Dienst Landbouwkundig Onderzoek
Centraal Diergeneeskundig Instituut

Jaarverslag 1991

cdi-dlo

CDI-DLO – Postbus 65 – 8200 AB Lelystad

Inhoud

pag.

1991 5

Organisatie, bestuur en directie 11

Lelystad virus, de verwekker van abortus blauw
C. Terpstra, G. Wensvoort, J.M.A. Pol 13

Peptiden met hoge biologische activiteiten
M. Hage-van Noort, W.C. Puijk, H.H. Plasman, D. Kuperus, W.M.M. Schaaper, N.C.J.M. Beekman, J.A. Grootegoed, R.H. Meloen 23

Nieuwe methode versnelt ontwikkeling van vaccins en geneesmiddelen
R.H. Meloen, J.A. Lenstra 27

Leptospirose
A.J.M. Olyhoek 29

Cytolysinen van *Actinobacillus pleuropneumoniae*
R. Jansen, J. Briaire, E. Kamp, M. Smits 37

Onderzoek naar aetiologie en pathogenese van diarree bij gespeende biggen
M.J.A. Nabuurs 42

Meerjarenplan 1992-1997
B.A. Bokhout 51

Publikaties 56

Produktenlijst 159

Projectenlijst 161

Foto: RU Utrecht

De Staatssecretaris van het Ministerie van Landbouw, Natuurbeheer en Visserij, drs J.D. Gabor reikt de Schimmel-Viruly prijs uit aan dr. G. Wensvoort (l.).

1991

Ondanks het feit dat het Nederland in economische zin redelijk goed gaat, is er een sterke wens het overheidsapparaat af te slanken, taken geheel af te stoten of taken op enige afstand van de overheid te laten uitvoeren.
Deze trend werd in het jaar 1991 geëffectueerd door de krimp en bezuinigingsmaatregelen van de Grote Efficiency Operatie en de Tussenbalans-operatie van de Rijksoverheid. Deze zogenaamde GEO en TUBA hebben veel onrust binnen de gehele Dienst Landbouwkundig Onderzoek (DLO) veroorzaakt en ook binnen het CDI-DLO waren de effecten merkbaar.
Daar bovenop kwamen er bij de eigen DLO-organisatie grote structurele tekorten aan het licht waar een oplossing voor moest worden gevonden.
Dit betekende voor de gehele DLO-organisatie een te realiseren krimp van 150-170 formatieplaatsen, terwijl er in de materiële begroting een korting van f 25 miljoen moest worden doorgevoerd. Dit hield een teruggang van bijna 15% in.
Aan alle directeuren binnen het Ministerie van Landbouw, Natuurbeheer en Visserij (LNV) en dus ook van de DLO-instituutsdirecteuren werd gevraagd "posterioriteiten" in de organisatie aan te geven. Dit heeft tot nogal wat onrust in het instituut geleid, mede gezien de zeer lange procedure. Uiteindelijk lijkt de schade in formatieplaatsen voor het CDI-DLO en voor de gehele Dierlijke Produktiesector beperkt te blijven, hoewel de precieze uitwerking nog steeds niet vast staat.
Samenhangend met de grote bezuinigingsoperatie is ook de discussie op gang gekomen over mogelijkheden om het Dierlijke Produktie Onderzoek binnen DLO in één instituut te concentreren.
Sinds september 1991 is daar door vele medewerkers van de 4 betrokken instituten aan gewerkt. In het komende jaar zullen definitieve keuzes gemaakt moeten worden.

PRODUKTEN

In 1991 kwam de mond- en klauwzeer vaccin produktieactiviteit tot een einde. Het wegvallen van deze belangrijke inkomstenbron heeft voor veel financiële onzekerheid ten aanzien van onze toekomst gezorgd. De weggevallen inkomsten zijn in 1991 grotendeels gecompenseerd door het Ministerie van LNV en voor 1992 en later zullen de nadelige effecten door de gehele DLO-organisatie worden gedragen.
De opbrengst van andere CDI-DLO produkten was in 1991 boven verwachting.
Naast therapeutische, preventieve en diagnostische produkten zijn ook diagnostische verrichtingen belangrijke CDI-DLO produkten.

Een betrekkelijk nieuwe categorie van CDI-DLO produkten wordt gevormd door patenten. Gebleken is dat goede patenten het instituut veel geld kosten, maar ook veel geld waard kunnen zijn. Ze zijn dat in het kader van de onderhandelingen met industrieën, aangezien de interesse voor een samenwerkingsovereenkomst voor een niet onaanzienlijk deel bepaald wordt door de verkregen patentpositie. Ook de royalty regeling, die bedongen kan worden als er interessante produkten uit zo'n samenwerkingsovereenkomst komen, hangt in belangrijke mate af van de patentpositie. Daarnaast kan ook een patent op zichzelf te gelde worden gemaakt. Als voorbeeld uit het afgelopen jaar kan gewezen worden op het patent op een onderdeel van het Aids-virus dat in 1991 aan drie farmaceutische bedrijven verkocht kon worden.

De ontwikkeling van het kwaliteitsbeheersingssysteem ten behoeve van het diagnostisch onderzoek kwam goed op gang en zal in 1992 resulteren in Sterlab certificering.

De afdeling Controle en Standaardisatie is evenals in 1989 en 1990 van beleidswege onder erg grote druk gezet om de beoordeling van de zogenaamde "oude middelen" tijdig afgerond te krijgen. De werksituatie die hierdoor is ontstaan, is voor de medewerkers eigenlijk niet acceptabel. In 1992 zullen goede afspraken met de verantwoordelijke beleidsinstanties dienen te worden gemaakt over het takenpakket en de taakinvulling in de toekomst.

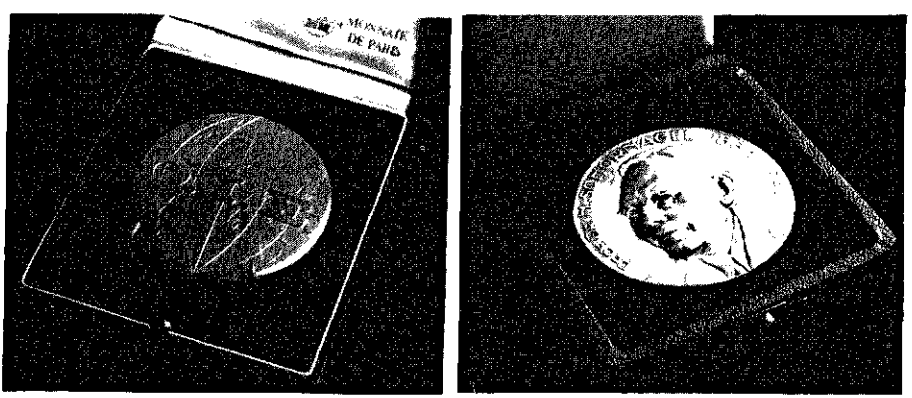
PERSOONLIJKE HOOGTEPUNTEN

W.P.A. Posthumus promoveerde op 24 januari tot doctor in de diergeneeskunde, M.J.A. Nabuurs behaalde deze graad op 25 april.
Dr. H.J. Over werd op 30 april door Hare Majesteit de Koningin benoemd tot Officier in de Orde van Oranje Nassau.
Ook qua wetenschappelijke onderscheidingen was 1991 een bijzonder jaar. Door de gezamenlijke hoogleraren van de Faculteit der Diergeneeskunde is besloten de Schimmel-Viruly prijs, een prijs die eens in de zes jaar wordt toegekend aan een veelbelovend jong onderzoeker op het terrein van de diergeneeskunde, toe te kennen aan dr. G. Wensvoort.
Tevens is besloten om de Schornagel medaille, een eerbewijs aan een onderzoeker op diergeneeskundig gebied met een opvallende, langjarige en brede staat van dienst, toe te kennen aan prof. dr. J.G. van Bekkum. Het feit dat beide onderscheidingen bij CDI-ers terecht komen zegt ook iets over de kwaliteit van het gehele instituut.
Internationaal werden de verdiensten van dr. Van Bekkum nog eens onderstreept doordat het Office International des Epizooties te Parijs hem de Gold Medal van deze organisatie verleende.

De tweejaarlijkse "interne" prijs, de dr. J.G. van Bekkumprijs over 1989-1990 werd toegekend en uitgereikt aan dr. R.H. Meloen wegens zijn bijdragen aan de ontwikkeling van de PEPSCAN-techniek tot een zeer efficiënt, innovatief en krachtig onderzoekinstrument.

PROJECTMATIG WERKEN

Een van de actiepunten voor 1991 was het invoeren van een verbeterde vorm van het projectmatig werken (PMW), waarmee beoogd wordt de planning en kwaliteitsbewaking van het onderzoek te verbeteren en de betrokkenheid van veel onderzoekers met dit proces te vergroten.
Dr. D. van Zaane, de directeur onderzoek, heeft samen met de onderzoekers en met bijzondere steun van dr. Ph.J. van der Heijden "PMW bij het CDI" geïntroduceerd en goed werkzaam gemaakt. Het lijkt er op dat deze werkwijze door grote delen van het instituut niet alleen geaccepteerd is, maar ook gedragen wordt. Het was dit jaar de eerste keer in de CDI-DLO-geschiedenis dat alle projecten in de loop van het jaar aan de hand van verslagen besproken zijn en dat nieuwe afspraken zijn vastgelegd over de onderzoekplannen en de inzet voor het komende jaar.
Tijdens de zogenaamde beslismomenten is een aantal projecten afgebouwd, ingeperkt, bijgesteld en is een aantal nieuwe projecten gestart.



Nationale erkenning: de Schornagel legpenning (r.) én internationale erkenning: de Gold Medal van het OIE.
Beide onderscheidingen werden in 1991 toegekend aan Prof. dr. J.G. van Bekkum, oud-directeur onderzoek van het CDI.

ONDERZOEK IN 1991

Op onderzoekgebied was 1991 een bijzonder goed jaar voor het CDI-DLO. Twee ontdekkingen betekenden belangrijke wetenschappelijke primeurs voor het CDI-DLO met grote maatschappelijke consequenties. Het ontdekken van het 'Lelystad virus' als de verwekker van 'Abortus Blauw' en het opsporen van de actieve plaats op het molecuul van het Follikel Stimulerend Hormoon, kortweg FSH.

Een grote groep CDI-DLO-medewerkers heeft onder bezielende leiding van dr. C. Terpstra, dr. G. Wensvoort en dr. J.M.A. Pol in zeer korte tijd het nieuwe Lelystad virus opgespoord, in kweek gebracht, er besmettingsproeven mee uitgevoerd en een diagnostische techniek ontwikkeld. Ook zijn er al grote vorderingen gemaakt met de moleculair biologische karakterisering van het virus. Zowel qua patentpositie als qua wetenschappelijke presentatie is de CDI-DLO- primeur goed vastgelegd. Een geheel nieuw en breed onderzoekproject is op basis hiervan geformuleerd en een zeer belangrijke externe financiering voor 1992 en later is zeker gesteld.
De betekenis van dit werk voor de nationale en ook internationale positie van het CDI-DLO is uitermate groot.

De groep onderzoekers rond dr. R.H. Meloen is er in 1991 in geslaagd op het grote FSH-molecuul één uit vier domeinen van het eiwit samengesteld peptide te construeren, dat de werking van het gehele molecuul nabootst. Ook in dit geval is qua patentpositie als qua wetenschappelijke presentatie de primeur goed vastgelegd. Een nieuw en breed onderzoekterrein ligt open en over ruime externe financiering voor 1992 en later zijn de onderhandelingen vrijwel afgerond.

Een aantal andere belangrijke onderzoekprestaties zijn evenzeer vermeldenswaard:

In het kader van het *Actinobacillus pleuropneumoniae* (APP)-project zijn drie cytolysines geïdentificeerd en gekarakteriseerd. Het verwerven van nieuwe inzichten over de door APP veroorzaakte longontsteking bij varkens wordt hierdoor mogelijk. De CDI-DLO-projectgroep die hieraan werkt verkeert internationaal gezien in een voortrekkerspositie.

Om te komen tot een verbetering in de diagnostiek van *Salmonella enteritidis* zijn specifieke monoclonale antilichamen bereid en is een specifieke ELISA ontwikkeld. Voor de diagnostiek zal dit belangrijke consequenties hebben.

Door een nieuwe opzet van de database over schadelijke effecten van dierpathogenen in mest zijn op korte termijn enkele rapporten ten behoeve van beleidsinstanties vervaardigd.

Het Bovine Herpes Virus I (BHVI) project heeft een conventioneel geattenueerde stam opgeleverd die tot een effectief serologisch herkenbaar vaccin kan worden verwerkt. Ook het onderzoekdeel dat gericht is op een moleculair biologisch geconstrueerd deletievaccin verloopt voorspoedig.

In het kader van het Leptospirose project is met behulp van de PCR-techniek de uitscheiding van de bacterie door runderen in de urine in beeld gebracht. Een éénmalige behandeling met streptomycine blijkt de uitscheiding direct en langdurig stop te zetten. Dit moet als een onverwacht gunstig resultaat worden aangemerkt.
Het werk aan een serologisch herkenbaar varkenspestvaccin, waarvoor de Veterinaire Dienst en het Produktschap voor Vee en Vlees extra steun hebben verstrekt, is in 1991 zeer voorspoedig verlopen. De genetisch informatie van het virus is ontraadseld en virale eiwitten kunnen worden geproduceerd. Deze vorderingen zijn zowel van belang voor vaccinontwikkeling als voor diagnostiek.

In het kader van het Aujeszky-project is in het kader van het sterk fundamentele onderzoek een belangrijke, niet beoogde vinding gedaan. Met behulp van genetisch veranderde virussen werd een nieuw principe ontdekt over de spreiding van dit virus in het doeldier. Deze vinding kan een belangrijke aanzet zijn tot de ontwikkeling van een nieuwe generatie, niet spreidende en daarom veiliger vaccins. De betekenis van fundamenteel onderzoek voor het werk van morgen wordt zo weer eens onderstreept.

In het afgelopen jaar werd zoals gezegd de produktie van het MKZ-vaccin beeindigd. Wel werd er nog een noodvoorraad voor toekomstig gebruik bij eventuele calamiteiten geproduceerd.
Op MKZ gebied breekt er een nieuwe tijd aan met een ongewisse toekomst. Het CDI-DLO is evenwel aangewezen als Europees referentie instituut, belast met de controle op antigenen en vaccins. Hierdoor kunnen de bijzondere accomodaties van het High-containment gebouw Virologie voor de toekomst nuttig in een Europese context gebruikt worden.

VERZELFSTANDIGING

Besloten is dat ook binnen het Ministerie van LNV een aantal diensten verzelfstandigd dienen te worden. Een van deze diensten is de Dienst Landbouwkundig Onderzoek. Een technische projectgroep die het verzelfstandigingsproces moet voorbereiden is ingesteld. De projectgroep zal

werken onder supervisie van een werkgroep die op korte termijn met haar werkzaamheden zal beginnen. Het is de bedoeling dat de medewerkers binnen de verzelfstandigde organisatie wel een status houden waardoor de positie binnen het Algemeen Burgerlijk Pensioenfonds is gegarandeerd.
Het verzelfstandigingsproces zal met de nodige veranderingen gepaard gaan, maar het zal ook nieuwe kansen inhouden. Het zal er zeker toe leiden dat de slagvaardigheid van de organisatie groter wordt.

