of the present study was to determine the efficacy of IN vaccination with an attenuated ADV, in comparison with that of an inactivated vaccine given parenterally, in pigs with higher MDA titres at the time of vaccination.
In one experiment vaccinations were done at 6 weeks of age, and in another experiment pigs were vaccinated at ages of 4 and/or 9 weeks. Two months after (the last) vaccination pigs were challenged IN with a virulent ADV. Protection was evaluated on the basis of mortality, periods of growth arrest, fever and virus shedding after challenge. The presence of MDA markedly depressed the serum-neutralising antibody response after vaccination. Sensitisation occurred after parenteral vaccination with an inactivated vaccine despite high MDA levels. Although the intranasally vaccinated pigs had lower levels of neutralising antibody at the time of challenge, they were significantly better protected than pigs given 1 or 2 doses of the inactivated vaccine.
Comparing the present results with those of a previous study, it appears that the efficacy of parenteral as well as of intranasal ADV vaccination decreases, with increasing levels of MDA at the time of vaccination.

Full text in English.

[1]) CDI - Department of Virology.

Vaccination confers protection against Aujeszky's disease in cattle

J. T. VAN OIRSCHOT[1]), P. W. DE LEEUW[1]) and J. W. A TIESSINK[1])

Zentralblatt für Veterinärmedizin, Reihe B, in press

In regions where Aujeszky's disease (AD) has become endemic in the swine population an increase of the disease in other susceptible species has usually been observed. In cattle, the disease has occurred mainly when there has been close contact with pigs. Strict separate housing of cattle and swine has been effective in preventing AD in cattle. However, on a number of farms this has been difficult to realize. Since AD in cattle has nearly always been lethal, economic losses may be considerable.

There have been only a few reports on vaccination of cattle against AD and these have given contradictory findings as to whether vaccination may be effective (De Leeuw and Tiessink, 1980; Biront et al., 1980). In these reported studies, widely divergent virus doses were used for challenge exposure.
The present study was conducted to investigate whether vaccination of cattle would induce protection against infection with high, moderate or low doses of virulent Aujeszky's disease virus (ADV).

Full text in English.

[1]) CDI - Department of Virology.

On the immunity induced in pigs by conventional vaccines and deletion mutants of Aujeszky's disease virus

J. T. VAN OIRSCHOT[1]), W. G. V. QUINT[1]), A. L. J. GIELKENS[1]), P. W. DE LEEUW[1]) and A. J. M. BERNS[2])

C.E.C. Seminar, Brussel, 1984

Vaccination of pigs against Aujeszky's disease (AD) is common practice in many countries. In general, attenuated AD virus vaccines are more efficacious than inactivated vaccines. In addition, they can be given intranasally and this mode of vaccination induces better protection than parenteral vaccination(s). However, none of the present AD vaccines is capable of conferring complete protection against a challenge with a virulent virus.
Attenuated AD viruses used as vaccines are usually obtained by numerous passages in cell culture. Consequently, (i) in these strains mutations are introduced in an uncontrolled way, and (ii) most attenuated strains contain several variants. The above observations indicate a need for more potent and better defined AD virus vaccines.
Several approaches are possible for the development of new AD virus vaccines. Because (i) attenuated vaccines are basically more efficacious and (ii) the observation that pigs which survive an infection with virulent AD virus are fully protected against challenge 6 weeks later, we have chosen for bio-engineering a 'live' AD virus vaccine, starting from a virulent and highly immunogenic AD wildtype virus. We have constructed hybrid viruses of a virulent and an avirulent strain of AD virus and subsequently assayed for virulence in mice and pigs. A conclusion from this study was that the Us region comprises virulence genes.
Subsequently, deletions were introduced in the Us region of the genome of the virulent strain. The deletion mutants generated were strongly reduced in virulence, and were highly immunogenic in pigs.

Full text in English.

[1]) CDI - Department of Virology.
[2]) Department of Biochemistry, University of Nijmegen.

AVIAN LEUKOSIS
(PROJECT 57)

Identification of avian leukosis virus shedding hens. Comparison of ALV gs-antigen levels in various test samples.

G. F. DE BOER[1]), A. L. J. GIELKENS[1]), H. M. BOERRIGTER[1])
and L. HARTOG[1]).

Avian Pathology, 1984, 13, 321-332

Various materials from two White Leghorn basic breeder flocks were tested by the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), the complement fixation test (CFT) for detection of avian leukosis/sarcoma virus (ALV) group-specific (gs) antigens and the phenotypic mixing test (PMT) to compare the applicability of these techniques for the identification of hens which congenitally excrete exogenous ALV.
The predictive value of each test was evaluated on the basis of association between ALV gs-antigen detection and ALV recovery and congenital virus transmission demonstrable in the hens. In materials from two flocks under study a close correlation was observed between congenital transmission of exogenous ALV to embryos and ALV gs-antigen detection in albumen samples. Results of examinations of vaginal/cloaca swabs and meconium samples were poorly associated with congenital virus excretion.
ALV gs-antigen levels were generally higher in embryos than in albumen samples. Considerable variations in gs-antigen levels were observed in embryos and albumen samples from eggs of individual ALV shedding hens and also within a series of embryos from eggs of one hen.

Full text in English.

[1]) CDI-Department of Virology.

Application of monoclonal antibodies in the avian leukosis virus gs-antigen ELISA.

A. D. M. E. OSTERHAUS[2]) and G. F. DE BOER[2])

Abstract International Symposium on Monoclonal Antibodies 1984: Biological and Clinical Applications, 16-19 oktober, 1984, Florence, Italy.

Five hybridoma cell lines which secrete antibodies to avian leukosis/sarcoma (ALV) group-specific (gs) antigens (*gag* gene products) have been established. The hybrid cells resulted from fusion of P3/X63.Ag8.653 myeloma cells with splenocytes of BALB/c mice which had been immunised with purified avian myeloblastosis virus (AMV).

Screening of supernatants fluids was performed by an indirect double antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (IDAS-ELISA) and the immunoelectroblotting technique. Three hybrid clones secrete monoclonal antibodies (MCA) to 27.000 dalton polypeptides (p27) and two hybridomas produce monoclonal antibody directed to 19.000 dalton phosphoprotein (pp19). All five monoclonal antibodies belong to mouse immunoglobulin isotype IgG_1. MCAs directed to different ALV-p27 epitopes can replace polyclnal rabbit or hamster anti-gs sera in the DAS-ELISA in use for the detection of congenitally ALV shedding hens. In albumen samples a 16- to 32-fold increase of sensitivity of ALV gs-antigen detection was obtained as compared to the DAS-ELISA employing polyclonal sera. Gs-antigens of a purified AMV preparation were detectable up to minimal concentrations of 13 pg/ml.

Full text in English.

[1]) The National Institute of Public Health and Environmental Hygiene, Bilthoven.
[2]) CDI-Department of Virology.

MAREK'S DISEASE
(PROJECT 58)

Protective efficacy of clones of Marek's disease virus strain CVI-988.

G. F. DE BOER[1]), J. E. GROENENDAL[1]), H. L. OEI[2]) and J. M. A. POL[1]).

International Symposium on Marek's Disease, Ithaca, N.Y., U.S.A., 1984, p 56

Marek's disease virus strain CVI-988 vaccines, belonging to serotype 1, provide satisfactory protection and are safe for chickens in the field.
However, in the laboratory a low level of pathogenicity was demonstrated for RIR chickens, which are extremely susceptible to MD. By serial cell culture passages and plaque purification MDV CVI-988 clones were obtained which were innocuous for RIR chickens, but which demonstrated vaccine characteristics similar to current commercial vaccine batches. Comparative 50% protective dose (PD_{50}) assays were performed with three clones at various passage levels during adaptation to chick embryo fibroblasts. One MDV CVI-988 clone was selected, showing at the 59th cell culture passage an improved protective efficacy to MDV K challenge. In addition, this virus clone demonstrated good protective ability to challenge with MDV RB/1B and MDV Tun, two representatives of so-called very virulent MDV strains. The latter strain was recovered from a poultry farm in Tunisia after severe MD losses had been observed in HVT vaccinated chickens.

Full text in English.