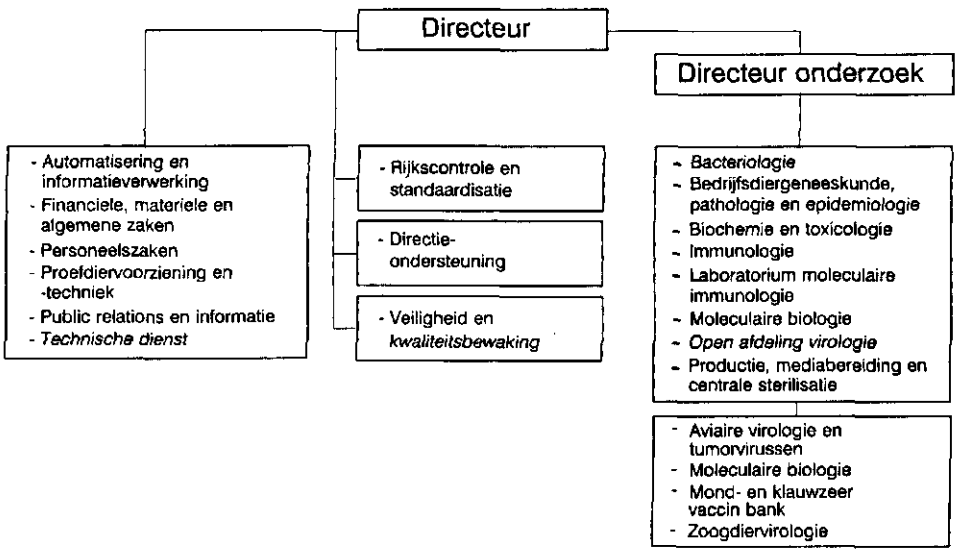
MEERJARENPLAN 1992-1997

Er is een breed gedragen Meerjarenplan-CDI opgesteld. In dit plan is de koers van het instituut voor de komende jaren duidelijk uitgezet.
Onder voorzitterschap van drs. B.A. Bokhout is hieraan door de Stuurgroep Meerjarenplan, door werkgroepen en door vele anderen in het instituut gewerkt. Tijdens de Nieuwjaarsreceptie 1992 kon het Meerjarenplan ten doop worden gehouden. Het moge naast een koersbepaling voor de komende jaren ook de nodige duidelijkheid en openheid verschaffen, niet alleen voor alle medewerkers, maar ook voor de "gebruikers" van CDI-DLO-onderzoek en -diensten. Elders in dit jaarverslag wordt uitgebreid op het Meerjarenplan ingegaan.

Prof. dr. C.J.G. Wensing,
Directeur CDI-DLO.

Organisatie

In 1991 was het DLO-Centraal Diergeneeskundig Instituut volgens onderstaand schema georganiseerd:



Bestuur

In 1991 was de samenstelling van het bestuur van de Stichting Centraal Diergeneeskundig Instituut als volgt:

J. de Veer *voorzitter*	Landbouwschap
Dr. P.W. de Leeuw *ondervoorzitter*	Stichting Gezondheidszorg voor Dieren
Drs. C.C.J.M. van der Meijs *secretaris*	Ministerie van Landbouw, Natuurbeheer en Visserij

Bestuursleden:

Prof. dr. S.G. van den Bergh	Faculteit der Diergeneeskunde
Dr. J.J. Geene	Koninklijke Nederlandse Maatschappij voor Diergeneeskunde
Prof. dr. J. Huisman	Ministerie van Welzijn, Volksgezondheid en Cultuur
Ir. T. van Ingen	Ministerie van Landbouw, Natuurbeheer en Visserij
B.J. Warmelink	Landbouwschap

Adviserende bestuursleden:

K.P.A.J. Boonen	Landbouwschap
Ir. M. Heuver	Dienst Landbouwkundig Onderzoek
Drs. J. Staman	Nationale Raad voor Landbouwkundig Onderzoek
vacature	Nationale Raad voor Landbouwkundig Onderzoek (namens dr. ir. A.P. Verkaik)

Directie

De directie van het DLO-Centraal Diergeneeskundig Instituut bestond in 1991 uit:

Prof. dr. C.J.G. Wensing	- directeur
Dr. D. van Zaane	- directeur onderzoek

LELYSTAD VIRUS, DE VERWEKKER VAN ABORTUS BLAUW

C. Terpstra[1], G. Wensvoort[1], J.M.A. Pol[2]

Medio januari 1991 werd de Nederlandse varkenshouderij opgeschrikt door een nieuwe ziekte onder fokzeugen en biggen. Vooral in de varkensdichte gebieden greep de ziekte snel om zich heen en eind maart had deze zich over het gehele land verspreid.

Inleiding

De ziekte werd bij zeugen gekenmerkt door een verminderde eetlust, lusteloosheid en reproductiestoornissen: abortus, vroeggeboorte, geboorte van zwakke, dode en soms gemummificeerde biggen. Een klein percentage van de zieke zeugen vertoonde een voorbijgaande blauwe verkleuring van de oren, buik of vulva en op enkele bedrijven stierven plotseling één of meer zeugen. De symptomen bij biggen varieerden sterk met de leeftijd. Algehele zwakte en bleekheid, een bemoeilijkte ademhaling, beven, ataxiën en paresis in de achterhand werden waargenomen bij pasgeboren biggen. Daarbij kon op het hoogtepunt van een uitbraak de uitval oplopen tot 80 % in de eerste 2 levensweken en tot 20 % over de periode tot de speenleeftijd. Na het spenen en in de mestperiode verliep de infectie veelal subklinisch. De symptomen vertoonden grote overeenkomst met die van "mystery swine disease", een ziekte met een tot dan onbekende aetiologie, die sinds 1987 in de Verenigde Staten en sinds 1988 in Canada voorkomt.

In samenwerking met de Regionale Gezondheidsdiensten en de Faculteit voor Diergeneeskunde werd een grootschalig onderzoek gestart met als eerste doel de oorzaak van de ziekte op te sporen. Daartoe bezochten dierenartsen van de Gezondheidsdiensten bedrijven die waren besmet met abortus blauw en selecteerden biggen en zeugen in een acuut stadium van de ziekte voor het nemen van monsters. Na 4-6 weken werd van dezelfde zeugen een tweede bloedmonster genomen. Zieke biggen en bloedmonsters werden naar het CDI-DLO gestuurd voor laboratoriumonderzoek. Ook werden zieke zeugen aangekocht voor transmissieproeven.

1) *CDI-DLO Afdeling Zoogdiervirologie*
2) *CDI-DLO Afdeling Bedrijfsdiergeneeskunde, Pathologie & Epidemiologie*

Isolatie van het agens

De onderzoekmonsters waren afkomstig van vier groepen varkens:

Groep 1: monsters van zieke, 2 -10 dagen oude, biggen uit de praktijk.
Groep 2: monsters van zieke zeugen uit de praktijk.
Groep 3: monsters van SPF biggen die experimenteel waren besmet door contact met zeugen uit groep 2.
Groep 4: monsters van SPF biggen ingespoten met bloed van zeugen uit groep 2.

Vriescoupes van organen van biggen uit groep 1 werden in de immunofluorescentietest onderzocht tegen het virus van klassieke- en Afrikaanse varkenspest, Aujeszky, porcine parvo en varkensinfluenza en *Chlamydia psittaci.* Alle coupes waren negatief.

Voor virusisolatie werden vijf verschillende celcultures beënt met orgaansuspensies van 20 biggen uit groep 1. De cultures werden dagelijks beoordeeld op cytopathologische effecten (CPE) en ingevroren als 50-70 % van de cellen CPE vertoonden of na 5-10 dagen kweken. Het gevriesdooide materiaal werd nog 1-2 keer doorgeënt. Ook werden gepoolde orgaansuspensies onderzocht in 9-12 dagen oude kippe-embryo's. Van de zeugen uit groep 2 werden tevens mycoplasma isolaties ingezet.
Eénmaal werd encephalomyocarditis virus geïsoleerd, tweemaal een porcine enterovirus, resp. behorende tot serotype 2 en 7, en vijf maal een mycoplasma. Deze werden geïdentificeerd als *Acholeplasma laidlawii* (1x), *Mycoplasma hyosynoviae* (3x) en *Mycoplasma hyopneumoniae* (1x).

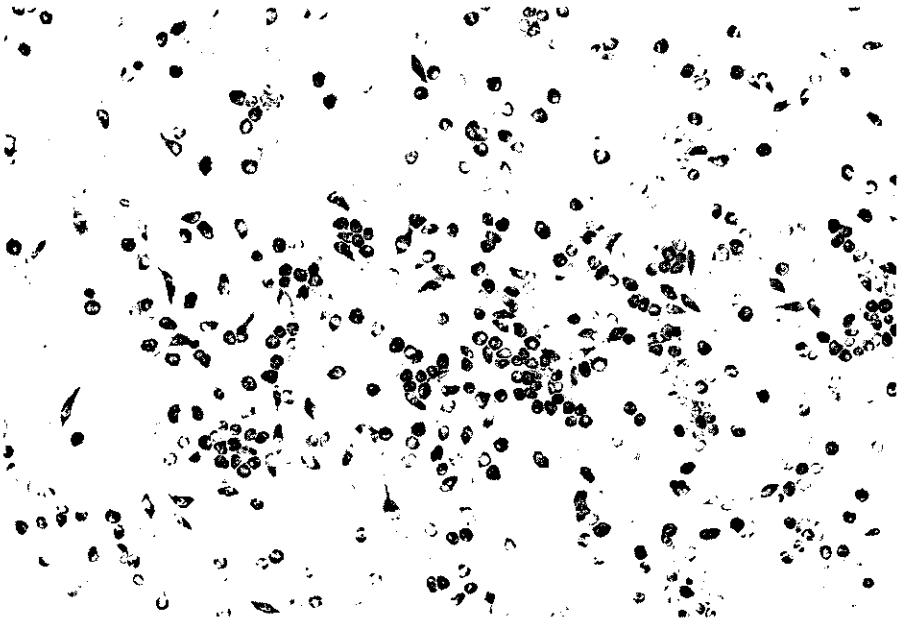
Al deze isolaten bleken toevalsbevindingen te zijn. Daarentegen werd uit 16 van de 20 biggen uit groep 1 en uit 41 van de 63 zeugen uit groep 2 een tot dan onbekend agens geïsoleerd. Dit agens, aanvankelijk Lelystad agens genoemd, werd alleen in varkenslongmacrofagen aangetoond.
De gepaarde zeugensera uit groep 2 werden onderzocht op antilichamen tegen een scala van varkensvirussen, waaronder de eerder genoemde isolaten (tabel 1).

Neutraliserende antilichamen tegen Lelystad agens werden niet gevonden. Echter 75 % (123/165) van de zeugen, op 23 van de 26 verdachte bedrijven, vertoonden in de immunoperoxidase monolayer assay (IPMA) een seroconversie tegen dit agens (figuur 1). Voor de andere virussen werd geen duidelijk serologisch patroon gevonden.
Op grond van bovenstaande waarnemingen werd het geïsoleerde agens in direct verband gebracht met abortus blauw.

Tabel 1. Onderzoek op antilichamen van gepaarde sera uit de praktijk van zeugen verdacht van abortus blauw

Testen[1] en virussen[2]	Aantal zeugen				Aantal bedrijven met seroconversie/ totaal
	negatief[3]	positief[4]	seroconversie[5]	totaal	
HAR					
HEV	19	77	4	100	4/14
H_1N_1	41	48	10	99	6/14
H_3N_2	29	62	9	100	5/14
ELISA					
ADV	97	55	9	161	7/26
PPV	16	131	11	158	6/26
BVDV	140	1	0	141	0/26
VPV	165	0	0	165	0/26
SNT					
EMCV	15	88	2	105	2/16
EMCVi	29	74	3	106	2/16
PEV2	0	144	6	150	5/26
PEV2i	0	138	8	146	6/26
PEV7	2	90	4	96	4/14
PEV7i	*1*	*136*	*10*	*147*	*8/26*
LV	*69*	*0*	*0*	*69*	*0/11*
IPMA					
LV	15	27	123	165	23/26

1)Testen: HAR, haemagglutinatie remming test; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; SNT, serum neutralisatie test; IPMA, immunoperoxidase monolayer assay.
2)Virussen: HEV, haemagglutinating encefalomyelitis virus; H_1 N_1 en H_3 N_2, varkensinfluenza virus type H_1 N_1 en H_3 N_2; ADV, Aujeszky disease virus; PPV, porcine parvovirus; BVDV, bovine virusdiarree virus; VPV, varkenspestvirus; EMCV, encefalo-myocarditis virus; EMCVi, *isolaat uit dit onderzoek*; *PEV2 en PEV7 porcine enterovirus type 2 en 7*; PEV2i en *PEV7i, isolaten uit dit onderzoek*; LV, *Lelystad virus*.
3)Negatief: eerste serummonster negatief en het tweede negatief of minder dan een 4-voudige titerstijging.
4)Positief: eerste serummonster positief en het tweede vertoonde een minder dan 4-voudige *titerstijging*.
5)Seroconversie: zeugen waarvan het tweede serummonster tenminste een 4-voudige titerstijging vertoonde in vergelijking met het eerste monster.



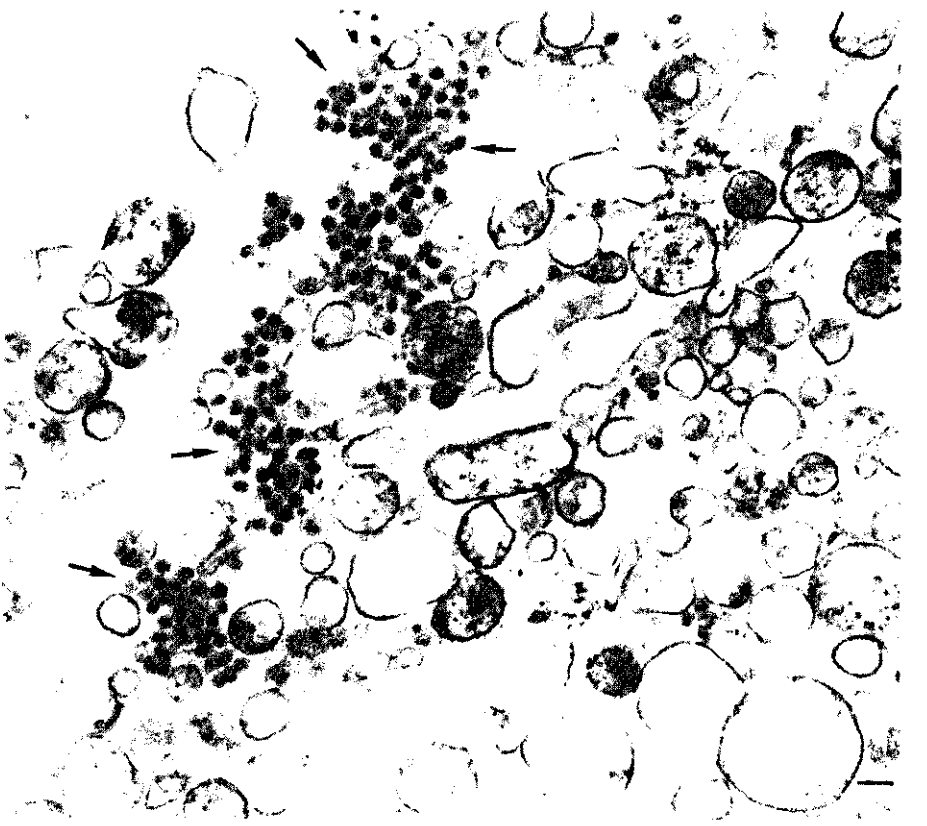
Figuur 1. Met LV geïnfecteerde alveolair macrofagen werden gekleurd in een imuun-peroxidase monolayer assay, met LV specifiek serum.

Karakterisatie van Lelystad agens als een nieuw RNA virus

Voor een nadere bestudering van het agens was het noodzakelijk om dit in vitro te vermeerderen, bij voorkeur tot hoge titers. Tot nu toe is het ons niet gelukt het Lelystad agens in andere cellen dan alveolair macrofagen te kweken. Deze worden verkregen door longen van gezonde biggen uit te wassen. De macrofagen vermeerderen zich echter niet in vitro en de hoeveelheid die uit de longen van één big wordt verkregen is beperkt. Een ander nadeel van het systeem is dat de verschillende partijen een nogal wisselende gevoeligheid voor het Lelystad agens hebben, sommige partijen zijn zelfs onbruikbaar. Gevoelige alveolair macrofagen vertonen vanaf 6-30h na besmetting met Lelystad agens een cytopathologisch effect dat, afhankelijk van de dosis, na 12-96 h volledig is. De titers zijn laag (maximaal $10^{5.5}TCID_{50}$/ml).