[1]) CDI-Department of Virology.
[2]) CDI-Department of Control and Standardization

Studies on the oncogenic properties of various Marek's disease virus strains

J. M. A. POL[1]), G. L. KOK[1]) and G. F. DE BOER[1])

International symposium on Marek's disease; USA: Ithaca, 1984, p. 48.

The oncogenicity of four Marek's disease virus strains was investigated after *in ovo* inoculation of embryonated Cornell line S eggs on day 8 of incubation. After hatching the chickens were observed during 16 weeks. Macroscopic and microscopic examination of dead chickens and chickens killed at the end of the observation period revealed lymphomas in 85% of the chickens after inoculation of virulent GA-5 virus.
The 36th chick embryo fibroblast passage of MDV CVI-988, obtained by further attenuation of a serotype 1 MDV strain of low virulence, caused an endoneural lymphoma in one chicken of 56 (2%).

MDV HPRS-24 belonging to serotype 2 caused an endoneural lymphoma in One chicken and a visceral lymphoma in another chicken of 48 (4%).
MDV SB-1 of serotype 2 was non-oncogenic in this test model. On day 5 after hatching virus was isolated from spleen cells and viral antigen was detected in some lymphoid organs and liver in the virus inoculated groups. No viral antigen was detected after HPRS-24 inoculation although virus recovery from spleen cells was positive and cytolytic infection of the lymphoid organs had taken place.
Histological examination on day 5 after hatching revealed a cytolytic infection of the lymphoid organs and degeneration and necrosis of liver cells. This inflammation of the liver with lymphoid hyperplasia but without lymphoma formation was persistent throughout the 16 weeks observation period for a number of chickens. Lesions were most marked in the SB-1 inoculated group and less in the HPRS-24 and CVI-988 inoculated groups. The virulence of the virus strains and quantitative differences in histological lesions caused by the four virus strains are discussed.

Full text in English.

[1]) CDI - Department of Virology.

LOCAL IMMUNITY

(PROJECT 62)

Use of monoclonal antibodies in virus diagnosis

D. VAN ZAANE[1]

Recent advances in virus diagnosis, Boston: Nijhoff, 1984, p. 145-156

In 1975, Köhler and Milstein discovered as a spin-off result of their fundamental studies on immunoglobulin gene-expression, that lymphocytes can be immortalized by fusion with myeloma cells and thus acquire the ability to grow indefinitely and produce unlimited amounts of highly specific antibody (Köhler and Milstein, 1975). Since then, the production and application of monoclonal antibodies (MCA) has become common practice in many research areas. The enthusiasm and excitement evoked by this discovery was recently put into words by David et al. (1981) who formulated very elegantly that 'the feelings experienced by any avid science fiction enthusiast watching the first astronaut plant his foot firmly on the surface of the moon could not have been dissimilar to those experienced by an immunochemist realizing the meaning of the new application of cell fusion technology presented by Köhler and Milstein'.
Also in virus research, many applications have been described or are under development. However, at present large-scale use of MCAs in diagnostic assays to replace conventional antisera is not yet wide-spread. The reason for this is probably that the production, selection and characterization of MCAs with optimal and reliable properties in diagnostic assays is very time-consuming and can be hindered by many pitfalls. It is the purpose of the present overview to illustrate some of the advantages and disadvantages of the application of MCAs in virus diagnosis. However, many aspects also hold for applications in other fields. (See also reviews by Goding, 1980; Kennett et al., 1980; McMichael and Bastin, 1980; Mitchell, 1981; Oxford, 1982; Rowe, 1980; Scharff et al., 1981; Staines and Lew, 1980).

Full text in English.

[1]) CDI - Department of Virology.

Monoclonal antibodies against bovine immunoglobulins and their use in isotype-specific ELISAs for rotavirus antibody

D. VAN ZAANE[1]) and J. IJZERMAN[1])

Journal of Immunological Methods, 72, 1984, p. 427-441.

Monoclonal antibodies (MCA) against bovine immunoglobulin (BIg) isotypes were produced and characterized.
MCAs were obtained which react specifically with IgG, IgG_1, IgG_2 or IgA while MCAs against IgM showed a partial cross-reaction with affinity purified IgA.

MDV HPRS-24 belonging to serotype 2 caused an endoneural lymphoma in One chicken and a visceral lymphoma in another chicken of 48 (4%).
MDV SB-1 of serotype 2 was non-oncogenic in this test model. On day 5 after hatching virus was isolated from spleen cells and viral antigen was detected in some lymphoid organs and liver in the virus inoculated groups. No viral antigen was detected after HPRS-24 inoculation although virus recovery from spleen cells was positive and cytolytic infection of the lymphoid organs had taken place.
Histological examination on day 5 after hatching revealed a cytolytic infection of the lymphoid organs and degeneration and necrosis of liver cells. This inflammation of the liver with lymphoid hyperplasia but without lymphoma formation was persistent throughout the 16 weeks observation period for a number of chickens. Lesions were most marked in the SB-1 inoculated group and less in the HPRS-24 and CVI-988 inoculated groups. The virulence of the virus strains and quantitative differences in histological lesions caused by the four virus strains are discussed.

Full text in English.

[1]) CDI - Department of Virology.

Use of monoclonal antibodies in virus diagnosis

D. VAN ZAANE[1]

Recent advances in virus diagnosis, Boston: Nijhoff, 1984, p. 145-156

In 1975, Köhler and Milstein discovered as a spin-off result of their fundamental studies on immunoglobulin gene-expression, that lymphocytes can be immortalized by fusion with myeloma cells and thus acquire the ability to grow indefinitely and produce unlimited amounts of highly specific antibody (Köhler and Milstein, 1975). Since then, the production and application of monoclonal antibodies (MCA) has become common practice in many research areas. The enthusiasm and excitement evoked by this discovery was recently put into words by David et al. (1981) who formulated very elegantly that 'the feelings experienced by any avid science fiction enthusiast watching the first astronaut plant his foot firmly on the surface of the moon could not have been dissimilar to those experienced by an immunochemist realizing the meaning of the new application of cell fusion technology presented by Köhler and Milstein'.
Also in virus research, many applications have been described or are under development. However, at present large-scale use of MCAs in diagnostic assays to replace conventional antisera is not yet wide-spread. The reason for this is probably that the production, selection and characterization of MCAs with optimal and reliable properties in diagnostic assays is very time-consuming and can be hindered by many pitfalls. It is the purpose of the present overview to illustrate some of the advantages and disadvantages of the application of MCAs in virus diagnosis. However, many aspects also hold for applications in other fields. (See also reviews by Goding, 1980; Kennett et al., 1980; McMichael and Bastin, 1980; Mitchell, 1981; Oxford, 1982; Rowe, 1980; Scharff et al., 1981; Staines and Lew, 1980).

Full text in English.

[1]) CDI - Department of Virology.

Monoclonal antibodies against bovine immunoglobulins and their use in isotype-specific ELISAs for rotavirus antibody

D. VAN ZAANE[1]) and J. IJZERMAN[1])

Journal of Immunological Methods, 72, 1984, p. 427-441.

Monoclonal antibodies (MCA) against bovine immunoglobulin (BIg) isotypes were produced and characterized.
MCAs were obtained which react specifically with IgG, IgG_1, IgG_2 or IgA while MCAs against IgM showed a partial cross-reaction with affinity purified IgA.

MCAs with optimal characteristics for application in ELISA were selected and used as conjugates in an indirect double antibody sandwich assay (IDAS) and as the capturing antibody in an antibody capture assay (ACA) for the isotype-specific detection of antibodies against rotavirus.
Based on theoretical grounds, experimental analysis of inter- and intraisotype competition in IDAS and ACA, respectively, and a direct comparison of both tests, the IDAS was selected for the detection of IgG[1] and IgG[2] anti-rotavirus antibodies. The ACA was the test of choice for the detection of IgM and IgA anti-rotavirus antibodies. The isotype specificity of these tests relies on the specificity of the MCAs and was confirmed for each test by the observation that samples containing rotavirus antibodies of only 1 particular isotype reacted only in the homologous assay. The MCAs against bovine Ig isotypes and isotype-specific ELISAs were found to be very useful in the study of humoral mucosal immunity in calves infected with rotavirus.

Full text in English.

[1]) CDI - Department of Virology.

Intestinal antibody response after vaccination and infection with rotavirus of calves fed colostrum with or without rotavirus antibody

DICK VAN ZAANE[1]), JOHAN IJZERMAN[1]) and PETER W. DE LEEUW[1])

Veterinary Immunology and Immunopathology, in press

The intestinal and systemic antibody response of calves vaccinated and/or challenged with rotavirus was studied employing isotype-specific ELISAs for the detection of IgG[1], IgG[2], IgM and IgA antibodies to rotavirus. Monoclonal antibodies to bovine immunoglobulin isotypes of proven specificity were used as conjugated or catching antibody.
Five days after oral inoculation (dpi) of a 5-day-old gnotobiotic calf with rotavirus, IgM rotavirus antibodies were excreted in faeces, followed 5 days later by IgA rotavirus antibodies. The increase in IgM rotavirus antibody titre coincided with the inability to detect further rotavirus excretion. Faeces IgM and IgA rotavirus antibody titres fell to low levels within 3 weeks post infection. IgG_1 and IgG_2 rotavirus antibodies were not detected in faecal samples. In serum, antibodies to rotavirus of all four isotypes were detected, starting with IgM at 5 dpi.
Two SPF-calves, which were fed colostrum free of rotavirus antibodies, were vaccinated with a modified live rotavirus vaccine and challenged with virulent rotavirus 6 days later. Upon vaccination, the calves showed an antibody response similar to the response of the infected gnotobiotic calf. Intestinal IgM rotavirus antibodies were excreted before or on the day of challenge and appeared to be associated with protection against challenge infection with virulent virus and rotavirus-induced diarrhoea. In 3 control calves, which were challenged only, the antibody patterns also resembled that of the gnotobiotic calf and again the appearance of IgM rotavirus antibodies coincided with the end of the rotavirus detection period.

Two other groups of 3 SPF-calves were treated similarly, but the calves were fed colostrum with rotavirus antibodies during the first 48 h of life.
These calves excreted passively acquired IgG_1 and IgG_2 rotavirus antibodies in their faeces from 2 to 6 days after birth. After vaccination, no IgM or IgA antibody activity in serum or faeces was detectable. Upon challenge, all calves developed diarrhoea and excreted rotavirus. Seven to 10 days after challenge low levels of IgM rotavirus antibody were detected for a short period. These data indicate that the intestinal antibody response of young calves to an enteric viral infection is associated with the excretion of IgM antibodies, immediately followed by IgA antibodies. This response is absent or diminished in calves with passively acquired specific antibodies which may explain the failure to induce a protective intestinal immune response by oral vaccination with modified live rotavirus of calves fed colostrum containing rotavirus antibodies.

Full text in English.

[1]) CDI - Department of Virology.

MAEDI/VISNA
(PROJECT 65)

Maedi-visna control in sheep. II. Half-yearly serological testing with culling of positive ewes and progeny.

D. J. HOUWERS[1]), J. SCHAAKE Jr.[1]) and G. F. DE BOER[1])

Veterinary Microbiology, 9, 1984, p. 445-451

In 1979 a field trial was started to study the feasibility of maedi-visna control in sheep by half-yearly serological testing (by ELISA) with culling of sero-positive ewes and their progeny. In 13 commercial flocks, with a mean initial incidence of serological reactors of 17%, the sero-positive ewes and all their progeny, those of preceding years included, were culled after each half-yearly test. The percentage of sero-positive sheep decreased gradually and at the end of the second year, at the 5th test, all flocks were sero-negative. Also the 6th and 7th test did not yield sero-positive sheep. At the 8th test, however, 3 sero-positive ewes were detected in one of the flocks. A definite conclusion as to the source of infection could not be drawn. The following flock test was negative. In 2 other commercial flocks, which had a mean initial incidence of sero-positive sheep of 53%, those sero-positive and only their suckling lambs were culled. Here too, a gradual decrease in the incidence of sero-positive sheep was observed at the 2nd and 3rd test, but at the 4th test a sharp increase occurred. The programme was continued and a decrease followed until 0% was reached at the 7th test (end of third year). Age analysis of the sero-positive sheep which caused this peak revealed that the majority had been born before the start of the trial. This suggests that a 'second wave' of sero-positive sheep may be prevented and a quicker result obtained if progeny of preceding years are culled as well.
Apart from 1 flock (mentioned above), all flocks remained sero-negative after reaching 0% until the end of the observation period in December 1982.
These results show that maedi-visna can be controlled by serological testing and culling of positive sheep. However, the present observation period of 4 years is still too short to conclude that complete eradication of the virus from the flocks has been achieved. Furthermore it appears that simultaneous culling of all progeny is preferable.

Full text in English.

[1]) CDI-Department of Virology.

A preliminary report on the occurrence of maedi-visna in sheep in Morocco

L. MAHIN[1]), M. CHADLI[1]) and D. J. HOUWERS[2])

The Veterinary Quarterly, vol. 6, 1984, p. 104

A small scale serological survey for antibodies to maedi-visna virus among 13 flocks of sheep in Morocco revealed the infection in one flock. Infection appeared to be related with imported sheep. In addition, two abattoir surveys yielded, 0.1% lungs with gross and histological lesions suggestive of maedi.

Full text in English.

[1]) Agricultural and Veterinary Institute, Hassan II, Rabat, Morocco.
[2]) CDI-Department of Virology.

A chronic indurative mastitis in sheep related with maedi/visna virus infection

E. J. VAN DER MOLEN[1]), U. VECHT[2]) and D. J. HOUWERS[3])

Veterinary Quarterly, in press

Mastitis in sheep husbandry is a well-known problem. It is regarded as one of the most important reasons for culling of ewes. Different studies revealed mastitis lesions in 12 to 50 percent of culled ewes. Bacterial mastitis in sheep can be distinguished in two clinical entities; an acute form and a chronic one. Most of the sheep, which survive an acute bacterial mastitis develop a chronic inflammation resulting in permanent damage to the mammary tissue, which is clinically presented by diffuse or nodular induration. These clinical features are mostly present in one udder half and usually encountered when selecting ewes before tupping. Under field conditions bacterial mastitis in sheep is of low morbidity, relatively high mortality and seldomly occurs as a flock problem.
In recent years flocks were brought to our attention with the complaints of a long existing indurative mastitis or insufficient growth of the lambs during the preweaning period. This was observed during several consecutive years. After excluding the common causes of insufficient growth it was tentatively concluded that the milk yield of the ewes was not sufficient, due to an indurative mastitis. Bacteriological examinations with respect to mastitis remained grossly negative and mycoplasmas could not be isolated from these field cases.
Cross et al. were the first, who described udder lesions in experimental animals suffering from ovine progressive pneumonia (opp). They noted histological similarity with opp lesions and suggested that the udder lesions were caused by opp virus infection.

Full text in English.

[1]) CDI - Department of Herd Health and Pathology.
[2]) CDI - Department of Bacteriology.
[3]) CDI - Department of Virology.

Global survey of serological evidence of caprine arthritis-encephalitis virus infection

D. S. ADAMS[1]), R. E. OLIVER[2]), E. AMEGHINO[3]), J. C. DeMARTINI[4]), D. W. VERWOERD[5]), D. J. HOUWERS[6]), S. WAGHELA[7]), J. R. GORHAM[1]), B. HYLLSETH[8]), M. DAWSON[9]), F. J. TRIGO[10]), T. C. McGUIRE[11])

Veterinary Record, 1984, 115: 493-495.

Using caprine arthritis-encephalitis virus antigen in the agar gel immunodiffusion test, 3729 serum samples from goats in over 112 locations around the world were tested for precipitating antibodies. Over 90 per cent of the 1265 positive samples came from Canada, France, Norway, Switzerland and the U.S.A., all of which had 65 per cent reactors or greater. Fiji, Great Britain, Kenya, Mexico, New Zealand and Peru had fewer than 10 per cent positive samples; the majority of these could be traced to importations of goats from countries where there was a high occurrence of precipitating antibody, Somalia, Sudan and South Africa had no reactors among 306 samples. No reactors were found among 1116 samples from domestic and indigenous goats which were known to have had no contact with imported goats from countries which had a high occurrence.

Full text in English.