Het agens passeert een 0.2 micron filter zonder meetbaar titerverlies, maar de infectiositeit gaat verloren na een behandeling met chloroform. Het agens blijkt niet in staat erythrocyten van kuikens, cavia, varken, schaap of mens (bloedgroep O) te agglutineren.

Vanwege de lage titers was het onmogelijk om het Lelystad agens met het electronenmicroscoop te herkennen in negatief gekleurde preparaten. Om toch de morfologie van het agens te bestuderen werd de bovenstaande vloeistof van een geïnfecteerde macrofaag cultuur geïncubeerd met specifiek hyperimmuun serum. Na ultracentrifugatie van het mengsel werden de pellets geresuspendeerd in agarose en gekleurd voor electronenmicroscopie. In ultradunne coupes werden klusters van geaggregeerde partikels waargenomen. De partikels met een uitwendige diameter van 45-55 nanometer vertoonden een duidelijke virusstructuur (figuur 2). De electronendichte kern (nucleocapside) van 30-35 nanometer doorsnede was omgeven door een dubbelmembraan. De partikels werden niet aangetroffen in de bovenstaande vloeistof van geïnfecteerde celcultures die met negatief serum waren geïncubeerd en evenmin in het kweekmedium van onbesmette macrofagen.



Figuur 2. Immuun-electronen microscopische opname van klusters geaggregeerd LV (-pijlen). Balk komt overeen met 100 nm.

Op grond van deze waarnemingen kon worden geconcludeerd dat het onbekende agens een geënvelopeerd virus was: Lelystad virus (LV). Verder onderzoek heeft uitgewezen dat het genoom van dit virus uit RNA bestaat. LV bleek in de IPMA geen kruisreactiviteit te vertonen met een set van 39 immuunsera, gericht tegen evenzoveel geënvelopeerde RNA virussen van gewervelde dieren. Echter de vorm en grootte van dit RNA virus doet vermoeden dat het thuis hoort in de familie van de togavirussen of van de flavivirussen. Vanwege de selectieve voorkeur voor groei in macrofagen lijkt LV nog het meest op lactaat dehydrogenase virus, een 45-55 nanometer groot geënvelopeerd virus dat bij muizen voorkomt en enige verwantschap heeft met paarde-arteritis virus. LV is evenwel serologisch niet verwant aan de twee laatstgenoemde virussen.

Experimentele besmetting van zeugen

Om te bewijzen dat LV de verwekker van abortus blauw is, werden acht zeugen op dag 84 van de dracht besmet met de derde passage van het virus in macrofagen. Met een neusspray werd aan elke zeug $10^{5.1}TCID_{50}$ virus toegediend. Na een incubatie van 4-7 dagen vertoonden alle varkens typische symptomen van abortus blauw. De zeugen hadden weinig of geen eetlust en waren sloom; bij twee dieren werden gedurende 2 dagen een blauw-rode verkleuring van de oren en een versnelde abdominale ademhaling gezien. De andere symptomen verdwenen na 6-9 dagen. Eén zeug aborteerde op dag 109 van de dracht en wierp zeven dode en vier niet levensvatbare biggen. Drie zeugen wierpen op 116 en 117 dagen 17 levende, 16 dode en vijf gemummificeerde biggen. De andere vier zeugen wierpen omstreeks 114 dagen na inseminatie (tabel 2). In twee van deze tomen kwamen veel zwakke en doodgeboren biggen voor, de overige twee tomen waren normaal. Veel van de levend geboren biggen waren bleek, zwak en lusteloos, en sommige vertoonden "splay-leg", spierrillingen en ademnood (figuur 3). Van de 58 levend geboren biggen stierven 21 (45 %) in de eerste levensweek.

LV werd teruggeïsoleerd uit 31 biggen die dood werden geboren of kort na de geboorte waren gestorven, terwijl bij 23 biggen antilichamen tegen dit virus werden aangetoond in het bloedmonster genomen voor opname van colostrum of in buikholtevocht (tabel 2). Beide bevindingen wijzen er onmiskenbaar op dat het virus de placenta barrière passeert. Aangezien het virus zich bij voorkeur in macrofagen vermeerdert en regelmatig uit bloed van besmette zeugen kan worden geïsoleerd, lijkt het aannemelijk dat de placenta passage in associatie met maternale macrofagen plaatsvindt.

Tabel 2. Experimentele reproductie van abortus blauw na intranasale besmetting van zeugen met Lelystad virus op dag 84 van de dracht

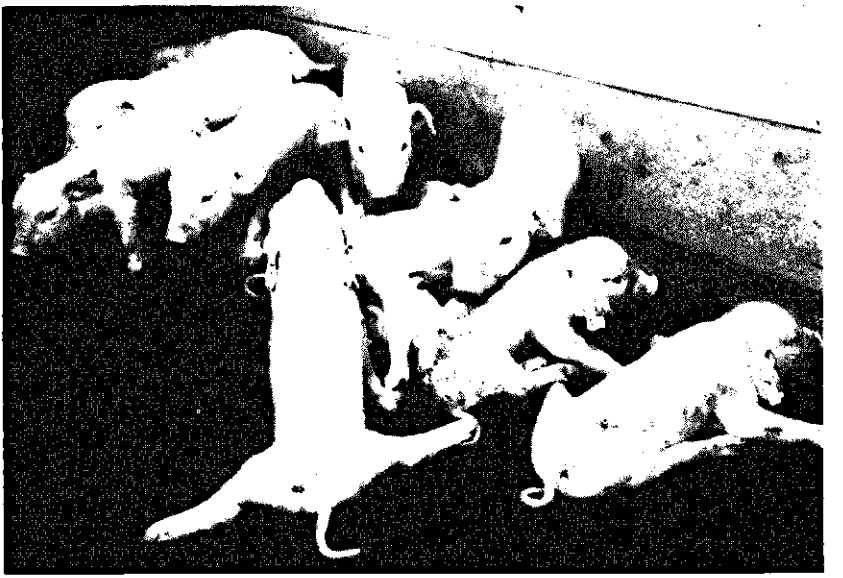
Zeug no.	Duur van de dracht (dagen)	Aantal biggen			Aantal biggen positief/getest	
		dood geboren	levend geboren	gestorven 1ste week	virus isolatie[1]	antilichaam detectie[2]
134	109	7	4	4	10/11	8/11
52	113	3	12	7	7/9	7/15
56	113	5	7	7	5/9	1/8
997	114	1	9	0	0/1	0/10
65	115	2	9	0	0/2	0/8
965	116	9	3	2	4/8	4/9
1305	116	2	7	4	3/5	1/7
941	117	10	7	2	2/7	2/7
Totaal		39	58	26	31/52	23/75

1)Lelystad virus werd geïsoleerd uit homogenaten van long, lever, milt, nier, en ascites vloeistof van biggen die doodgeboren werden of kort na de geboorte zijn gestorven.
2)Antilichaam detectie op basis van de IPMA in lichaamsvloeistof van doodgeboren biggen of in serum van levende biggen voor de opname van biest.

Pathologie en pathogenese van Lelystad virus

Om de pathologie en pathogenese te bestuderen werden zes 6-dagen oude SPF biggen intranasaal besmet met eenzelfde inoculum als hetgeen voor de zeugen werd gebruikt. De biggen werden 1-8 dagen post-infectie (dpi) gedood. Histopathologische veranderingen werden vanaf 1-2 dpi waargenomen in de vorm van verlies aan ciliair epitheel en afstoting van oppervlakkige lagen van het neusslijmvlies, en catarrhale en interstitiële pneumonische haardjes. Depletie van lymfocyten werd vanaf 3 dpi gezien in de periarteriolaire lymfocyten schede (PALS) van de milt, de cortex van de thymus, crypten van de tonsillen en in de mesenteriale lymfeklieren.

LV kon worden terug geïsoleerd uit longen en milt, en LV-antigeen werd met een immunoperoxidase kleuring aangetoond in bronchiolair epitheel, alveolair cellen en milt macrofagen vanaf 2 dpi.



Figuur 3. Toom met zwakke biggen, geboren uit zeug no. 52 (tabel 2). De biggen zijn sloom en sommigen vertonen "splay-leg" en een hondezit.

In de lever ontwikkelde zich vanaf 2 dpi een niet specifieke hepatitis, evenwel zonder dat LV-antigeen kon worden gedetecteerd. In de grote- en kleine hersenen, verlengde merg, hartspier, nier, bijnier schildklier, maag, pancreas, dunne- en dikke darm werden geen histologische veranderingen gezien.

In ultradunne coupes van geïnfecteerd neusslijmvlies en longweefsel werden met het electronenmicroscoop gedegenereerde epitheelcellen en macrofagen gezien met sterke vacuolisatie van het cytoplasma. De cellen waren gezwollen en soms zelfs open gebarsten, waarbij gevacuoliseerd celmateriaal in het lumen werd uitgestoten (figuur 4).

Epidemiologie

De snelle verspreiding van de ziekte in Nederland en het gegeven dat ook goed geleide en geïsoleerd gelegen bedrijven werden besmet suggereert dat het virus via de lucht wordt overgedragen. Verder hebben de experimentele infecties aangetoond dat varkens via de intranasale route kunnen worden besmet. De histopathologische en ultrastructurele veranderingen die daarbij optreden, wijzen er bovendien op dat het virus zich vermeerdert in het slijmvlies van neus en bronchiën, en eveneens in alveolair cellen en alveolaire macrophagen. Desondanks kon met luchtbemonsteringsapparatuur geen virus worden geïsoleerd uit een stal met LV-besmette biggen en evenmin uit neusuitstrijkjes.

Het verloop van de ziekte werd op twee middelgrote fokbedrijven nader onderzocht. Vooral zeugen die op het moment van infectie 35-100 dagen drachtig waren, wierpen tomen met te veel dode en zwakke biggen. Onder zeugen die ten tijde van de infectie minder dan 30 dagen drachtig waren werd een toename gezien van het aantal guste zeugen. Op deze bedrijven bleven in eerste instantie resp. 10 en 15% van de onderzochte zeugen seronegatief voor het LV. Voor een aerogene verspreiding is dit een verrassend hoog percentage. Verder onderzoek naar de wijze waarop het virus wordt overgedragen is daarom noodzakelijk.

Figuur 4. Bronchiolair epitheel. Een gedegenereerde macrofaag (M) kruipt tussen twee normale epitheel cellen (N) door naar buiten. De vacuolen barsten open in het lumen.
N = normale epitheel cel met trilharen. Electronen microscopische opname, balk komt overeen met 100 nm.

Hetzelfde geldt voor de tijdsduur en de wijze waarop het virus in de koppel kan persisteren. Op het ene bedrijf werden tot 2.5 maand na de uitbraak geregeld met LV geïnfecteerde tomen geboren, terwijl op het andere bedrijf ruim 5 maanden na de eerste besmetting nog een virus positieve toom werd geboren. Het betrof een zeug die aanvankelijk negatief was gebleven, doch tussen 3- en 4 maanden na besmetting van het bedrijf een seroconversie vertoonde. Beide waarnemingen duiden erop dat het virus door gebruik te maken van het "carrier sow syndrome" geruime tijd op een bedrijf kan persisteren. Dragende zeugen blijken niet de enige modus voor het virus te zijn om zich langdurig op het bedrijf te kunnen handhaven. Gespeende biggen die op een leeftijd van 4 weken werden besmet, konden het virus tot 8 weken daarna (einde van de waarneming) aan gevoelige soortgenoten overdragen.

Discussie

Met de *in vitro* isolatie van LV uit bijna alle biggen van abortus blauw uitbraken, de overweldigende serorespons van de zeugen die bij deze uitbraken waren betrokken, alsmede het reproduceren van de ziekte en de herisolatie van het virus werden de postulaten van Koch vervuld. Nu is aangetoond dat LV de verwekker is van abortus blauw, is het mysterie omtrent de aetiologie van "mystery swine disease" opgehelderd. Het lijkt daarom gerechtvaardigd om een meer toepasselijke naam te kiezen. Als zodanig stellen wij voor "porcine epidemic abortion and respiratory syndrome", hetgeen kan worden afgekort tot het gemakkelijk uit te spreken acronym "PEARS".

Ondanks het gegeven dat varkens intranasaal met LV zijn te besmetten en aanwijzingen dat de luchtwegen betrokken zijn bij de vermeerdering van het virus, bestaat er onzekerheid omtrent de betekenis van aerogene transmissie voor de epizootiologie van abortus blauw. Het virus kan zowel op fok- als mestbedrijven enkele maanden persisteren.
Door sera uit verschillende landen te testen op antistoffen tegen LV, hebben wij de aanwezigheid van PEARS inmiddels kunnen bevestigen in België, Duitsland, Engeland, Frankrijk, Italië, Spanje, Polen de Verenigde Staten, Canada en de Filippijnen.

Aan het abortus blauw project werkten mee: A. den Besten, M. Bloemraad, E.A. de Boer, J.M. Broekhuijsen, L. van Buiten, J.E. van Dijk, M.C.M. de Jong, E.P. de Kluyver, G. Kok, C. Kragten, E.A. ter Laak, L.A.M.G. van Leengoed, P.L.J.M. Moonen, J.M.A. Pol, C. Terpstra, H.J. Tibben, F. Wagenaar, G. Wensvoort en T. Zetstra.

PEPTIDEN MET HOGE BIOLOGISCHE ACTIVITEITEN

M. Hage van Noort[1)], W.C. Puijk[1)], H.H. Plasman[1)], D. Kuperus[1)], W.M.M. Schaaper[1)], N.C.J.M. Beekman[1)], J.A. Grootegoed[2)], R.H. Meloen[1)]

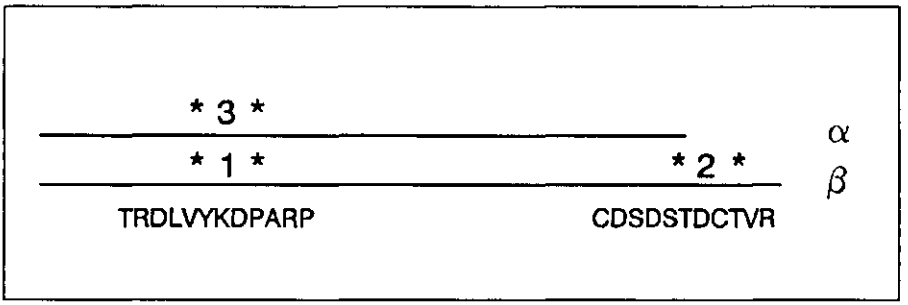
In veel biologische processen bepalen gedefinieerde regio's van eiwitten, bestaande uit een beperkt aantal aminozuren, de selectieve werking.
Deze regio's spelen een hoofdrol bij het ontwerpen van vaccins, diagnostica en medicijnen. In theorie zouden deze regio's nagebootst kunnen worden door middel van peptiden.

Peptiden hebben grote voordelen als basismateriaal voor medicijnen, vaccins en diagnostica; ze zijn extreem goedkoop te produceren, eenvoudig te manipuleren, te vervoeren en op te slaan. Het enige probleem is het definiëren van de juiste aminozuurvolgorden; dit probleem is des te groter omdat de aminozuren waaruit deze regio's bestaan vaak ruimtelijk bij elkaar gebracht worden door de vouwing van het eiwitmolecuul. De kans dat zulke complexe structuren door eenvoudige peptiden kunnen worden nagemaakt werd tot voor kort op nul gehouden. Wij hebben laten zien dat die kans niet nul is; dat het mogelijk is om via een systematische aanpak deze complexe structuren wèl na te maken.