[1]) Animal Disease Research Unit, Washington 99 164, USA
[2]) Animal Health Reference Laboratory, Upper Hutt, New Zealand
[3]) Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Peru
[4]) Colorado State University, Fort Collins, Colorado, USA
[5]) Veterinary Research Institute, Onderstepoort, South Africa
[6]) CDI-Department of Virology.
[7]) Veterinary Research Laboratory, Kabete, Kenya
[8]) The Norwegian College of Veterinary Medicine, Oslo, Norway
[9]) Central Veterinary Laboratory, Weybridge, Surrey, England
[10]) Cuidad Universitaria, Mexico
[11]) Washington State University, Washington, USA

Preparation and evaluation of antigens used in serological tests for caprine syncytial retrovirus antibody in sheep and goat sera

W. COACKLEY[1]), V. W. SMITH[1]) and D. J. HOUWERS[2])

Veterinary Microbiology 9, 1984: 581-586

Methods used to prepare antigens from caprine syncytial retrovirus (CSR) for use in the agarose gel immunodiffusion test (AGID) or an indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) are described. Caprine and ovine sera were tested for antibody to CSR using the AGID test and ELISA incorporating a caprine system (CSR antigen and rabbit anti-goat IgG) or an ovine system (maedi-visna virus antigen and rabbit anti-sheep IgG). Good correlation was achieved in the results of the 3 tests when sera were devoid of antibody or were strongly positive. Variations in the results on weakly positive sera were considered to be more a matter of interpretation than due to basic differences in the reagents employed.

Full text in English.

[1]) Animal Health Laboratory, Australia.
[2]) CDI-Department of Virology.

Contribution to the control of Aleutian disease

J. HAAGSMA[1])

Proceedings 3rd International Scientific Congress in Fur Animal Production, Versailles, 1984

This report gives the results of research on the horizontal transmission of Aleutian Disease. In four experimentally infected mink the excretion of AD virus in saliva and faeces was examined from three days post infectionem until death. ADV was demonstrated for the first time 15 days after infection. In all positive samples the ADV titre was determined. The results show that the excretion was influenced by the virulence of the ADV-strain, the dose of infection and the genetic type of the infected mink. The susceptibility of mink to oral infection was examined in order to be able to interpret the significance of the excretion for the spreading of AD on mink farms. Finally, the susceptibility to ADV and the excretion of virus after experimental infection was examined in blue foxes and fitches because these animals are often bred with mink on the same farm.

Full text in English.

[1]) CDI - Department of Bacteriology.

A comparison of two porcine parvovirus vaccines under field conditions

P. W. DE LEEUW[1]), H. J. F. ROUWETTE[2]), G. W. M. VAN GOLSTEIN BROUWERS[3]) and C. J. KUIPER[2]).

Proceedings of the International Pig Veterinary Society, Belgium: Ghent, 1984, p. 14.

The PPV vaccines employed in this study did not cause undesirable local or systemic reactions after vaccination. The serological response in general was poor. This might be partly due to maternal antibodies still present at the time of vaccination. On the other hand a considerable proportion of gilts that had been found negative twice before vaccination did not mount a measurable serum antibody response. This was observed in both vaccine groups. Despite the weak serological effect of the vaccines they both had a marked effect on the reproductive performance of ilts in the face of a PPV outbreak.
No preference for one of the two vaccines employed can be expressed. Both are likely to be beneficial when used correctly in a planned and if possible serology-controlled programme.

Full text in English.

[1]) CDI-Department of Virology.
[2]) Nieuw Dalland, Venray, the Netherlands.
[3]) Regional Health Service Limburg, Heythuysen, the Netherlands.

RESEARCH ON DISINFECTANTS FOR VETERINARY USE
(PROJECT 83)

A study on the efficacy of disinfectants against Anthrax Spores
Een onderzoek naar de werkzaamheid van ontsmettingsmiddelen ten opzichte van miltvuursporen

H. H. LENSING[1]) en H. L. OEI[1])

Tijdschr. Diergeneeskunde 109, 1984, 557-563

The activity of disinfectants with regard to spores of *Bacillus anthracis* was determined in a suspension test.
Creoline (10%) and also several other disinfectants for veterinary use showed no activity against spores of *B. anthracis*.
Natriumdichloorisocyanuraat-dihydrate (2400 ppm active chlorine) and peracetic acid 0.25% demonstrated after 30 minutes of exposures at 20°C in the presence of 4% horseserum a significant sporicidal effect. Under the same conditions formaldehyde 4% and glutaraldehyde 2% were also found to be sporicidal but only after 2 hours of exposure.

Full text in Dutch.

[1]) CDI - Department of Control and Standardization.

DIAGNOSIS OF DISEASES OF CATTLE IN THE FIELD
(PROJECT 87)

An outbreak of babesiosis in Eastern Flevoland
Een uitbraak van Babesiosis in Oostelijk Flevoland

B. E. C. SCHREUDER[1]) en C. VAN WIJK[2])

Tijdschrift voor Diergeneeskunde, 109, 1984, p. 549-553

An outbreak of babesiosis, with *Babesia divergens* as the causative agent, occurred in a herd in one of the more recently reclaimed polders involving at least 12 animals. Pasture investigation by blanket-dragging revealed a population of *Ixodes ricinus* ticks, living in and near the approximately fifteen-year-old afforestation.
The differential diagnosis and possible routes by which the disease is introduced, are discussed.

Full text in Dutch.

[1]) CDI - Department of Herd Health and Pathology.
[2]) Practitioner at Biddinghuizen

DIAGNOSIS OF DISEASES OF PIGS IN THE FIELD
(PROJECT 88)

Tumors and tumor-like lesions in the genitalia of sows

J. P. W. M. AKKERMANS[1]) and W. J. VAN BEUSEKOM[2])

Veterinary Quarterly 6; 1984, p. 90-96

Of a total of 1445 sows, tumors were detected in the uterus of 11 animals and in the cervix/vagina of 1 animal.
Tumor-like lesions were detected in the ovary of 56 animals. The incidence of tumors was higher than that mentioned in the literature, possibly because of the relatively high age of the sows (mean parity of 6.8) and the accuracy of investigation. Several tumors would not have been detected during routine slaughter examination.
The uterine tumors were diagnosed as leiomyoma (6), fibroma (3), cyst-adenoma (1) and fibro-leiomyona (1).
The cervical/vaginal tumor appeared to be a fibroma.
The ovarian lesions could not be satisfactorily classified. They consisted of connective tissue, blood vessels, and granulosa cells, which were present in variable quantities in different ovaries and in different sides of the same ovary. Sows with tumors were older than the mean determined age at slaughter (parity 6.8). Sows with uterine and cervical/vaginal tumors had a parity of 11.6; sows with ovarian lesions had a parity of 9.0.
Sows with uterine- or a cervical/vaginal tumor were often slaughtered for infertility reasons.

Full text in English.

[1]) Animal Health Service, Gouda, the Netherlands.
[2]) CDI.

Peroneal paralysis and necrosis of the distal parts of the hind-limbs in piglets. Due to a faulty injection technique.
Peroneusparalyse en necrose van de ondervoet bij biggen: een gevolg van een foutieve injectietechniek

L. VAN LEENGOED[1]) en E. J. VAN DER MOLEN[1])

Tijdschrift voor Diergeneeskunde 109; 1984, p. 587-588

Necrosis of the distal parts of the hind-limbs was observed in well over one-hundred piglets on a pig-breeding farm. The lesions were localized solely on the hind-limbs and unilateral in the great majority of cases. The clinical features of unilateral peroneal paralysis were observed in piglets from the sixth day of life. Sensory innervation distal to the hock was frequently absent in the leg involved.
Both the mechanical injury on locomotion and the gnawing by pen mates of the piglets involved were regarded as causes of the extensive necrosis of the distal parts of the hind-limbs.
The primary cause of the above lesions was found to in a faulty technique used in injection in the gluteus muscles of the piglets.

Full text in Dutch.

[1]) CDI - Department of Herd Health and Pathology.

DIAGNOSIS OF DISEASES OF OTHER ANIMALS IN THE FIELD
(PROJECT 92)

Morbid-anatomical findings in nineteen cats with idiopathic cardiomyopathy.
Patholoog anatomische bevindingen bij negentien katten met idiopathische cardiomyopathie

T. G. KIMMAN[1]) en E. J. VAN DER MOLEN[1])

Tijdschrift voor Diergeneeskunde 109; 1984. p. 132-141

The pathological findings in nineteen cats with idiopathic cardiomyopathy are reported. The disease is marked by a usually short clinical course, often without the specific symptoms of heart failure. Some cats die suddenly.
The heart usually shows dilatation, occasionally accompanied by hypertrophy.
Histological findings include various degrees of degeneration, inflammation and fibrosis. Histological changes are absent in some cases. The pathogenesis is discussed. The aetiology has not been elucidated so far.