In geval van het FSH molecuul, waarvoor een intense belangstelling bestaat in veterinaire en medische kringen, hebben wij peptiden ontwikkeld met hoge biologische werking; werkingen die in de buurt komen van het intacte molecuul. Zodoende hebben we nu de beschikking gekregen over uiterst goedkope peptiden die het 1000 tot 10.000 maal duurdere FSH nabootsen. Bovendien kunnen we door eenvoudige ingrepen peptiden maken die de FSH-werking juist blokkeren; onmisbaar gereedschap voor het ontrafelen en gericht sturen van de fertiliteit in mens en dier. De gegevens hierover zullen spoedig gepubliceerd worden in de Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A.

Onze methode ligt direct in het verlengde van het reconstrueren van antigene sites d.m.v. lineaire peptiden, waarmee we dankzij de PEPSCAN ruime ervaring hebben opgedaan in de afgelopen 10 jaar.
Van FSH was, toen wij ons er mee bezig gingen houden, bekend dat het uit twee sub-units bestond waarop 4 korte lineaire aminozuurvolgorden gevonden waren (figuur 1) die elk een (1 à 10 miljoen keer) lagere activiteit hadden dan het intacte FSH molecuul.

1) CDI-DLO, Laboratorium voor Moleculaire Immunologie
2) Vakgroep Endocrinologie en Voortplanting, Erasmus Universiteit, Rotterdam



1-3: mogelijke receptor domeinen

1 = TRDL; 2 = CDSDTDC; 3 = SRAY

Figuur 1. Potentiële receptor binding domeinen van FSH.

Dit was een situatie die we al veel vaker in virale systemen waren tegengekomen en die suggereerde dat deze 4 sites mogelijk ruimtelijk bij elkaar lagen door de vorming van het intacte FSH molecuul.
Om überhaupt peptiden te kunnen maken die deze 4 sites vertegenwoordigden, hadden we dus het ruimtelijk model van FSH nodig. Er bestond toen en er bestaat nu nog steeds geen ruimtelijk model van FSH gebaseerd op X-ray diffractie. Echter dankzij onze ervaring, opgedaan met de ruimtelijke structuur van het MKZ virus, wisten we dat eiwitten met geheel andere functies en andere aminozuurvolgorden toch dezelfde ruimtelijke structuur kunnen hebben. Op grond daarvan zijn we gaan zoeken naar bestaande ruimtelijke eiwitstructuren met kleine doch significante verwantschappen met FSH op het nivo van de lineaire aminozuurvolgorde. Die hebben we gevonden (figuur 2), waarbij we overigens criteria gebruikten die niet in overeenstemming waren met de 'wijsheid van de dag'; wat mogelijk verklaart dat niemand anders deze structuur gevonden heeft. Op basis van dit model hebben we peptiden geconstrueerd die 1, 2 en 3 lineaire sites van het eiwit in de juiste samenhang combineerden. De 2-sites peptiden bleken de verwachte blokkerende werking te hebben; hun activiteit was bovendien 100 tot 10.000 maal hoger dan de twee lineaire sites elk apart. Niemand heeft ooit zulke peptide antagonisten van FSH beschreven met deze hoge activiteit. De peptiden die 3 sites vertegenwoordigen bleken tot onze vreugde een stimulerende werking te hebben. De activiteit van deze peptiden was tenminste een miljoen keer beter dan die van de lineaire peptiden (tabel 1). Peptiden met zulke hoge agonistische activiteit zijn eveneens niet eerder beschreven.

Tabel 1 Antagonistische en agonistische activiteiten van peptiden die receptor binding domeinen vertegenwoordigen.

		activiteit	
	site (subunit)	antagonist	agonist
FSH	totaal hormoon		10^{-10}M
Een domein peptide			
TRDL	1 (β)	10^{-4} M	-
determinant TDSDS	2 (β)	-	-
SRAY	3 (α)	10^{-4} M	-
Twee domein peptide			
SRAY-TRDL	3 - 1	10^{-7} M	-
TDSDS-SRAY	2 - 3	10^{-8} M	-
Drie domein peptide			
TDSDS-SRAY-TRDL	2 - 3 - 1	-	10^{-7} M

- = Niet dectabel

We hebben dus voor het eerst aangetoond dat er een methode is om complexe biologisch actieve sites na te bootsen middels eenvoudige peptiden. Gezien de intense belangstelling voor dit gebied van onderzoek vanuit de pharmaceutische industrie en het medisch wetenschappelijk onderzoek, zou het ons niet verbazen als op basis hiervan een heel nieuw onderzoekveld zal ontstaan.

Dit onderzoek werd uitgevoerd in het Laboratorium voor Moleculaire Immunologie in samenwerking met de Erasmus Universiteit.

Figuur 2. Deel van het FSH molecuul.

NIEUWE METHODE VERSNELT ONTWIKKELING VAN VACCINS EN GENEESMIDDELEN

R.H. Meloen[1], J.A. Lenstra[2]

Bij nieuwe methoden voor de ontwikkeling van een vaccin of een bepaald geneesmiddel gaat het vaak om de bepaling van aminozuurvolgorden van de eiwitten van micro-organismen. Dergelijke bepalingen kunnen tegenwoordig zonder problemen worden uitgevoerd. Moeilijker en vaak onmogelijk was het tot voor kort om de biologisch actieve plaatsen van deze eiwitten nauwkeurig te bepalen. De nieuw ontwikkelde PEPSCAN-methode werd hiervoor met succes toegepast op coronavirussen.

In het kader van het project "Epitopen op de oppervlakten van coronavirussen", uitgevoerd bij het DLO-Centraal Diergeneeskundig Instituut en de vakgroep Infectieziekten en Immunologie van de Veterinaire Faculteit der Rijksuniversiteit Utrecht, is een aantal methoden gecombineerd om snel en systematisch immunologisch actieve plaatsen op de structurele eiwitten van coronavirussen te bepalen die op hun beurt kunnen dienen als bouwstenen voor een nieuwe generatie synthetische vaccins.

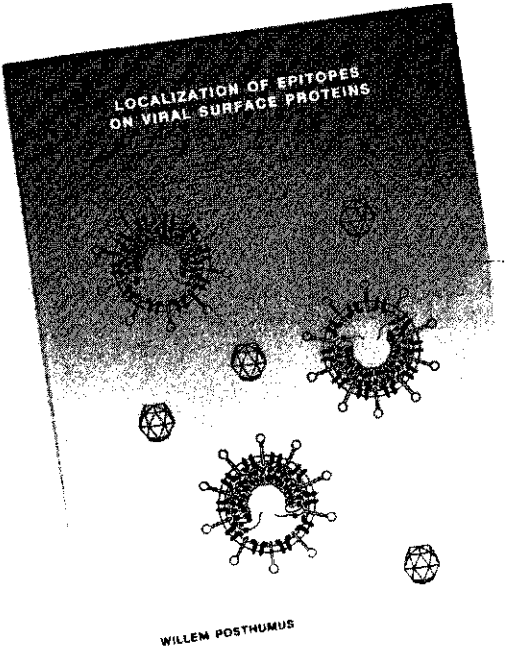
Enerzijds werden recombinant-DNA technieken toegepast, waarmee grotere en kleinere delen van het virale eiwit in analytische hoeveelheden geproduceerd werden. Deze werden vervolgens getest op hun vermogen om relevante antilichamen te binden. Op deze manier kon een globale lokalisatie worden gemaakt van de biologisch actieve plaatsen. Anderzijds werd een methode toegepast die ontwikkeld is bij het CDI-DLO.
Deze methode, de PEPSCAN, is gebaseerd op het gelijktijdig produceren van enkele duizenden overlappende peptiden van een eiwit, die snel getest kunnen worden op hun vermogen om antilichamen te binden. De PEPSCAN maakt het mogelijk snel en systematisch de biologisch actieve plaatsen te bepalen. Bovendien kan met behulp van de PEPSCAN een beeld worden verkregen van de bijdrage van de individuele aminozuren aan de activiteit van het geïdentificeerde biologisch actieve peptide.
Door gebruik te maken van een recombinante "random bank", die circa tien miljoen verschillende willekeurige peptiden bevat, werden met behulp van de tegen de coronavirussen gerichte antilichamen opnieuw reactieve peptides gevonden. Vergelijking van de sequenties van deze laatste biologisch actieve peptiden met die welke gevonden waren met de antilichamen en peptiden van het oorspronkelijke eiwit, leerde dat deze

1) *CDI-DLO, Laboratorium voor Moleculaire Immunologie*
2) *Vakgroep Infectieziekten en Immunologie, Faculteit Diergeneeskunde, Rijksuniversiteit Utrecht*

bank een aantal biologisch actieve peptiden opleverde die grote gelijkenis vertoonden met de eerder gevonden peptiden. Dit suggereert dat voor elke willekeurig antilichaam met behulp van de "random bank" biologisch actieve peptiden te vinden zijn. Op hun beurt kunnen deze vaak suboptimale peptiden snel en systematisch worden geoptimaliseerd door middel van de PEPSCAN.

Omdat in plaats van antilichamen ook bv. receptoren te gebruiken zijn, lijkt het erop dat de combinatie van methoden, voor het eerst toegepast in dit project, de basis kan vormen voor een "quantum sprong" in het ontwerpen van niet alleen nieuwe vaccins, maar ook nieuwe geneesmiddelen.

Dit onderzoek dat onder leiding stond van dr. J.A. Lenstra, prof.dr. B.A.M. van der Zeijst (RUU) en dr. R.H. Meloen (CDI-DLO), werd uitgevoerd op het CDI-DLO door dr. W.P.A. Posthumus als promotieonderwerp (zie ook elders in dit jaarverslag).



LEPTOSPIROSE

A.J.M. Olyhoek[1)]

Toen de arts L. J. van der Laan op 9 september 1941 bij een ernstig zieke jongen van 13 jaar geroepen werd, was zijn eerste indruk dat het hier een geval van de ziekte van Weil betrof. De jongen lag met hoge koorts op bed en klaagde over hoofdpijn en spierpijn. Ook zijn vriendje was ziek, maar hij had veel minder ernstige verschijnselen. Bij nader onderzoek bleek dat de infectiebron bij de veldmuizen gezocht moest worden, die door de jongens regelmatig gevangen werden.

Het bovenstaande geval is exemplarisch voor leptospirose, een ziekte waarbij leptospiren, die door chronisch geïnfecteerde dieren (vaak knaagdieren) in water en bodem verspreid worden, de mens infecteren. Het ziektebeeld kan van ernstig tot mild variëren, in een groot gedeelte van de gevallen verloopt de ziekte waarschijnlijk zelfs asymptomatisch.

Ook voor de vorm van leptospirose die bekend is onder de naam "melkerskoorts" gaat het bovenstaande in grote lijnen op. Deze leptospirose wordt veroorzaakt door infectie van runderen met *Leptospira hardjo*, en besmetting van mensen vindt plaats via contact met runderurine of met besmette organen. Het is niet duidelijk of knaagdieren een rol spelen bij de verspreiding van deze leptospiren. Uit een onderzoek bij het CDI-DLO is gebleken dat de veldmuis in ieder geval niet als bron van infectie functioneert. De ziekte kan zich bij runderen uiten in de vorm van agalactie en vaker optreden van abortus. In de literatuur wordt gesuggereerd dat verschillende varianten van *L. hardjo* verantwoordelijk zouden zijn voor verschillende klinische beelden: een vorm zou bij runderen abortus, en bij mensen meningitis en abortus veroorzaken, de andere vorm zou alleen milde verschijnselen veroorzaken. In Nederland wordt *L. hardjo* infectie bij runderen en melkerskoorts bij de mens vanaf het begin van de 80-er jaren gediagnosticeerd. Hierbij bleek een duidelijke toename van het aantal met *L. hardjo* geïnfecteerde runderen en een afname van met name *L. ballum* in 1978 en in 1983 (tabel 1).

Uit onderzoek van het CDI-DLO, de diverse Gezondheidsdiensten voor Dieren en het Koninklijk Instituut voor de Tropen is gebleken, dat het aantal positieve bedrijven de laatste jaren gelijk blijft op ongeveer 25 %, terwijl het vermoedelijk aantal geïnfecteerde mensen bij plusminus 50 per jaar ligt.

---

1) CDI-DLO, Afdeling Bacteriologie

Tabel 1. De prevalentie van antilichamen tegen leptospira bij runderen in Nederland

	1974	1975	1976	1977	1978	1979	1980	1981	1982	1983
Pomona	11 (4,1)	3 (1,6)	-	-	1 (0,3)	3 (1,1)	6 (0,5)	7 (0,6)	19 (1,1)	13 (0,7)
Ictero.	107 (40,5)	67 (36,6)	19 (7,2)	52 (8,7)	46 (12,3)	24 (8,8)	168 (15,2)	224 (21,4)	234 (14)	190 (20,1)
Canicola	6 (2,2)	2 (1,1)	1 (0,3)	1 (0,3)	27 (7,2)	10 (3,7)	6 (0,5)	11 (1)	26 (1,5)	13 (0,7)
Tarassovi	2 (0,7)	18 (9,8)	35 (13,2)	19 (3,2)	31 (8,2)	25 (9,2)	35 (3,1)	23 (2,2)	37 (2,2)	110 (6,6)
Grippo.	126 (47,7)	85 (46,5)	41 (15,5)	66 (11,1)	24 (6,4)	39 (14,4)	206 (18,6)	173 (16,5)	361 (21,6)	366 (21,9)
Sejroe	-	-	1 (0,3)	3 (0,5)	43 (8,8)	57 (21)	86 (7,8)	36 (3,4)	320 (19,1)	329 (19,7)
Hardjo	1 (0,4)	4 (2,2)	2 (0,7)	3 (0,5)	33 (8,2)	10 (3,7)	88 (7,9)	16 (1,5)	70 (4,1)	238 (14,3)
Ballum	12 (4,5)	3 (1,6)	165 (62,9)	451 (75,8)	170 (45)	102 (37)	507 (46)	553 (53)	603 (36)	248 (14,9)
Totaal positief	265	183	264	595	375	271	1102	1043	1670	1664
Totaal onderzocht	6876	5159	2841	5991	3432	4417	6045	5181	8235	6359
%	3,9	3,5	9,2	9,9	10,9	6,1	18,2	20,1	20,2	26,1

De resultaten tonen de aantallen dieren (export- en abortus onderzoek) die geïnfecteerd waren met verschillende leptospiren serovars in de jaren 1974 t/m 1983. Tussen haakjes staan de percentages positieve dieren voor iedere serovar ten opzichte van het totaal aantal positieve dieren in ieder jaar. De onderste kolom geeft het percentage positieve dieren ten opzichte van het totaal aantal onderzochte dieren. Voor de periode na 1983 zijn geen onderzoeksgegevens beschikbaar.

Omdat de infecties met *L. hardjo* een aanhoudend probleem vormen in de veehouderij, wordt bij het CDI-DLO onderzoek gedaan naar de mogelijkheden voor preventie en bestrijding van deze leptospirose. Het onderzoek richt zich hierbij op twee hoofdgebieden: I Verloop van het infectieproces; II karakterisering van virulentiefactoren.