Full text in Dutch.

[1]) CDI - Department of Herd Health and Pathology.

THE DEVELOPMENT OF LABORATORY TECHNIQUES
(PROJECT 94)

Rapid diagnosis of herpes virus field isolates with colloidal gold immune electron microscopy: I. Differentiation between human herpes simplex viruses type 1 and type 2 using monoclonal antibodies. II. Typing of 'Equine Herpes Virus Abortion'

J. VREESWIJK[1]), P. DE KREEK[1]) and F. WAGENAAR[1])

Proceedings of the Dutch Society of Electron Microscopy and the Royal Microscopical Society, december 1984, p. 46-47.

Recently two new electron microscopic techniques were developed for rapid virus diagnosis: (1) Colloidal Gold Decoration techniques (CGD); (2) Solid Phase Immune Electron Microscopy (SPIEM). In the presence of sufficient high virus titres CGD can be used in subclassification (serotyping) of unknown viruses within an extremely short test procedure of 3 to 4 hours. In addition, titres and specificity of sera or monoclonal antibodies can be assessed by this technique. The SPIEM technique with a sensitivity in the range of ELISA procedures takes up to 2 days. Viruses can be picked up by specific antibodies bound to a protein A layer stuck to the EM grids.
Herpes simplex viruses type 1 and 2 and two monoclonal antibodies were obtained from the RIVM at Bilthoven (Dr. J. G. Kapsenberg). The antibodies were tested for specificity to both virus types using goat-anti-mouse Ig colloidal gold as a marker. One monoclonal antibody was specific for HSV type 1, while the other reacted with both types. After one passage in tissue culture (taking about 2 days), 25 field samples were subsequently tested in a neutralization assay and with the CGD technique (blind test). Both techniques gave completely identical results. As compared with neutralization (taking 3-4 days) the CGD results were obtained almost instantly.
The equine herpes virus type 1 (EHV-1) is an important cause of both respiratory tract infections and of abortion in horses. Two subtypes of the virus are recognized, of which the more virulent type is the cause of abortion.
Differentiation of these two herpes serotypes was the aim of this study.
Field samples were analyzed with a neutralization assay and CGD using a rabbit antiserum against the virulent type. A direct labelling procedure taking 1-2 hours was developed using gold particles coated with IgG. Neutralization and CGD results were identical. In addition, labelling could be carried out on the original tissue homogenates. Other EHV serotypes have been recognized as well.

Full text in English.

[1]) CDI - Department of Virology.

Immunogold labelling technique used in rapid virus diagnosis combined with electron microscopy

J. VREESWIJK[1]) and F. WAGENAAR[1])

Proceedings of the 25th Dutch Federation Meeting 1984 of Medical Scientific Societies

Several techniques are available to test stool samples, body fluids, tissue culture media and tissue homogenates for the presence of viruses. Most frequently used are ELISA, IFT, and electron microscopic (negative staining) techniques. In case of sufficient high virus titre electron microscopy has the advantage that, based on virus morphology, diagnosis can be carried out very quickly (within minutes) with a minimum of sample material. Sensitivity can be increased by screening virus-antibody complexes obtained after incubating the samples with specific sera. In addition, electron microscopy is used in cases of obscure ELISA results. For instance, when virus-antibody complexes are present in the sample, they remain undetected by routine ELISA techniques.
In our laboratory we developed a technique based on the immunogold marker system which considerably increased the possible usefulness of electron microscopy in viral immunology and diagnosis. Colloidal gold particles (5-25 nm diameter) are coated with a protein layer consisting of purified specific antibodies, Protein A or avidin. Virus particles which become bound to the grid first, can be immunolabelled in a direct or indirect procedure followed by standard negative staining. Double labelling is possible by a combination of small (coated with antibody 1) and large (antibody 2) gold particles. In contrast to IFT and ELISA one is able to observe the specific reaction of the gold marker with the envelope or if the virus has become disrupted, with the inner viral structures (core and nucleoprotein). In summary, this new technique can be used in: testing cross-reactivity of sera, virus subclassification (serotype), localization of virus antigens, analysis of the specific reaction of monoclonal antibodies with viral components and in combination with thin sectioning fine localization of antigens within the viral structures and cell compartments.

Full text in English.

[1]) CDI - Department of Virology.

Detection of rotavirus and 'corona-like virus' in stool samples of infected pigs by solid phase immune electron microscopy (SPIEM). Comparison of SPIEM with direct electron microscopy and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

J. CORNELISSEN[1]), J. VREESWIJK[1]), K. WEERDMEESTER[1]) and A. P. K. M. I. VAN NIEUWSTADT[1])

Proceedings of the Dutch Society of Electron Microscopy and the Royal Microscopical Society, December 1984

Rotavirus and coronavirus infections in pigs have been associated with recurrent outbreaks of diarrhoea. The role of these agents has been proved by inoculation of faeces samples containing the agent into gnotobiotic or colostrum deprived animals. Many of the viruses primarily found by EM of faeces samples have not yet been cultivated in celcultures (for instance porcine coronavirus 3 = corona-like virus). Therefore, direct electron microscopic examination of faecal material remains the standard diagnostic technique for intestinal infections.
The trapping of viruses on EM grids coated with specific antiserum via protein A (solid phase immune electron microscopy or SPIEM) increases the number of virions that adhere to the grids. With SPIEM, absorbation of cellular debris is greatly diminished, increasing the sensitivity of the EM method for diagnosis. Diagnosis of porcine coronavirus 3 and rotavirus infections was facilitated by the use of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA-IDAS variant). The results need confirmation by EM. Trapping of rotavirus particles in SPIEM led to detection of particles in a 50-fold higher dilution of a stool sample as compared with standard EM comprising a low speed centrifugation step to detect the particles in the cellular debris. An indirect ELISA (IDAS) was applied for the examination of daily stool samples of young pigs that were examined in parallel by SPIEM. The results of both methods coincide fairly well. However, some samples were scored positive in SPIEM and negative in ELISA. SPIEM of the corona-like virus present in the colon content of gnotobiotic pigs showed good preservation of peplomere morphology. However, SPIEM of stool samples was hampered by an ill-defined peplomere morphology. Colloidal gold was introduced as a label to identify 'naked' particles in specimens as corona viruses.

Full text in English.

[1]) CDI - Department of Virology.

SYNTHETIC PEPTIDE VACCINES
(PROJECT 100)

Immunological responses against synthetic peptides are less specific than against whole virus.

S. J. BARTELING[1]), D. VOSKAMP[1]), R. H. MELOEN[1]) and H. M. GEYSEN[2]).

Proceedings of the Sixth International Congress of Virology, Japan: Sendai, 1984, pp. 265.

Five peptides that were reactive with anti-whole virus antibodies by multiple antigenic peptide probe (MAPP) analysis (Geysen et al., 1984) of VP_1 of FMDV of serotypes O_1, A_{10} and C_1 respectively, were synthesized by solid phase methods.
To make coupling at either end possible a cysteine and a lysine residue were added at the N- and C-terminus respectively (if not present in the parent sequence).
For all three serotypes the peptides were from corresponding areas of VP_1.
O_1-146-154: (C) G D L Q V L A Q K A_{10}-144-150: (C) G D L G S I A (K) C_1-142-148: (C) G D L A H L T (K) with in the primary epitopes a conserved triplet (GDL).
Specific antipeptide activity was induced in rabbits by using carrier proteins and coupling reagents that differ in the primary and secundary vaccination. Most peptides were able to induce neutralizing activity in all cases anti-virus reactivity was obtained if tested in an ELISA.
Although with some of the antipeptide sera cross-reactivity was observed with other serotype virus and peptide (if coupled to solid support or to a non-recognizable carrier); neutralization activity was highly specific.
Contrary to the antipeptide sera the anti-whole virus sera recognized homologous peptides and virus only.

Full text in English.

[1]) CDI-Department of Virology.
[2]) Commonwealth Serum Laboratories, Melbourne, Australia.

Small peptides induce antibodies with a sequence and structural requirement for binding antigen comparable to antibodies raised against the native protein.

H. MARIO GEYSEN[1]), SIMON J. BARTELING[2]) and ROB H. MELOEN[2]).

Proceedings of the National Academy of Sciences, in press.

Systematic syntheses of overlapping peptides was used to locate equivalent immunogenic epitopes on the major coat protein of three foot-and-mouth disease virus strains. Peptide synthesis was further used to determine which amino acid residues in

each epitope are important for the specificity of antisera raised against the whole virus. Results are presented to demonstrate that the specificity of the antibody paratope for its epitope depends on structure as well as sequence. Antisera were raised against the chemically synthesized peptide corresponding to each epitope. Depending on the immunizing peptide, the antisera showed greater or lesser specificity for the homologous virus and for peptide in an antibody binding assay.
Anti-virus sera demonstrated a greater specificity for the homologous peptide than did the anti-peptide sera. Two of the three peptides were able to induce neutralizing antibodies against the homologous virus. Anti-peptide sera were also reacted with the complete single residue replacement set of peptides for each epitope, and the results used to infer the specificity of the antibodies present. The cross-reactions observed for the anti-peptide sera were readily explained in terms of the antibody specificities determined to be present. The findings also suggest that the diversity of antibodies raised against small peptides is limited, and is determined by the immune system. A similar limited response to the native protein was observed, which may account for the high frequency with which anti-peptide sera react with the native homologous protein.

Full text in English.

[1]) Commonwealth Serum Laboratories, Melbourne, Australia
[2]) CDI-Department of Virology.

Use of peptide synthesis to probe viral antigens for epitopes to a resolution of a single amino acid

H. M. GEYSEN[1]), R. H. MELOEN[2]) and S. J. BARTELING[2])

Proc. Natl. Acad. Sci. USA. vol 81, pp. 3998-4002, 1984.

A procedure is described for rapid concurrent synthesis on solid supports of hundreds of peptides, of sufficient purity to react in an enzyme-linked immunosorbent assay. Interaction of synthesized peptides with antibodies is then easily detected without removing them from the support. In this manner an immunogenic epitope of the immunologically important coat protein of foot-and-mouth disease virus (type 0[1]) is located with a resolution of seven amino acids, corresponding to amino acids 146-152 of that protein. Then, a complete replacement set of peptides in which all 20 amino acids were substituted in turn at every position within the epitope was synthesized, and the particular amino acids conferring specificity for the reaction with antibody were determined. It was found that the leucine residues at position 148 and 151 were essential for reaction with antisera raised against intact virus. A lesser contribution was derived from the glutamine and alanine residues at positions 149 and 152, respectively. Aside from the practical significance for locating and examining epitopes at high resolution, these findings may lead to better understanding of the basis of antigen-antibody interaction and antibody specificity.

Full text in English.

[1]) Commonwealth Serum Laboratories, Melbourne, Australia.
[2]) CDI - Department of Virology.

OTHER INVESTIGATIONS

Chronic intoxication of piglets with furazolidone? Chronische furazolidon vergiftiging van biggen? Praktijkproblemen en juridische gevolgen

L. P. JAGER[1]), A. S. J. P. A. M. VAN MIERT[2]) en L. H. M. VROOMEN[3])

Tijdschr. Diergeneeskunde, deel 109, 1984, pp. 922-927

Long-term treatment (eighteen months) with a medicated feed containing 400 ppm of furazolidone gave rise to side-effects on a pig farm on which the animals were affected with persistent oedema disease. These side-effects disappeared on discontinuation of the medication. In view of this suspected case of chronic furazolidone intoxication the court formulated several questions for a panel of experts. The questions and the replies given are stated.

Full text in Dutch.

[1]) CDI - Department of Control and Standardization, Pharmacology Section.
[2]) State University of Utrecht: Dept. of Veterinary Pharmacology.
[3]) RIKILT, Wageningen, the Netherlands.

Pharmacology and toxicology of furazolidone and carbadox, a study of the literature. Farmacologie en toxicologie van furazolidon en carbadox; een literatuuronderzoek

A. S. J. P. A. M. VAN MIERT[1]), L. H. M. VROOMEN[2]) en L. P. JAGER[3])

Tijdschr., Diergeneesk. 109, 1984, p. 928-933

A literature search on furazolidone in pigs was made in order to be able to answer a number of questions raised by a court regarding possible furazolidone intoxidation. The following review of the literature is the result of this study. Attention is also paid to the residual toxicology of this drug. As one of the court's questions concerned carbadox alone and combined with furazolidone, a brief review of the pharmacology of this drug is included.

Full text in Dutch.

[1]) Faculty of Veterinary Pharmacology, Pharmacy and Toxicology, Utrecht.
[2]) RIKILT, Wageningen.
[3]) CDI - Department of Control and Standardization, Pharmacology Section.

Protective effects of Prostaglandins against ulcerogenic activity of indomethacin during different stages of erosion development in rat stomach. Role of acid and bicarbonate secretion

A. A. VAN KOLFSCHOTEN[1]), F. HAGELEN[2]), F. C. HILLEN[2]), L. P. JAGER[3]), P. ZANDBERG[4]) and J. VAN NOORDWIJK[2])

Digestive Diseases and Sciences, vol 28, 1983, p. 1127-1136

Prostaglandin E^2 (PGE^2) and $PGF^2\mu$, decreased the gastric erosive activity of orally administered indomethacin in a dose-dependent manner, when given as a continuous intravenous
infusion in the conscious rat. PGE^2 protected both during the initial stage of erosion induction and during the later outgrowth to larger erosions. Moreover PGE^2 was able to stop the eroding process at any stage as long as the infusion continued. Both PGs were protective only in doses which also reduced the histamine-stimulated acid secretion. PGE^2 protected the stomach against indomethacin-induced erosions even in the presence of exogenously administered acid.
An infusion of PGE^2 stimulated the secretion of and bicarbonate in the stomach during some minutes but had no effect during prolonged infusion.
These results suggest that, although effects on secretion of acid and bicarbonate were found, these effects cannot be the (only) explanation for the cytoprotective effects observed. Furthermore the protective effect of PGE^2 is not confined to any specific stage of the development of indomethacininduced gastric injury.

Full text in English.

[1]) Duphar, Weesp, the Netherlands.
[2]) National Institute of Public Health and Environmental Hygiene, Bilthoven.
[3]) CDI - Department of Control and Standardization, Pharmacology Section.
[4]) Organon International B.V., Oss.

Electrophysiological and pharmacological characterization of the NANC nerve mediated inhibition of the circular muscle layer of the opossum esophagus

L. P. JAGER[1]), J. JURY[2]) and E. E. DANIEL[2])

In: Gastro-intestinal motility: Proceedings of the 9th Int. Symp. on Gastro-intestinal motility held in Aix-en-Provence, Ed. Cl. Roman, M.T.P. press, Lancaster, 1984, pp. 9-16.

Field stimulation of strips from the circular muscle of the esophagus of the North American opossum induced a transient nerve mediated hyperpolarization of the smooth muscle cell membrane (IJP), followed by an 'off' depolarization, usually accompanied by spike activity and muscle contraction.

Optimum stimulus parameters were 0.1 to 0.2 ms pulse duration and 20 pps for 0.3 s. Tetrodotoxin and scorpion venom abolished responses at these parameters. These responses were unaffected by atropine, guanethidine or indomethacin in effective doses.
ATP, ADP, AMP and adenosine had no consistent effects on membrane potential or on the IJP in concentrations up to 10^{-4}M. VIP from 10^{-8}M upward caused enhanced 'off' depolarization and initiated spontaneous activity. Manipulation of external potassium ion concentration and of membrane potential effected the IJP amplitude consistent with its origin from increased conductance towards potassium ions. Double sucrose gap studies showed that during the IJP the membrane resistance decreased.
A conditioning hyperpolarization of more than about 40 mV reversed the IJP. This reversal potential of the IJP was dependent on the potassium concentration of the super fusion medium. Thus the IJP seems to be due to a selective increase in the permeability of the smooth muscle cell membrane towards potassium ions. Apamine up to 10^{-5}M did not affect the membrane potential or the IJP. Tetra-ethylammonium (TEA) 1 - 3 × 10^{-2}M induced a depolarization of muscle cell membrane and increased the membrane resistance and increased the IJP. These results suggest that the potassium channels of the smooth muscle cell membrane in this preparation are apamine-insensitive and probably voltage-regulated. However, the potassium channels opened by the inhibitory neurotransmitter are qualitatively different from those functioning at rest. Like TEA, quinine (10^{-3}M) induced a depolarization at rest, but unlike TEA it did block the IJP. This effect may be due to an interference of quinine with the conductance change underlying the IJP or with the impulse propagation by the intramural nerves. The pharmacological properties of the potassium channels in the opossum esophagus employed by the inhibitory transmitter are unlike those of other smooth muscle preparations of the gastrointestinal tract.