I Verloop van het infectieproces

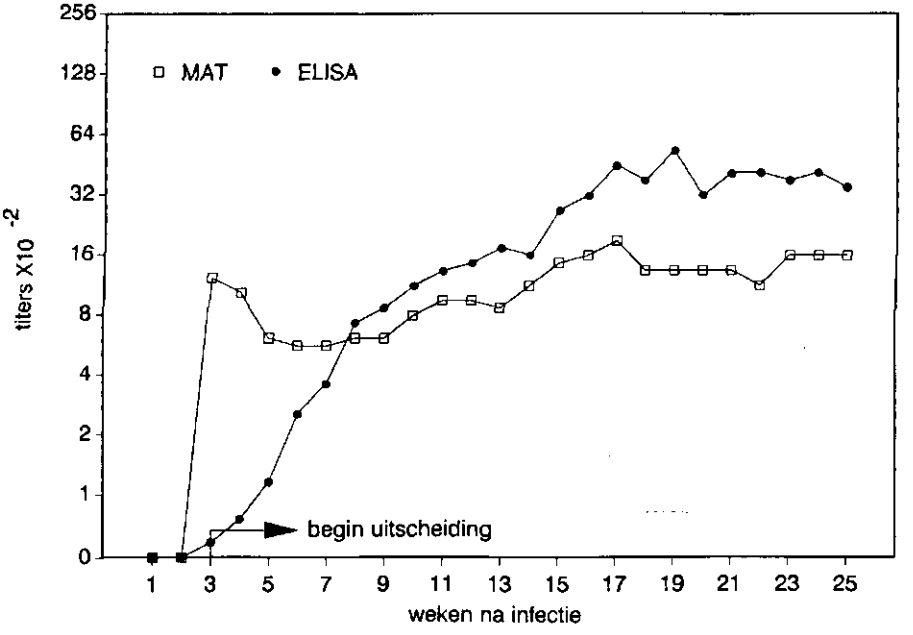
Na infectie met leptospiren volgt eerst een relatief korte fase waarin de bacteriën in het bloed kunnen worden aangetoond. In een latere fase worden de dieren seropositief en scheiden leptospiren uit in de urine. Er bestaat geen duidelijkheid over het verloop van de immuunrespons en over de periode van uitscheiding. In de literatuur wordt vaak gesproken over intermitterende uitscheiding die heel lang kan duren. Bovendien is er geen eensluidende mening over het effect van antibiotica al dan niet gecombineerd met vaccinatie. Antibioticum behandeling lijkt de uitscheiding van leptospiren te kunnen onderdrukken, evenals vaccinatie.
Hoelang dit effect aanhoudt is nooit goed onderzocht, wel is bekend dat behandeling de carrierstatus van dieren niet verhindert: ook na behandeling kunnen leptospiren uit niermateriaal geïsoleerd worden. Veel onderzoekers zijn zelfs van mening dat eenmaal geïnfecteerde dieren levenslang drager (en dus potentiële uitscheiders) blijven, doordat leptospiren intracellulair in bepaalde organen (met name de hersenen) aanwezig zouden blijven. Uit *"in vitro"* experimenten is inderdaad bekend dat leptospiren intracellulair kunnen worden, over de feitelijke *"in vivo"* situatie is echter niets bekend.

Een antwoord op bovenstaande onduidelijkheden is voorwaarde voor een zinvolle bestrijding. Bij het CDI-DLO wordt daarom sinds anderhalf jaar onderzoek gedaan naar het verloop van infectie met *L. hardjo* bij runderen. Hiertoe is een experimenteel infectie model ontwikkeld waarin runderen via het oog besmet werden met een virulent Nederlands *L. hardjo* isolaat. Het verloop van de infectie werd gevolgd door bepaling van de serologische titers (MAT en ELISA) en door detectie van leptospiren in de urine met behulp van PCR. Van een aantal runderen is bovendien weefselmateriaal van verschillende organen verzameld om met behulp van *"in vitro"* DNA hybridisatie en PCR te bepalen of, en waar leptospiren aanwezig zijn.

De serologische resultaten (figuur 1) laten zien dat het opkomen van een ELISA titer ongeveer samenvalt met het tijdstip waarop runderen leptospiren gaan uitscheiden in de urine. De gevonden duur van uitscheiding varieerde van 2 maanden tot meer dan een jaar. Een belangrijk resultaat van het onderzoek was, dat in alle gevallen waarin de uitscheiding gestopt was, deze binnen de proefperiode niet opnieuw is begonnen. Bovendien was opvallend, dat de serologische titers bij alle dieren hoog

bleven: dit zou kunnen betekenen dat er nog steeds (intracellulaire) leptospiren aanwezig zijn.

De mogelijkheid bestaat, dat speciale omstandigheden, die de afweer verzwakken, nodig zijn om de uitscheiding weer op gang te brengen. Daarom werd een geïnfecteerd rund gedurende meerdere weken behandeld met immuunsuppressiva; er konden echter ook na deze behandeling geen leptospiren aangetoond worden in de urine.



Figuur 1. MAT en ELISA titers van acht experimenteel geïnfecteerde runderen.

Ook al wijzen onze resultaten eerder op een niet intermitterend patroon van uitscheiding, toch zou de in de literatuur beschreven periodieke uitscheiding nog het gevolg kunnen zijn van eventuele herinfectie. Daarom is ook geprobeerd een aantal runderen te herinfecteren met *L. hardjo*. De resultaten van deze proef zijn op dit moment nog niet bekend.

De gebruikelijke behandelingswijze bij infectie met *L. hardjo* is de toediening van dihydrostreptomycine. Het effect van een dergelijke behandeling is volgens de literatuur dat uitscheiding stopt, terwijl leptospiren wel in de

nieren aanwezig blijven. Deze gegevens berusten op het kunnen aantonen van leptospiren middels kweekmethoden, waarvan bekend is dat vaak negatieve kweekresultaten uit urine optreden, terwijl het geïnfecteerde dier wel uitscheidt. Om deze reden hebben wij de PCR methode ingezet om het effect van behandeling met antibioticum op betrouwbare wijze te evalueren.

Hiertoe werden 6 runderen geïnfecteerd met *L. hardjo*. Tweeënveertig dagen na infectie werden drie van de zes runderen behandeld met dihydrostreptomycine (25 mg/kg lichaamsgewicht). De andere drie runderen werden 5 opeenvolgende dagen met dezelfde hoeveelheid dihydrostreptomycine behandeld. Op de dag van behandeling was bij alle dieren de urine minimaal 1 week positief in de PCR. Het resultaat van de antibioticumbehandeling was, dat twee dagen na behandeling bij geen van de dieren meer leptospiren konden worden aangetoond in de urine. Ook hier begon de uitscheiding binnen de proefperiode (6 maanden) niet opnieuw.

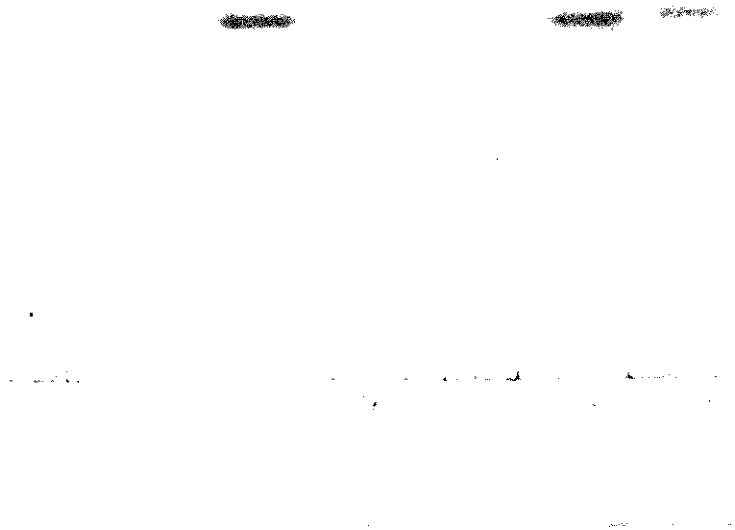
Wel was de bereikte titer in zowel de MAT als de ELISA bij behandelde dieren duidelijk lager dan bij de niet behandelde controledieren. Om te zien, hoe groot bij behandelde dieren de kans op herinfectie is, zijn vier van deze dieren opnieuw besmet. De twee overblijvende dieren zijn afgemaakt. Er werd materiaal van diverse organen verzameld, dat met behulp van de PCR en de *"in situ"* hybridisatie op de aanwezigheid van leptospiren onderzocht zal worden. Vanuit een gedeelte van het niermateriaal zal tevens worden geprobeerd om leptospiren met behulp van kweek te isoleren. Ook van deze proef zijn de eindresultaten nog niet bekend.

Uit het onderzoek kan nu al wel de conclusie getrokken worden, dat serologische titer en uitscheiding c.q. besmettingsgevaar niet gecorreleerd zijn. Met andere woorden, uit de serologische status van een bedrijf kan geen conclusie getrokken worden betreffende het gevaar voor besmetting en uitbreiding van de infectie. De resultaten van de antibioticum proef zijn zeer hoopgevend. Toch mag men nu niet concluderen dat behandeling met antibiotica het *hardjo* probleem op kan lossen. In de eerste plaats is er het grote gevaar bij grootschalige toepassing van antibiotica, dat er resistentie kan gaan optreden bij de leptospiren. Ook is op het moment onduidelijk of de leptospiren volledig verwijderd zijn, en of er niet een grote kans is op herbesmetting. Bovendien zou een bestrijdingsprogramma, gericht op verwijdering van *L. hardjo* uit de Nederlandse veestapel, mogelijk kunnen leiden tot het (weer) opkomen van andere, nu niet prominente leptospiren serovars.

II Karakterisering van virulentiefactoren

Bij de hechting van bacteriën aan cellen is veel werk gedaan aan de interactie van *bacteriële lectines* met *eucaryote glycolipiden*. Zo is bijvoorbeeld gebleken dat uropathogene *E. coli's* binden aan globosides. De techniek die hierbij gebruikt wordt is binding van gelabelde bacteriën of bacteriële membranen aan door middel van dunnelaagchromatografie gescheiden glycolipiden. Er zijn echter ook andere moleculaire interacties mogelijk die tot binding leiden. De interactie van specifieke bacteriële eiwitten met eucaryote eiwitten is daarbij het best onderzocht. Het bekendste voorbeeld is het invasine van *Yersinia*, dat door interactie met speciale eucaryote eiwitten, de zogenaamde integrines, ervoor zorgt dat *Yersinia* aan cellen bindt en in de cellen kan binnendringen.
Een logisch ander mechanisme, dat een rol zou kunnen spelen bij de binding van bacteriën aan cellen, is een interactie van *bacteriële suikermoleculen* met specifieke *eucaryote lectines*. Het onderzoek bij het CDI-DLO heeft zich tot nu toe vooral geconcentreerd op dit laatste mechanisme. Voorzover wij hebben kunnen nagaan is deze mogelijkheid nog nergens onderzocht.

Van de suikermoleculen bij Spirochaeten werd tot nog toe aangenomen, dat zij voornamelijk voorkomen in het LLS (Lipopolysaccharide like substance). Lipid extracten van *Leptospira* en *Borrelia* lieten echter, in onze experimenten, verrassenderwijze naast LLS ook een aantal kleinere bacteriële glycolipiden zien. Deze konden door middel van dunnelaag-chromatografie gescheiden worden (figuur 2). Bij bindingsexperimenten met runderniercellen aan dunnelaagplaatjes met gescheiden glycolipiden bleek, dat een aantal van deze glycolipid structuren aan niercel membranen bond. Met ons onderzoek zijn wij de eerste onderzoeksgroep die een mogelijke betrokkenheid van bacteriële glycolipiden bij hechting heeft gerapporteerd. In de literatuur werd tot voor kort nergens melding gemaakt van glycolipiden bij Spirochaeten. Zeer recent is echter een artikel verschenen over immunogene (kleine) glycolipiden bij *Borrelia burgdorferi*, maar hierin werd vooral naar serologische eigenschappen gekeken. De voorlopige resultaten van onderzoek met andere bacteriën bij het CDI-DLO en van onderzoek met bacteriële lipopolysaccharides elders, doen vermoeden dat we hier te maken kunnen hebben met een meer universeel hechtingsmechanisme, dat tot nu toe onopgemerkt is gebleven. Gezien de immunogene eigenschappen van deze moleculen zouden mogelijke toepassingen kunnen liggen in de diagnostiek en in de ontwikkeling van vaccins tegen *Borrelia* en *Leptospira*.



Figuur 2. Glycolipide patronen van *Leptospira* en *Borrelia*.
1) *Leptospira biflexa patoc*; 2) *L. interrogans hardjobovis* 3) *Borrelia burgdorferi* L10; 4) runderhersen globoside; 5) *L. interrogans icterohaemorraghia*; 6) *B. burgdorferi* L2; 7) *B. burgdorferi* B31.

Het huidige onderzoek bij het CDI-DLO concentreert zich op het chemisch karakteriseren van de diverse glycolipiden. Momenteel wordt bezien of er een vervolgonderzoek gestart zal worden dat zich richt op het karakteriseren van hechtingseiwitten bij *Leptospira* met behulp van moleculair biologische technieken. Deze mogelijk nieuwe lijn van onderzoek is van belang, omdat uit tal van publikaties blijkt dat hechting een multifactorieel proces is. De hechting van specifieke leptospiren eiwitten aan cellen zou, in analogie met soortgelijk onderzoek bij *E. coli* en *Shigella*, de verklaring kunnen vormen voor dier- en weefselspecificiteit bij leptospireninfecties. Karakterisering van deze moleculen biedt bovendien een alternatieve mogelijkheid voor de ontwikkeling van een vaccin tegen leptospirose. Niet in de laatste plaats kan kennis over de moleculaire mechanismen, die bij hechting van bacteriën aan cellen een rol spelen, de aanzet vormen voor de ontwikkeling van pharmaceutische produkten die de hechting kunnen blokkeren.

Het boven beschreven onderzoek werd uitgevoerd op de Afdeling Bacteriologie van het CDI-DLO. Bij dit onderzoek waren de volgende personen en groepen betrokken: T. Olyhoek (Projectleider), M. Gerritsen, A. Lammers, M. Koopmans, P. Voshol, I. Comvalius, T. Dekkers, Z. Bercovich, A. Moerman, medewerkers van de Afdeling Proefdierverzorging van het CDI-DLO, B.A. Bokhout (lid van de CDI-DLO Projectgroep Leptospira hardjo), J. Haagsma (Afdelingshoofd Bacteriologie).

CYTOLYSINEN VAN *ACTINOBACILLUS PLEURO-PNEUMONIAE*

Ruud Jansen[1)], Jan Briaire[1)], Elbarte Kamp[2)] en Mari Smits[1)]

Inleiding

Wereldwijd komt bij varkens een ernstige vorm van longontsteking (pleuropneumonie) voor. De ziekte wordt veroorzaakt door de bacterie *Actinobacillus pleuropneumoniae* die vroeger *Haemophilus pleuropneumoniae* werd genoemd. Het CDI-DLO heeft een onderzoek gaande, met als doel beter begrip te krijgen van het pathogenese proces. Dergelijk onderzoek draagt bij aan de ontwikkeling van effectieve bestrijdingsmethode voor *A. pleuropneumoniae*. Het onderzoek richt zich op de identificatie en karakterisering van de virulentie factoren die *A. pleuropneumoniae* in staat stelt de gastheer te infiltreren en te koloniseren.

In cultuurmedium van *A. pleuropneumoniae* blijken zich enkele van de virulentie factoren te bevinden. Dit bleek uit experimenten waarbij met steriel cultuurmedium van *A. pleuropneumoniae*, dus zonder de aanwezigheid van de bacterie zelf, in varkenslongen de typische pleuropneumonie lesies opgewekt konden worden. Deze steriele cultuurmedia zijn *in vitro* onder andere toxisch voor longmacrofagen en voor erytrocyten. Hierdoor was het mogelijk om een eenvoudige test op te zetten voor het meten van de toxische activiteit in cultuurmedia van *A. pleuropneumoniae*. Met monoclonale antilichamen die de toxische activiteit inhiberen, konden in deze cultuurmedia drie eiwitten aangetoond worden. Deze eiwitten hadden molecuulgewichten van 105.000, 109.000 en 120.000. Dit betekent dat de drie eiwitten verantwoordelijk zijn voor de toxische eigenschappen van deze cultuurmedia. Op grond van de cel-lyserende eigenschappen zijn de drie eiwitten cytolysinen (Cly) genoemd: ClyI voor het eiwit met een molecuulgewicht van 109.000; ClyII voor het eiwit met een molecuulgewicht van 105.000; en ClyIII voor het eiwit met een molecuulgewicht van 120.000.