Full text in English.

[1]) CDI - Department of Control and Standardization, Pharmacology Section.
[2]) McMaster University Health Science Centre, Hamilton, Ontario, Canada.

Protection by Paracetamol against various gastric irritants in the rat

A. A. VAN KOLFSCHOTEN[1]), P. ZANDBERG[2]), L. P. JAGER[3]) and J. VAN NOORDWIJK[4])

Toxicology and applied Pharmacology 69, 1983, p. 37-42

Four nonsteroid anti-inflammatory drugs (NSAID), indomethacin, phenylbutazone, ibuprofen, and glafenine, caused erosions in the rat stomach in a dose-dependent manner. Paracetamol, which has been shown to protect against the gastric erosive activity of aspirin, reduced the gastric toxicity of indomethacin but was ineffective against the erosive activity of phenylbutazone and glafenine. Only the high erosion score of a large dose of ibuprofen was partly decreased by paracetamol. The gastric damaging

effects of necrotizing concentrations of ethanol and sodium hydroxide were strongly reduced by paracetamol, but the erosive activity of hydrochloric acid was only slightly decreased by paracetamol. Thus, although paracetamol protected the gastric mucosa against various noxious agents, this drug was not able to protect against every type of gastric damage. Paracetamol might be protective by stimulating the biosynthesis of prostaglandins in the stomach wall.

Full text in English.

[1]) Duphar, Weesp, the Netherlands.
[2]) Organon International B.V., Oss
[3]) CDI, Dept. of Control and Standardization, Pharmacology Section.
[4]) National Institute of Public Health and Environmental Hygiene, Bilthoven.

Other Publications

Borgsteede, F.H.M.
Ziekten van de vos die van belang zijn voor mens en hond. De Nederlandse Jager 89, 1984, 338-339

Borgsteede, F.H.M.
Experimental studies with a resistant and a susceptible strain of *Haemonchus contortus* in sheep.
Abstract EMOP IV. Ed. E. Tümbay (et al.), Bilgeman Publ. Houses; Turkey: Izmir, 1984.

Borgsteede, F.H.M.
Voorkomen en bestrijden van maagdarmworminfecties bij rundvee. Bedrijfsontwikkeling 15, 1984, 853-855

Haagsma, J.
Laboratory investigations of botulism in wild birds. Avian botulism: An International Perspective. Section V: Laboratory Investigations. In press.

Haagsma, J.
Het voorkomen van botulismus op veehouderijbedrijven. Bedrijfsontwikkeling 15, 1984, 299-300

Haagsma, J.
Kunnen waterstaatkundige maatregelen botulismus bij watervogels voorkomen? Vogels, 4, 1984, 110

Haagsma, J.
Rabies. Ziekteverschijnselen en diagnostiek bij de vos en preventie bij mens en hond. De Nederlandse Jager 89, 1984, 398-399

Haagsma, J.
Pseudomoniasis bij nertsen. De Pelsdierenfokker 34, 1984, 270-271

Houwers, D.J.
Een (ongewoon) geval van ecthyma bij geiten. Tijdschrift voor Diergeneeskunde 109, 1984, 37

Houwers, D.J.
Sheep pulmonary adenomatosis. Veterinary Record 114, 1984, 23

Jager, L.P., J. Jury and E.E. Daniels
The mediation of non-adrenergic neutral inhibition of the opossum esophargus. Archives International Pharmacodynamie et de Therapie 264, 1983, 328.

Moerman, A.
Control of calf diarrhoea by management. B.V.A. congress, Lancaster 1983.
Irish Veterinary New, June 1984, 13-19

Oirschot, J.T. van
De ziekte van Aujeszky. Bedrijfsontwikkeling, 15, 1984, 319-322

Oirschot, J.T. van
De neurologische vorm van EHV1 bij het paard. Tijdschrift voor Diergeneeskunde 109, 1984, 94

Smit, Th.
Kan een eend een jager vellen? De Nederlandse Jager 89, 1984, 6-7

Terpstra, C.
Differential diagnosis of African swine fever and hog cholera in ASF-free countries. Proc. FAO/CEC seminar, Rome, 1984. In press.

Terpstra, W.J; and Z. Bercovich
Melkerskoorts, de leptospirose van veehouders. Nederlands Tijdschrift voor Geneeskunde 128, 1984, 1040-1043

Projectenlijst

Nadere informatie over afzonderlijke projecten is op verzoek verkrijgbaar

Projectnr.:	*Titel:*
01	Invloed voeding zeug op splayleg – *Nabuurs,* Van der Molen.
02	Diarree bij biggen rond de speenleeftijd incl. slingerziekte – *Nabuurs,* De Leeuw, Jager, Van der Molen, Van Zijderveld.
03	Neonatale kalverdiarree – *De Leeuw,* Moerman, Van Zijderveld,
04	Mastitis bij het schaap – Schreuder, Vecht.
05	Luchtwegaandoeningen bij jongvee – *De Leeuw,* Straver, Zimmer, Kimman, Kamp, Ter Laak.
06	Opsporen en bestuderen van oorzaken, welke aanleiding geven tot ziekte en sterfte bij in het wild levende vogels (vogelsterfte) – *Smit,* Over, Spierenburg, Haagsma, Ter Laak, Borgsteede.
07	Diagnostiek en onderzoek ten dienste van de import van papegaaiachtige vogels – *Smit,* De Boer, Ter Laak.
08	Veterinaire begeleiding van landbouwhuisdieren van in Oostelijk Flevoland gelegen instituten en proefbedrijven – *Talmon,* Moerman, Schreuder, Zimmer.
11	Ontwikkeling van residu-analyse methoden i.v.m. het aantonen van vergiftigingen door bestrijdingsmiddelen en andere stoffen – Baars, Spierenburg.
12	Toxicologisch onderzoek van praktijkgevallen en van bedrijfs- en milieu-toxicologische problemen – Baars, Spierenburg, Over, Van Leeuwen.
14	Mycobacteriële infecties en onderzoek van sensitinen – *Haagsma,* Bercovich.
15	Een onderzoek naar botulismus, speciaal in verband met het optreden bij watervogels – *Haagsma,* Over, Smit.
16	Anaerobe infecties anders dan botulismus – *Haagsma,* Nabuurs.
17	Differentiatie van streptococcen en staphylococcen – *Vecht,* Ter Laak.

18 Algemeen bacteriologisch en taxonomisch onderzoek ten behoeve van dierziekteproblemen
– *Ter Laak.*

19 Mycoplasma-infecties
– *Ter Laak.*

20 Haemophilus-infecties varken
– Kamp, *Van Leengoed.*

21 Atrofische rhinitis bij het varken
– *Kamp,* Kimman, Van Leengoed, Van der Heijden, Van Leeuwen, Wirahadiredja.

22 Aviaire pasteurellose
– Kamp, *Van Vugt.*

23 Colibacillosis bij biggen
– *Van Zijderveld,* Nabuurs, Wirahadiredja.

24 Diagnostiek, oorzaak en bestrijding van mastitis bij het rund
– *Vecht,* Ter Laak, Kimman.

26 Immuniteit mastitis
– *Vecht,* Bianchi.

27 Etiologie en transmissie van Wrang – Een praktijkgericht onderzoek
– *Vecht,* Over.

30 Brucellose
– *Bercovich,* Haagsma, Ter Laak.

31 Leptospirose
– *Bercovich,* Bokhout.

32 Onderzoek naar methoden voor (de verbetering van) de produkten van adjuvantia en evaluatie van hun biologische activiteit
– *Bokhout,* Van der Heijden, Nabuurs, Van Vugt.

33 Onderzoek naar de inductie, regulatie en expressie van de mucosale immuunrespons, gericht op preventie en genezing van dierziekten
– *Bokhout,* Bianchi, Van der Heijden, Wirahadiredja.

34 Onderzoek naar de invloed van adjuvans-toediening op de immuunrespons, gericht op preventie en therapie van dierziekten
– *Bokhout,* Bianchi, Van der Heijden, Wirahadiredja.

35 Pathogenese van parasitaire infecties bij rund en schaap
– *Wetzlar,* Borgsteede, Hendriks, Over.

36 Systematisch epidemiologisch onderzoek m.b.t. helminthen
– *Over,* Borgsteede, Hendriks.

37 Ascaris infecties bij runderen –
Borgsteede.

38 Effectiviteit van anthelmintica
– *Hendriks,* Borgsteede, Over, Wetzlar.

39 Resistentie tegen anthelmintica
– *Borgsteede.*

40 Entomologische problemen
– *Over.*

41 Helminthen van beschermde zoogdieren
– Borgsteede.

42 Worminfecties bij paarden
– Borgsteede.

43 Psoroptesschurft bij het schaap
– *Over,* Smith.

45 Produktie van mond- en klauwzeer vaccins
– Barteling.

46 Onderzoek m.b.t. mond- en klauwzeer vaccins en vaccincontrole
– Barteling, Terpstra.

47 Epidemiologisch onderzoek over mond- en klauwzeer
– Terpstra.

49 Varkenspest (onderzoek en diagnostiek)
– *Terpstra,* Wensvoort,

50 Virusinfecties bij varkens (andere dan pest), waaronder SVD
– Terpstra, Van Oirschot, Pol.

51 Virusinfecties bij runderen
– Kimman, De Leeuw, Pol, Straver, Westenbrink.

52 Virusinfecties bij schapen (andere dan zwoegerziekte)
– *Houwers,* Terpstra.

53 Virusinfecties bij paarden
– *Van Oirschot,* Pol, Gielkens.

54 Ziekte van Aujeszky; diagnostiek, epizoötiologie, vaccinatie
– *Van Oirschot,* Pol, Gielkens, Van Zaane, Terpstra, Quint, Vreeswijk.

55 Ontwikkeling van diagnostische technieken voor virale diarree bij varkens
– *Terpstra,* Van Nieuwstadt, Meloen, Pol, Vreeswijk.

57 Aviaire leukose
– *De Boer,* Van Vloten, Pol, Koch.

58 Ziekte van Marek
– *De Boer,* Van Vloten, Gielkens, Pol, Koch.

59 Enzoötische leukose bij het rund
– *De Boer,* Koch.

60 Infectieuze bronchitis
– *De Boer,* Van Vloten, Vreeswijk, Pol, Gielkens, Koch.

62 Lokale immuniteit
– *Van Zaane,* Van Oirschot, Pol, De Leeuw.

64 Onderzoek m.b.t. BHV_1
– De Leeuw, Straver.

65 Zwoegerziekte
– *Houwers,* Van der Molen, Vecht.

66 Onderzoek naar het voorkomen van chlamydia-infecties bij het rund
– Bercovich, *Houwers,* Van der Molen.

67 Aleutian disease
– Bokhout, Haagsma, De Leeuw, Westenbrink, Kimman.

68 Rabiesdiagnostiek
– *Haagsma,* Ter Laak.

69 Porcine parvovirusinfecties
– *De Leeuw,* Van Leengoed.

70 Bovine virus diarree
– De Leeuw, Terpstra, Straver, Westenbrink.

71 Produktie van virologische diagnostica en begeleiding van het gebruik
– *De Leeuw,* Straver, Westenbrink, De Boer.

74 Onderzoek in verband met verbetering van bestaande en ontwikkeling van nieuwe biologische produkten
– *Van Vugt,* Haagsma e.a.

75 Bereiding van veterinaire biologische preparaten
– Van Vugt, Haagsma.

76 Ontwikkelingsonderzoek ten behoeve van de kwaliteitscontrole van CDI-produkten
– *Van Vugt,* Oei.

77 Routinematige kwaliteitscontrole van CDI-produkten en van proefdieren.

79 Produktie van SPF, MDF en kiemvrij proefdiermateriaal
– *De Vrey.*

81 Rijkskwaliteitscontrole van veterinair immunobiologische produkten
– *Lensing*, Oei.

82 Ontwikkelings- en standaardisatieonderzoek t.b.v. de rijkskwaliteitscontrole van veterinair immunobiologische produkten
– *Lensing*, Oei.

83 Rijkskwaliteitscontrole en ontwikkelings- en standaardisatieonderzoek van ontsmettingsmiddelen voor veterinair gebruik
– *Lensing*, Oei.

84 Rijkskwaliteitscontrole van veterinair farmaceutische produkten
– *Lensing*, Jager.

85 Rijkskwaliteitscontrole van insecticiden voor veterinair gebruik
– *Lensing*, Hendriks, Jager.

86 Onderzoek van het mechanisme waarmee soya-pepton diarree bij biggen induceert
– *Jager*, Lensing.

87 Diagnostiek van ziekten bij runderen t.b.v. de praktijk.

88 Diagnostiek van ziekten bij varkens t.b.v. de praktijk.

89 Diagnostiek van ziekten bij kleine herkauwers t.b.v. de praktijk.

90 Diagnostiek van ziekten bij pluimvee t.b.v. de praktijk
– De Boer, Moormann, Smit.

91 Diagnostiek van ziekten bij pelsdieren t.b.v. de praktijk
– *Kimman*, e.a.

92 Diagnostiek van ziekten bij overige dieren t.b.v. de praktijk.

93 Onderzoek t.a.v. export van vee.

94 Onderzoek gericht op de ontwikkeling van laboratoriumtechnieken
– Vreeswijk, Van Leeuwen.

95 Participatie in projecten van andere instituten.

96 Onderzoek, niet verantwoord in andere projecten.

98 Samenwerkingsproject Pakistan
– Bool, e.a.

99 Diversen ontwikkelingssamenwerking
– Bool, e.a.

100 Synthetische peptiden vaccins.

Produktenlijst

I. Sera

Miltvuurserum voor herkauwer, varken.

II. Vaccins

MKZ-vaccin voor herkauwer, trivalent type A, O en C.
MKZ-vaccin voor varken, monovalent type O en C.
Miltvuurvaccin voor paard, herkauwer, varken.
Pseudomonas aeruginosa-vaccin voor nertsen.

III. Sensitinen

Bovine tuberculine PPD (5000 TU per 0,1 ml).
Bovine tuberculine PPD (2000 TU per 0,1 ml).
Aviaire tuberculine PPD (2000 TU per 0,1 ml).
Johnine PPD (1,5 mg per ml).
Malleïne PPD (1,0 mg per ml).

IV. Voor laboratoriumtoepassing:

a) *Antigenen*
Brucella abortus ringtest-antigeen.
Brucella abortus langzaam antigeen.
Brucella abortus snel antigeen.
Campylobacter fetus-antigeen.
Salmonella typhimurium en S. dublin H-antigeen.
Leptospira guidae (L. tarassovi)-antigeen
Fasciola hepatica-antigeen.
Parvovirus-antigeen.

b) *Ingrediënten voor complementbindingsreacties*
Brucella abortus CBR-antigeen.
Para-t.b.c.-antigeen.
Vlekziekte-antigeen.
Positief en negatief controleserum voor Brucella abortus c.q. para-t.b.c.
Cavia-complement.
Haemolytische amboceptor.
Schapebloed in Alseveroplossing.
Veronalbuffer.

c) *Conjugaten en diagnostische sera*
Aujeszky-conjugaat.
BVD-conjugaat.
IBR-conjugaat.
Parvovirus-conjugaat.
RSB-conjugaat.
TGE-conjugaat.
Testserum dysenterie (Doyle) voor IFT.
Runderplasma voor clumpingtest.
Positief en negatief Parvovirus-serum.

d) *Diversen*
Gedefibrineerd runderbloed.
Geïnactiveerd normaal runderserum.
Rundererythrocyten met kristalviolet (voor H.E.T.-medium).
Staphylococcen bèta-toxine (voor 1 liter H.E.T.-medium).