Het species *A. pleuropneumoniae* kent twaalf serotypen. De referentie stammen van de twaalf serotypen zijn onderzocht op de secretie van ClyI, ClyII en ClyIII. De resultaten van deze inventarisatie staan weergegeven in tabel 1. Deze stammen secreteren elk twee of slechts één van de cytolysinen. Geen van de stammen blijkt alle drie de cytolysinen te secreteren. Deze secretie patronen werden, op een enkele uitzondering na, ook aangetroffen in veldstammen van de twaalf serotypen.

1) *CDI-DLO - Afdeling Moleculaire Biologie*
2) *CDI-DLO - Afdeling Bacteriologie*

Cytolysine genen

Om inzicht te verkrijgen in de moleculaire structuur van de drie cytolysinen is de klonering en analyse van de cytolysine genen ter hand genomen. Deze informatie is nodig om inzicht te krijgen in: de structuur en verwantschap van de drie cytolysinen, de onderlinge relatie tussen de cytolysine genen, en de variatie tussen elk van de afzonderlijke cytolysinen binnen de twaalf serotypen. Het kloneren en karakteriseren van de cytolysine genen kan tevens inzicht verschaffen in het werkingsmechanisme van de cytolysinen. Tot slot kunnen de gekloneerde genen gebruikt worden voor de aanmaak van de drie cytolysinen door recombinante *E. coli*. Deze preparaten, die vrij zijn van andere *A. pleuropneumoniae* componenten, zijn van grote waarde voor het verdere pathogenese- en vaccinonderzoek.

Structuur en verwantschap

De ClyI en ClyII genen van serotype 9 en het ClyIII gen van serotype 8 zijn gekloneerd en hun structuur is nader onderzocht (figuur 1). Meest opvallend is dat de Cly genen niet als zelfstandige genen voorkomen maar altijd als onderdeel van een groepje samenhangende genen. Zo'n groepje samenhangende genen, een operon, vormt een functionele eenheid. Vergelijkbare gen- en operon-structuren waren al bekend voor *Escherichia coli* en *Pasteurella haemolytica*. In deze bacteriën coderen deze operons voor de zogenaamde RTX (repeat in toxin) toxinen. Alle drie de cytolysinen van *A. pleuropneumoniae* bleken een vergelijkbare gen- en operon-structuur te hebben als de RTX toxine operons van *E. coli* en *P. haemolytica*. ClyI, ClyII en ClyIII zijn dus verwant aan elkaar en behoren tot de familie van de RTX toxinen. De vier genen van een RTX operon vormen tezamen een functionele eenheid. Het A gen van het operon codeert voor een inactief toxine, dat geactiveerd wordt door het eiwit van het C gen. De B en D genen coderen voor eiwitten die betrokken zijn bij de secretie van het toxine. In figuur 1 is aangegeven in welke serotypen de ClyI, ClyII en ClyIII operons voorkomen en hoe de structuur van deze operons is in de diverse serotypen. Duidelijk is dat er een strikte correlatie bestaat tussen het secreteren van een bepaald cytolysine (tabel 1) en de aanwezigheid van het desbetreffende cytolysine gen (= het A gen van het operon) in een bepaald serotype. De aminozuur volgorden van de drie geanalyseerde cytolysinen zijn met elkaar vergeleken en ze zijn voor 37% (ClyI en ClyII), 50% (ClyI en ClyIII) en 41% (ClyII en ClyIII) identiek aan elkaar.

Tabel 1. Cytolysinen van de twaalf serotypen. De aanwezigheid van een cytolysine in een serotype is aangegeven met (+) de afwezigheid met (-).

SEROTYPE	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
CYTOLYSINE												
ClyI	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-
ClyII	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
ClyIII	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-

Onderlinge relatie

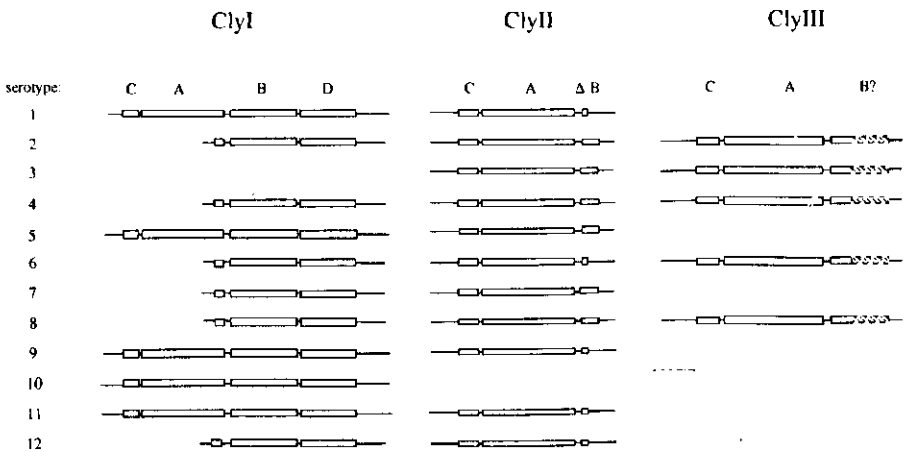
In figuur 1 zijn de structuren van de ClyI, ClyII en ClyIII operons zoals ze voorkomen in de twaalf serotypen weergegeven. Opvallend is dat in het ClyII operon de C en A genen niet vergezeld gaan van B en D secretie genen. De ClyI operons daarentegen bestaan in een aantal serotypen (2, 4, 6, 7, 8 en 12) slechts uit B en D secretie genen, zonder dat er een toxine gen aanwezig is. Alleen in de serotypen 1, 5, 9, 10 en 11 zijn naast de ClyI B en D secretie genen ook de C en A toxine genen aanwezig. Alleen in serotype 3 is geen ClyI operon aanwezig. De aanwezigheid van ClyI secretie genen in bacteriën die geen ClyI toxine produceren, lijkt overbodig. Het is echter waarschijnlijk dat de ClyI secretie eiwitten zorgdragen voor de secretie van ClyII, immers ClyII heeft geen "eigen" secretie eiwitten. Als deze veronderstelling juist is, dan betekent dit dat er een nauwe samenwerking is tussen de ClyI en ClyII operons. Serotype 3 heeft geen ClyI secretie genen en ook geen ClyII secretie genen. Toch secreteert dit serotype ClyII en ClyIII. We veronderstellen dat in dit geval de ClyIII secretie genen voor het extracellulaire transport zorg dragen. De aanwezigheid van de ClyIII secretie genen is echter nog niet aangetoond.

Variatie binnen één cytolysine tussen de verschillende serotypen

De indeling van de cytolysinen in ClyI, ClyII en ClyIII is gemaakt op basis van de molecuulgewichten van de cytolysinen, op basis van de reactie met monoclonale antilichamen en op basis van de biologische activiteit in een *in vitro* toxiciteitstest. Het is echter niet duidelijk in hoeverre er tussen de diverse serotypen verschillen bestaan in de primaire structuur van één bepaald type cytolysine. Dergelijke verschillen kunnen het eenvoudigst

opgespoord worden door de ClyI, ClyII en ClyIII genen van de verschillende serotypen met elkaar te vergelijken. Immers, de primaire structuur van elk eiwit is als blauwdruk aanwezig in zijn gen.

Om deze onderlinge vergelijking uit te kunnen voeren was het eerst nodig om de diverse Cly genen van alle serotypen te isoleren. Dit werd gedaan door gebruik te maken van de polymerase chain reaction (PCR). De genen werden vervolgens met restrictie enzymen in een groot aantal fragmenten geknipt. Deze fragmenten werden op grootte gesorteerd en de zo ontstane "restrictie patronen" werden met elkaar vergeleken. Omdat restrictie enzymen DNA knippen op plaatsen waar een bepaalde volgorde van DNA bouwstenen voorkomt resulteert een kleine verandering in de DNA volgorde meestal in een verandering van het restrictie patroon.



Figuur 1. Structuren van de ClyI, ClyII en ClyIII operons van de twaalf serotypen. De balken geven de positie en grootte van de C, A, B en D genen in de operons. De ClyI A genen en de ClyII B genen waren in een aantal serotypen slechts gedeeltelijk aanwezig. Het ClyII B gen fragment is aangegeven met ΔB. Van het ClyIII operon is nog niet bekend of B en D genen aanwezig zijn. Dit is aangegeven met B? en de waarschijnlijke positie van deze genen is gearceerd.

Tot nu toe hebben wij de C en A genen van de ClyI en ClyII operons op deze wijze geanalyseerd. De DNA volgorde van het ClyI gen, dat aanwezig is in de serotypen 1, 5, 9, 10 en 11 (figuur 1), blijkt tussen de diverse serotypen te variëren. We weten nog niet welke gevolgen dit heeft voor de aminozuur volgorde van het ClyI eiwit, maar hoogst waarschijnlijk zijn de

ClyI eiwitten van de serotypen niet aan elkaar gelijk. De DNA volgorde van het ClyII gen, dat aanwezig is in alle serotypen behalve serotype 10 (figuur 1), blijkt tussen de verschillende serotypen nagenoeg identiek te zijn. De ClyII eiwitten van de serotypen zijn dus nagenoeg gelijk aan elkaar.

Conclusies

Het onderzoek heeft aangetoond dat de twaalf serotypen van *A. pleuropneumoniae* drie verschillende cytolysinen produceren. De drie cytolysinen zijn verwant aan elkaar en behoren tot de familie van de RTX toxinen. De drie geanalyseerde cytolysinen lijken wat hun primaire eiwit structuur betreft niet erg veel op elkaar: 37% voor ClyI en ClyII; 50% voor ClyI en ClyIII en 41% voor ClyII en ClyIII. De operons waarvan de cytolysine genen deel uitmaken zijn in vele gevallen incompleet. Het ClyII operon heeft in geen van de serotypen B en D secretie genen. We veronderstellen dat het ClyII eiwit wordt gesecreteerd met behulp van de ClyI B en D secretie eiwitten.

De ClyI eiwitten van de serotypen hebben waarschijnlijk niet dezelfde structuur. De ClyII eiwitten daarentegen zijn onderling nagenoeg gelijk aan elkaar. De ClyIII eiwitten zijn nog niet onderling vergeleken.
Met behulp van de C en A genen van de drie verschillende cytolysine operons, zijn we er inmiddels in geslaagd om recombinante *E. coli* cellen te genereren, die in relatief grote hoeveelheden ClyI, ClyII of ClyIII uitscheiden. Deze recombinante cytolysinen zijn niet te onderscheiden van de cytolysinen die door *A. pleuropneumoniae* zelf gemaakt worden. Met deze recombinante *E. coli* cellen kunnen we nu ClyI, ClyII en ClyIII preparaten maken die vrij zijn van andere *A. pleuropneumoniae* componenten. Dergelijke preparaten zijn uitermate geschikt voor het uitvoeren van gedetailleerd pathogenese onderzoek en voor het onderzoek naar de ontwikkeling van een protectief subunit vaccin.

Aan het A. pleuropneumoniae project werken verder mee: Toine Cruysen, Jaap van Dijk, Anton van Geel, Leo van Leengoed, Jaap van Leeuwen, Jan Pol, Johan Popma, Jos Verheyden en Thea Vermeulen.

ETIOLOGIC AND PATHOGENIC STUDIES ON POSTWEANING DIARRHEA

MARIUS NABUURS

ONDERZOEK NAAR AETIOLOGIE EN PATHOGENESE VAN DIARREE BIJ GESPEENDE BIGGEN

M.J.A. Nabuurs[1)]

Inleiding

Speendiarree blijkt, zowel naar vóórkomen als naar economische betekenis, een van de grootste problemen in de moderne varkenshouderij te zijn. De verliezen tengevolge van speendiarree zijn slechts bij benadering bekend; in Nederland werden ze geschat op 30-50 gulden/zeug/jaar, in de voormalige DDR werden ze berekend op 70-100 D-mark/zeug/jaar. Speendiarree heeft mogelijk ook invloed op het, tegelijkertijd of later, krijgen van andere ziekten. Er zijn eveneens aanwijzingen dat biggen die speendiarree hebben gehad later, bijvoorbeeld gedurende de mestperiode, achter blijven in groei. Om deze redenen is het gewenst tot een betere preventie te komen van speendiarree dan met de huidige kennis van de ziekte mogelijk is. Daarom is dit onderzoek opgezet.

Microbiële aetiologie

Naast enterotoxische *Escherichia coli* (ETEC) bacteriën en rotavirus zou ook *Clostridium perfringens* type A (CPA) een rol spelen in het ontstaan van speendiarree (SD). Om hier meer zekerheid over te krijgen werd op 4 bedrijven met een lange geschiedenis van SD de microbiële aetiologie van SD bestudeerd. Een opvallende bevinding tijdens dit onderzoek was dat verschillende *E.coli*-stammen de dunne en de dikke darm van de biggen na het spenen opeenvolgend koloniseerden. Bij enkele geseceerde biggen werden zelfs twee verschillende ETEC-stammen, tegelijkertijd in de darm gevonden. Rotavirus werd vóór het spenen van de biggen meestal gedurende een onafgebroken periode van 5 tot 14 dagen in de faeces van individuele biggen aangetoond en na het spenen gedurende 1 tot 4 perioden die in tijd varieerden van 1 tot 6 dagen. Kort na de geboorte van de biggen werd CPA tot 10^9 CFU in de faeces gevonden; dit aantal daalde gestaag tot een week na het spenen; meestal waren er dan geen CPA kiemen meer aantoonbaar in de faeces. Deze bevinding sluit een mogelijke rol van CPA in het onstaan van SD niet geheel uit omdat het enterotoxine vooral vrijkomt bij lysis en/of sporulatie van CPA. Bovendien staat nog niet met zekerheid vast dat de pathogene werking van CPA alleen op de productie van enterotoxinen berust. Na het spenen werd diarree het meest frequent waargenomen wanneer de biggen een ETEC-stam uitscheidden.

1) CDI-DLO afdeling Bedrijfsdiergeneeskunde, Pathologie en Epidemiologie

Het kwam echter ook voor dat geen enteropathogeen agens in de faeces kon worden aangetoond, terwijl de biggen diarree vertoonden. Maar alle tien biggen die gedurende een of twee dagen rotavirus en aansluitend een ETEC-stam uitscheidden hadden diarree; 2 van deze biggen stierven ten gevolge van SD.

Villuslengte en cryptediepte

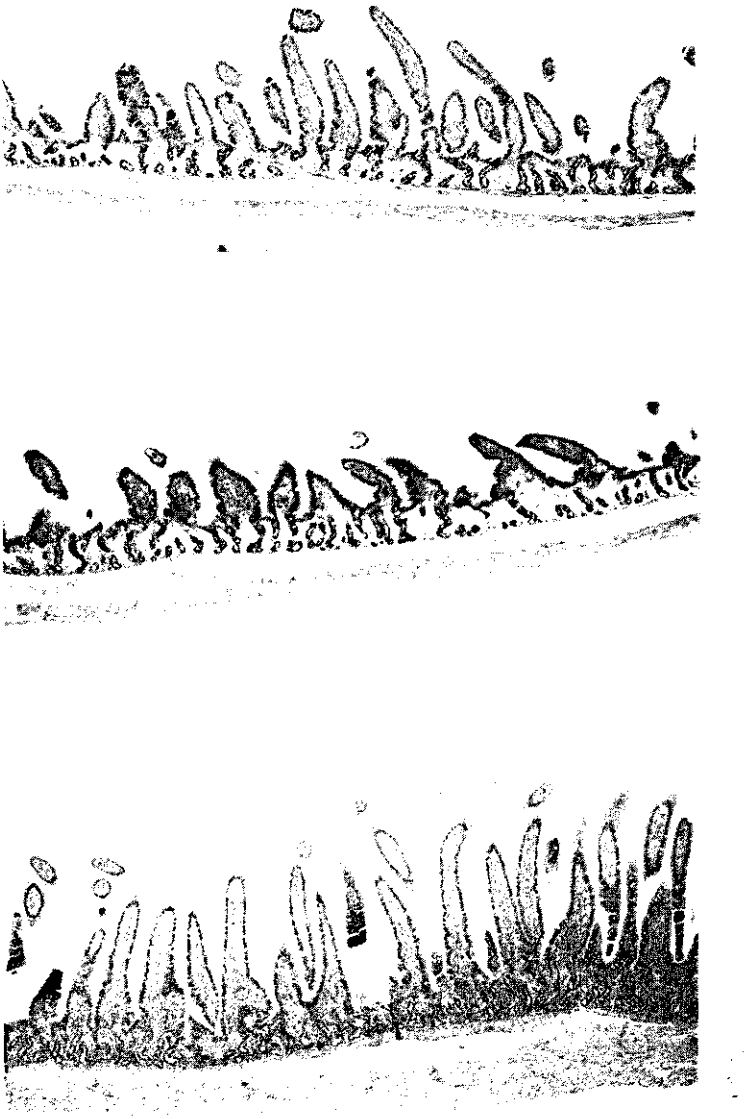
Uit de metingen van de villuslengte en cryptediepte van biggen afkomstig van de vier SD-bedrijven bleek dat de biggen van het enige SD bedrijf met sterfte, villi hadden die half zo lang waren als die van de SD bedrijven zonder sterfte, en dat deze op hun beurt weer kortere villi hadden dan biggen die afkomstig waren van een specific pathogen free (SPF) bedrijf. Bovendien waren de crypten van de biggen van de vier SD bedrijven, die onderling geen verschillen vertoonden, dieper dan de crypten van de biggen van het SPF-bedrijf. De conclusie uit dit onderzoek was dat SD geassocieerd is met een verkorting van villi en een verdieping van crypten.

Oorzaken van villuslengte en cryptediepte veranderingen

In dit onderzoek werd allereerst aandacht besteed aan de invloed van het speenproces als zodanig op de veranderingen van villuslengte en cryptediepte. Wanneer wel- en niet-gespeende biggen uit eenzelfde toom met elkaar werden vergeleken bleek dat de lengte van de villi van de niet-gespeende biggen niet veranderde. De villi van de wel-gespeende biggen bleken daarentegen op dag 4 en dag 7 na het spenen significant korter en op dag 11 en dag 14 na het spenen significant langer te zijn dan die bij de niet-gespeende biggen (Figuur 1). De crypten van de wel-gespeende biggen waren op alle dagen significant dieper dan die van de niet-gespeende biggen.

In dit onderzoek bleek voorts dat biggen die tijdens de zoogperiode geforceerd werden bijgevoerd door ze acht uur per etmaal bij de zeug weg te nemen en dan bij te voeren, diepere crypten hadden op de dag van het spenen dan de biggen die niet tijdelijk werden weggenomen en bijgevoerd; dit verschil was echter 4 dagen na het spenen verdwenen. Ook bleken de wel-bijgevoerde biggen 7 dagen na het spenen significant langere villi te hebben dan de niet- bijgevoerde biggen.

Geconcludeerd werd dat geforceerd bijvoeren van biggen tijdens de zoogperiode de villusverkorting, welke na het spenen optreedt, kan doen verminderen en de verdieping van de crypten eerder kan doen plaats vinden.



Figuur 1. Villuslengte in SPF biggen op de dag van het spenen (boven), 7 dagen na het spenen (midden), en 14 dagen na het spenen (onder).

Netto-resorptie in de dunne darm

De invloed van de villuslengte en cryptediepte veranderingen op de vochtbalans in de dunne darm is niet bekend. Omdat diarree vooral betekent dat het vochtgehalte in de faeces te hoog is, is het wel van belang om deze invloed te meten. Voor dit doel werd de "Small Intestine Segment Perfusion" (SISP) test ontwikkeld. In de SISP-test, die onder algehele narcose wordt uitgevoerd, wordt de netto-resorptie in vijf gepaarde segmenten gemeten; de segmenten-paren zijn gelegen op 10%, 25%, 50%, 75% en 95% van de lengte van de gehele dunne darm. Voor het begin van de test worden de craniale segmenten van elk paar ingespoten met een ETEC-stam en de caudale met een fysiologische zoutoplossing (Figuur 2). De perfusie van de segmenten met een fysiologische zoutoplossing duurt tien uur; twee uur na beëindiging van de perfusie worden de dieren gedood. De netto-resorptie wordt gedefinieerd als het volume van de perfusievloeistof dat een segment instroomt verminderd met het volume dat er uitstroomt, gedeeld door de oppervlakte van het segment.

Met behulp van de SISP-test werd de netto-resorptie in de dunne darm van wel- en niet-gespeende biggen van eenzelfde toom gemeten. Hierbij bleek dat, in tegenstelling tot de wel-gespeende biggen, de netto-resorptie in de niet-gespeende biggen gedurende de twee weken dat het onderzoek duurde niet veranderde. In de wel-gespeende biggen was de netto-resorptie op de dagen 4, 7, en 14 na het spenen significant minder dan in de niet-gespeende biggen voor wat betreft de niet besmette segmenten. Voor wat betreft de besmette segmenten was de netto-resorptie op de dagen 11 en 14 significant minder dan in de niet-gespeende biggen.

Geconcludeerd werd dat het spenen van biggen geassocieerd is met een vermindering van de netto-resorptie zowel in de niet met ETEC-besmette als in de wel met ETEC-besmette dunne darm.

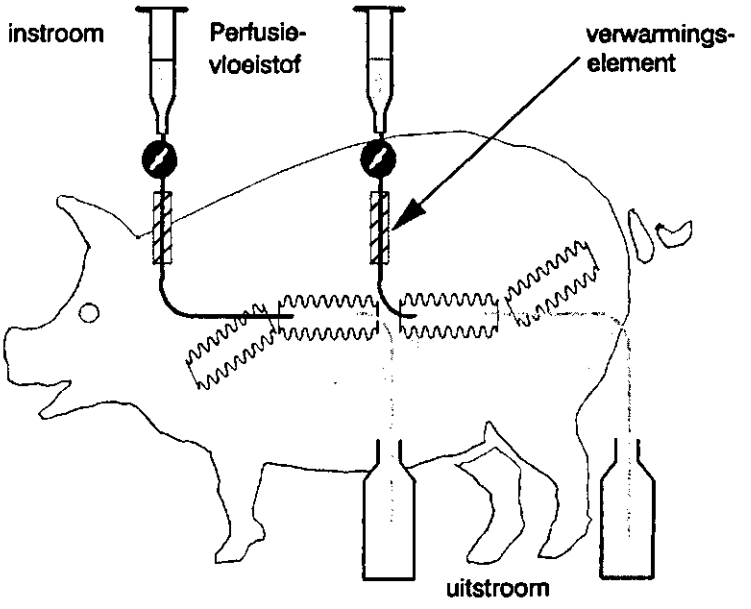
Bij het onderzoek naar de verandering van de netto-resorptie in de besmette segmenten bleek dat er een discrepantie bestond tussen villuslengte en netto-resorptie. Terwijl de villi op de dagen 11 en 14 significant langer waren dan op de dagen 4 en 7 na het spenen bleek de netto-resorptie op de dagen 11 en 14 significant minder dan op de andere dagen. Deze discrepantie kan verklaard worden door aan te nemen dat de villi op de dagen 11 en 14 bedekt zijn met onrijpe, op crypte-enterocyten gelijkende cellen.

Geconcludeerd werd dat de netto-resorptie in de dunne darm na een infectie met ETEC, niet bepaald wordt door de lengte van de villi wanneer

deze recentelijk hersteld zijn van een atrofie, maar door de verhouding van rijpe en onrijpe enterocyten op de villi.

Ook in de dunne darm van gespeende biggen, die tijdens de zoogperiode wel- en niet-geforceerd werden bijgevoerd werd met behulp van de SISP-test de netto-resorptie gemeten. In dit onderzoek bleek dat, voor wat betreft niet- besmette segmenten, de netto-resorptie in de bijgevoerde biggen significant hoger was op dag 4 na het spenen dan in die van de niet-bijgevoerde biggen. Bij deze niet-bijgevoerde biggen bleek vervolgens dat, voor wat betreft de besmette segmenten, de netto-resorptie op dag 4 na het spenen significant geringer was dan op de dag van het spenen.

De bevindingen in dit onderzoek suggereren dat geforceerd bijvoeren van biggen tijdens de zoogperiode het gewoonlijk optredende verlies van netto-resorptie in de al dan niet met ETEC besmette dunne darm gedeeltelijk kan voorkomen.



Figuur 2. Schematische, vereenvoudigde weergave van de SISP test.

Rotavirus en netto-resorptie

De rol van rotavirus in het ontstaan van SD is al meerdere jaren onderwerp van discussie. Daarom werd met behulp van de SISP-test een onderzoek gedaan naar de invloed van een infectie met rotavirus op de netto-resorptie in de dunne darm van biggen die acht dagen gespeend waren. De netto-resorptie werd gemeten in biggen die niet met rotavirus besmet waren en in biggen die 1, 3 en 7 dagen voor een test met rotavirus besmet waren.

In de biggen die een dag voor de test met rotavirus geïnfecteerd waren bleek, voor wat betreft de niet met ETEC-besmette segmenten, de netto-resorptie significant groter te zijn dan in alle andere biggen. In grote tegenstelling hiermee was het resultaat voor wat betreft de wel met ETEC-besmette segmenten. Gebleken is dat de netto-resorptie in die segmenten juist significant minder was, in de biggen die een dag voor de test besmet waren met rotavirus, dan in alle andere behandelingsgroepen. Aangenomen werd dat de significant grotere netto-resorptie, voor wat betreft de niet met ETEC-besmette segmenten, veroorzaakt werd door een compensatoir mechanisme in de enterocyten van de villi die, ondanks de rotavirus-besmetting, niet door rotavirus waren aangetast. Een dergelijk mechanisme was al bekend van ratten die besmet waren met *Nippostrongylus brasiliensis*.

De significante afname van de netto-resorptie, voor wat betreft de segmenten die met een ETEC-stam besmet waren, ondersteunt de waarneming dat een rotavirus-infectie gevolgd door een ETEC-infectie een belangrijke risicofactor vormt voor het ontstaan van SD.

De dikke darm

In het onderzoek naar de pathogenese van SD is aan de rol van de dikke darm nog nauwelijks aandacht besteed terwijl er meerdere redenen zijn om aan te nemen dat de dikke darm een cruciale rol kan spelen in het ontstaan van SD:

- Diarree kan alleen dan ontstaan wanneer de compensatoire resorptie van vocht in de dikke darm tekortschiet.
- Een *Serpula hyodysenteriae*-infectie veroorzaakt een diffuse colitis en zal daarom de resorptie in de dikke darm doen verminderen.
- De resorptie van natrium en water in de dikke darm is mede afhankelijk van de resorptie van vluchtige vetzuren die onstaan bij de microbiële fermentatie van koolhydraten. De microbiële fermentatie bij biggen van eenzelfde leeftijd vertoont aanzienlijke variaties en neemt toe naarmate de dieren ouder worden.

- Bij mensen die lijden aan een cholera infectie is de resorptie in de dikke darm tot 10% gereduceerd.

Om deze redenen hebben wij het effect bestudeerd van een gesimuleerde resorptie vermindering in de dikke darm op het ontstaan van SD. Omdat bij SD de dunne darm gekoloniseerd wordt door ETEC-stammen, die allemaal het heat-labile toxine (LT) produceren, werd de resorptie in de dikke darm bestudeerd in gespeende biggen waarvan de dunne darm geperfuseerd werd met LT. Het LT werd toegediend via een fistel in het duodenum. Ook werden er twee fistels in het ileum aangebracht. Via de craniale ileum-fistel stroomde de inhoud van de dunne darm (ileal flow: IF) in een verwarmde gecallibreerde fles en via de caudale ileum-fistel werd de gehele IF (controle biggen) of de helft van de IF (gesimuleerde biggen) weer geretourneerd.

Van 2 tot 14 uur na de eerste LT perfusie was de IF in de biggen met de gesimuleerde resorptievermindering significant hoger dan in de andere biggen terwijl de hoeveelheid water die beide groepen dieren hadden gedronken nauwelijks verschilde. Vier uur na de eerste perfusie was het kaliumgehalte in het serum van de biggen met de gesimuleerde resorptievermindering al significant gestegen; het kaliumgehalte bleef stijgen tot de biggen, vermoedelijk als gevolg van hyperkaliëmie, stierven. In dezelfde biggen daalde het natriumgehalte in het serum, terwijl het aldosteron- en het angiotensine 2-gehalte in het plasma van de biggen met de gesimuleerde resorptievermindering significant steeg ten opzichte van de controle biggen. Het lijkt aannemelijk dat de waargenomen veranderingen onderling samenhangen. Het intra-duodenaal toegediende LT veroorzaakt, als gevolg van de secretie van het alkalische bicarbonaat, acidose. De opname van kalium door de lichaamscellen vermindert als gevolg van de acidose waardoor de hyperkaliëmie zich kan ontwikkelen. LT veroorzaakt *bovendien een vermindering van de resorptie van natrium in de dunne* darm, terwijl de gesimuleerde resorptievermindering ook een verlies van natrium tot gevolg heeft. Als gevolg van deze daling van natrium in het serum wordt kalium onvoldoende door de nier uitgescheiden waardoor de hyperkaliëmie nog wordt versterkt. Als gevolg van de daling van het natriumgehalte en de stijging van het kaliumgehalte in het serum stijgt het aldosterongehalte in het plasma waardoor de IF kon toenemen.

Conclusies

Het ontstaan van SD kan niet alleen worden toegeschreven aan het voorkomen van bepaalde microbiële agentia in het maagdarmkanaal van gespeende biggen, alhoewel een infectie met rotavirus, wanneer deze

onmiddelijk wordt gevolgd door een ETEC-stam ernstiger diarree geeft dan separate infecties van deze agentia.

Ook is nu aangetoond dat een gecombineerde rotavirus- en ETEC-infectie grotere verstoring van de resorptie in de dunne darm geeft dan wanneer de infecties met een tussentijd van meer dan drie dagen optreden.

Ernstige verkorting van villi en verdieping van crypten in de mucosa van de dunne darm blijken een voorwaarde te zijn voor ETEC-stammen om SD te veroorzaken. Het blijkt dat de ernst van de morfologische veranderingen in positieve zin beïnvloed kan worden door biggen tijdens de zoogperiode geforceerd bij te voeren. Ook de resorptie in de dunne darm blijkt hierdoor in gunstige zin beïnvloed te worden, waardoor niet kan worden uitgesloten dat ook SD door een dergelijke aanpak minder ernstig zou kunnen verlopen. Opvallend is dat geregenereerde villi onder onze test omstandigheden gevoeliger zijn voor een ETEC infectie dan nog niet herstelde villi.

De dikke darm lijkt een belangrijke rol te spelen bij SD, daarom verdient onderzoek naar de ontwikkeling en handhaving van de resorptie in de dikke darm extra aandacht.

Aan dit onderzoek werkten verder mee:
A.J. Baars, A. Bartelse, H. van Beek, F.R. Bodet, R.A.M. Brouwers, R.M. Buijs, J.E. van Dijk, G.J. de Graaf, A.M. Ham-Hoffies, A. Hoogendoorn, M.A.L.M. Jansen, J.G.A. Kooijman, A.B. Korevaar, K. Kort, P.W. de Leeuw, J.H.L.M. van Lieshout, J.W. Meijer, E.J. van der Molen, A.L.M. van Osta, M. Pover, J.T.C. Rutgers, F. van der Schaaf, H. Sloetjes, R. Venema, R. Vlijm, J.A. van der Voort, P. de Vrey, K. Weerdmeester, R. IJben, A.M.L. van Zoelen, F.G. van Zijderveld, A.M. van Zijderveld-van Bemmel.

Het project werd afgesloten met een promotie op 25 april 1991 aan de Rijksuniversiteit Utrecht.

MEERJARENPLAN 1992-1997

B.A. Bokhout[1)]

In december 1991 kwam het CDI-DLO Meerjarenplan 1992-1997 gereed; meer dan een jaar van bezinning over het werkterrein van het instituut en over de invulling daarvan werd hiermee afgesloten.
Hieronder wordt een kort overzicht gegeven van het doel van het meerjarenplan, van de werkwijze om tot het plan te komen en wordt de inhoud van het plan kort weergegeven. De paragraaf 'slotopmerkingen' gaat in op enkele beperkingen van het plan en evalueert het bereikte resultaat.

Inleiding

In de beginjaren '90 was het voor het CDI-DLO noodzakelijk een Meerjarenplan te formuleren. De directeur vatte die noodzaak in het voorwoord bij het Meerjarenplan als volgt samen:

'Een bezinning op de taakopdracht was nodig door de vele veranderingen waaraan het instituut is blootgesteld. Door de personele en materiële krimp van de laatste jaren is het aandachtsgebied waarop het CDI-DLO zich kan richten ingeperkt of onder spanning gekomen. Dit leidde tot onrust en verhoogde werkdruk bij de medewerkers.
Maar er zijn meer ontwikkelingen binnen ons werkveld. Van de veehouderij worden aanpassingen gevraagd om de belasting van het milieu te verminderen en om het dierlijk welzijn te verbeteren. Er ontwikkelen zich alternatieve vormen van veehouderij, terwijl deze sector zich tegelijkertijd moet aanpassen aan de open grenzen van "Europa '92". Deze veranderingen vragen ook van het CDI-DLO om een duidelijke prioriteitsbepaling. Daarnaast was een bezinning op de efficiency en het functioneren van het instituut noodzakelijk.'

Op grond van deze overwegingen wil het meerjarenplan de doelgroepen en de medewerkers van het instituut inzicht geven in de taken die het instituut tussen 1992 en 1997 zal uitvoeren. Daartoe werden keuzes gemaakt op basis van 'wat moet en wat kan'. Het 'wat moet' wordt vooral bepaald door de actuele nationale en internationale veterinaire problematiek; het 'wat kan' door de beschikbare middelen, de stand van de wetenschap en de expertise die binnen het instituut aanwezig is.

---

1) CDI-DLO, hoofd Afdeling Immunologie en voorzitter stuurgroep Meerjarenplan. Deze stuurgroep bestond verder uit mevr. L. Mol en de heren J.M. van Leeuwen, H.J. Over, C.J.G. Wensing en D. van Zaane

Op basis van het meerjarenplan zijn vertegenwoordigers van doelgroepen, beter dan voorheen, in staat de richting en de opbrengst van de CDI-DLO inspanningen op hun waarde te schatten. Door de discussies die onderdeel vormden van de voorbereiding van het meerjarenplan zijn vele instituuts-medewerkers opnieuw attent gemaakt op de noodzaak selectief te zijn bij de keuzes en de uitvoering van hun werk. Bovendien zijn zij vertrouwd geraakt met de voorwaarden die aan de diverse onderdelen van het CDI-DLO takenpakket zijn verbonden.

Werkwijze

Het directiebesluit een meerjarenplan te laten opstellen werd gevolgd door de installatie van de Stuurgroep Meerjarenplan, waarna het plan aan de hand van een werkboek in vier fases werd voorbereid.
In de eerste fase werden vier aandachtsgebieden gedefinieerd (Onderzoek, Financiën, Mensen en Omgeving) en geëvalueerd. Daarbij werd o.a. aandacht besteed aan de sterke en zwakke punten van het instituut en aan belangrijke externe ontwikkelingen, die de toekomst van het CDI-DLO als 'kans' of 'bedreiging' kunnen beïnvloeden.
Op grond van de sterkte/zwakte analyse in fase 1 vond in de tweede fase een instituutsbrede discussie plaats, resulterend in de formulering van een aantal conclusies per aandachtsgebied.
In de derde fase werden op basis van deze conclusies doelstellingen geselecteerd. Deze werden vertaald in zeven onderwerpen (Onderzoek, Enquête Dierziekten, Organisatie, Veterinair Netwerk, Kwaliteit Dienst-verlening, Financiën en Public Relations), die door evenzovele werkgroepen werden uitgewerkt. Daarmee werd de basis gelegd voor concrete actie-plannen. Intussen werden interviews gehouden met relevante beleids-functionarissen.
In de laatste fase werden de adviezen van de werkgroepen, gecombineerd met de reacties van de beleidsfunctionarissen, verwerkt tot het Meerjarenplan.

Gedurende de hele voorbereiding van het Meerjarenplan werd binnen het instituut op een breed front aandacht gevraagd voor het plan. Zo werd bij de sterkte/zwakte analyse in fase 1 gebruik gemaakt van de resultaten van interviews met medewerkers op sleutelposities binnen het instituut. Uitgaande van adviezen van werkgroepen, conceptteksten en algemene voorlichtingsacties werd voorts op diverse niveaus gediscussieerd over de toekomst van het instituut. Deze interne discussie werd afgerond met drie hoorzittingen voor alle medewerkers.

Meerjarenplan
1992-1997
Meerjarenplan
1992-1997
Meerjarenplan
1992-1997
Meerjarenplan
1992-1997
Meerjarenplan
1992-1997
Meerjarenplan
1992-1997
cdi-dlp

Resultaat: Het Meerjarenplan

Alle inspanningen tezamen resulteerden uiteindelijk in een ca. 40 pagina's dun meerjarenplan, waarin verdeeld over drie hoofdstukken de plannen en de achtergrond voor die plannen worden uiteengezet. Elk van de hoofdstukken is afgesloten met een paragraaf waarin de plannen en accentverschuivingen zijn gebundeld. Daaruit is hier een selectie weergegeven.

Hoofdstuk 1 beschrijft de taken van het instituut in nationaal en internationaal verband en de CDI-DLO doelgroepen. Dit hoofdstuk noemt ook de beoogde opbrengst van de verschillende activiteiten en de manier waarop het instituut informatie over die activiteiten wil uitdragen. De paragraaf 'plannen en accentverschuivingen' vermeldt de continuïteit in de aard van opdracht, doelgroepen en resultaten. Ook wordt in deze paragraaf aandacht besteed aan activiteiten die er op zijn gericht de contacten met vertegenwoordigers van doelgroepen te intensiveren.

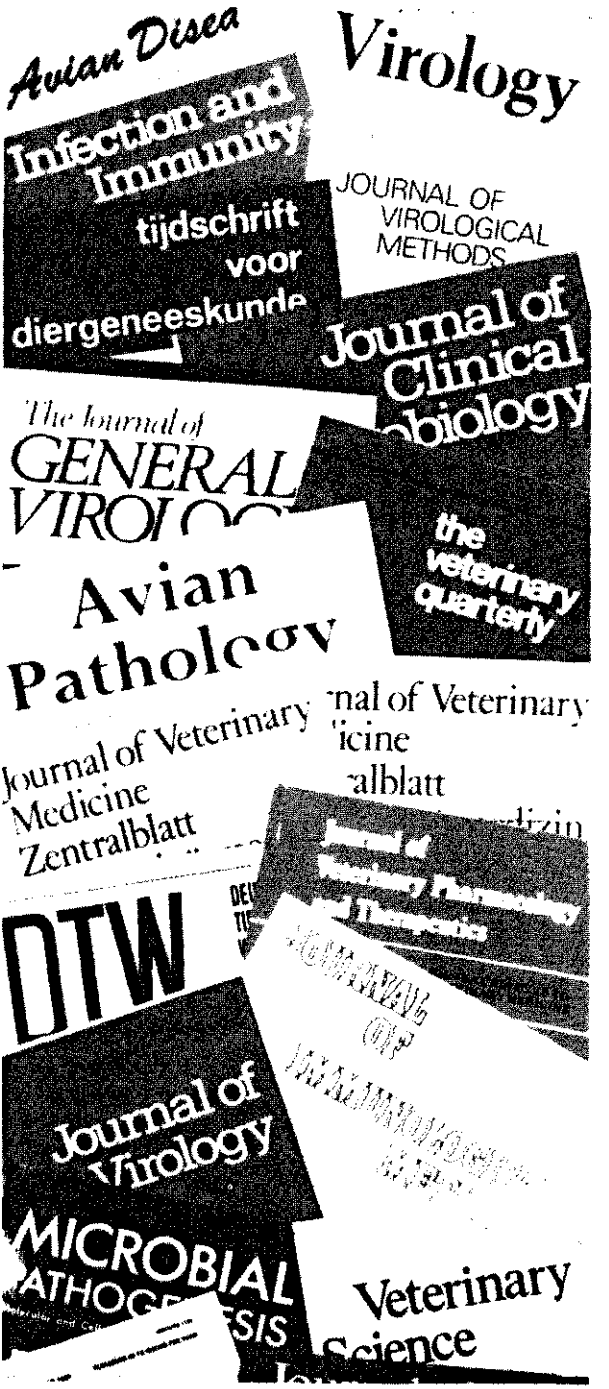
Hoofdstuk 2 schetst de manier waarop het CDI-DLO zijn opdracht, opgebouwd uit wettelijke en dienstverlenende taken, onderzoek en produktie, realiseert. De paragraaf 'plannen en accentverschuivingen' besteedt aandacht aan de verbetering van het dienstverlenende pakket, ondermeer op basis van kwaliteitsbeheersing en structurering van nationale en uitbreiding van internationale referentietaken. Voorts beschrijft deze paragraaf de consequenties van de inventarisatie van dierziekten, recente ontwikkelingen in de veehouderij en het beleid zoals deze in de keuzes van het funderend en toepassingsgerichte onderzoek van het instituut tot uiting komen. Daarnaast wordt de nadruk gelegd op sterkte nummer 1 van het instituut, 'vele belangrijke vakdisciplines onder één dak' en de initiatieven tot uitbreiding van de samenwerking op het gebied van de dierziektebestrijding in Nederland.

Hoofdstuk 3 gaat over de randvoorwaarden voor de taakinvulling van het instituut. Het beschrijft organisatorische, financiële en personele mogelijkheden, problemen en kansen. De paragraaf 'plannen en accentverschuivingen' gaat in op de plannen over de organisatiestructuur van het instituut en beschrijft het toekomstig onderzoeksmanagement en enkele instrumenten die men zal hanteren om de kwaliteit van de wetenschappelijke expertise en de produktie te waarborgen. In de zelfde paragraaf wordt ondermeer uiteengezet op welke wijze het CDI-DLO het personeelsbeleid zal realiseren en het interne financiële beleid zal concretiseren. Ook de financiële randvoorwaarden worden beschreven.

Slotopmerkingen

Tijdens de uitvoering van de derde fase van de werkwijze van het Meerjarenplan werd duidelijk, dat een fusie met een of meer andere DLO-instituten uit de sector Dierlijke Produktie niet denkbeeldig was. Daarmee leek een deel van de inspanningen die tot het meerjarenplan moesten leiden, voor niets te zijn.
Al snel werd besloten het meerjarenplan toch te schrijven. Daarvoor bestond een aantal goede redenen. Immers, de bezinning op instituutstaken en op mogelijkheden om deze zo efficiënt mogelijk uit te voeren betrok alle medewerkers indringend bij dit belangrijke aspect van het functioneren van het instituut. Bovendien zullen de uitkomsten van vele evaluaties bijdragen aan de duidelijkheid over tal van zaken binnen het instituut; een duidelijkheid die goed van pas komt bij het overleg met de fusiepartners.

Wanneer een project wordt afgesloten is het een goed gebruik je af te vragen of het beoogde doel is bereikt. Bij de start van het meerjarenplan stond de Stuurgroep Meerjarenplan voor ogen samen met zoveel mogelijk instituutsmedewerkers een bondig, leesbaar plan op hoofdlijnen te schrijven. De stuurgroep is van mening dat ze erin is geslaagd zo'n plan te schrijven.
Achteraf dient echter ook te worden geconstateerd dat, ondanks allerlei acties in alle delen van de instituutsorganisatie, de beoogde betrokkenheid maar ten dele is gerealiseerd. Bij de realisatie van het plan zal hiermee terdege rekening worden gehouden.


Avian Disea
Virology
Infection and Immunity
tijdschrift voor diergeneeskunde
JOURNAL OF VIROLOGICAL METHODS
Journal of Clinical
biology
The Journal of
GENERAL
the veterinary quarterly
Avian
Journal of Veterinary Medicine Zentralblatt
nal of Veterinary
icine
alblatt
DTW
Journal of Virology
MICROBIAL
Veterinary Science

PUBLICATIONS 1991

Bacteriology / Molecular biology

Actinobacillus pleuropneumoniae 59
Anaerobic bacteria 61
Botulism 62
Clostridium perfringens 63
Corynebacterium pyogenes 64
Leptospira interrogans 65
Mycobacterium paratuberculosis 68
Mycoplasma's 69
Streptococcus suis 70
Tuberculosis 71
Vibrio cholerae 73

Endocrinology

Male fertility 74

Gastroenterology

Postweaning diarrhea 75

Immunology

Avian immunity 84
Mucosal immunity 86
T-lymphocytes 89

Molecular Immunology

Pepscan 91

Parasitology

Anguillicola crassus 110
Anthelmintic resistance 111
Helminths 114
Lungworm infections 115

Pharmacology

Muscle / nerve *116*
Oxytetracycline *117*

Toxicology

Intoxications *118*
Wild bird mortality *119*

Virology / Molecular biology

Aujeszky's disease virus / pseudorabies virus *120*
Bovine viral diarrhea virus *133*
Chicken anemia virus *134*
Equine influenza virus *135*
Foot-and-mouth disease virus *136*
Herpes simplex virus *139*
PEARS *140*
Pestivirus *143*
Porcine epidemic diarrhea virus *144*
Swine fever virus / hog cholera virus *145*

Other publications

Other publications *147*

ACTINOBACILLUS PLEUROPNEUMONIAE

Identification of hemolytic and cytotoxic proteins of *Actinobacillus pleuropneumoniae* by use of monoclonal antibodies

E.M. Kamp, J.K. Popma, J. Anakotta, M.A. Smits[1)]

Infection and immunity 59, 1991, 3079-3085.

Monoclonal antibodies (MAbs) were raised against extracellular hemolytic and cytotoxic proteins of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes 2 and 9. MAbs were tested for inhibition of hemolytic and cytotoxic activities of the reference strains of *A. pleuropneumoniae* serotypes 1 to 12. Five MAbs inhibited hemolytic or cytotoxic activities of one or more serotypes and were used to probe Western blots (immunoblots) of cytotoxic and hemolytic culture filtrates of serotypes 1 to 12. The MAbs recognized three different proteins:
(i) a protein of approximately 103 kDa that was associated with a weak hemolytic activity and a moderate cytotoxic activity,
(ii) a protein of approximately 105 kDa that was associated with a strong hemolytic activity and a strong cytotoxic activity, and
(iii) a protein of approximately 120 kDa that was associated with a strong cytotoxic activity but not with hemolytic activity. Serotypes 6,7, and 12 produced only the 103-kDa protein, and serotype 10 produced only the 105-kDa protein. The other serotypes produced two proteins: serotypes 1,5,9, and 11 produced the 103- and 105-kDa proteins, and serotypes 2,3,4, and 8 produced the 103- and 120-kDa proteins.

Full text in English.

1) CDI-DLO

ACTINOBACILLUS PLEUROPNEUMONIAE

Cytolysins of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 9

M.A. Smits, J. Briaire, R. Jansen, H.E. Smith, E.M. Kamp, A.L.J. Gielkens[1)]

Infection and immunity 59, 1991, 4497-4504.

Cytolysin I (CylI) and cytolysin II (CylII), which are present in the culture supernatant of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 9, are thought to play an important role in the pathogenesis of pig pleuropneumonia.
The purpose of this study was to clone and characterize the genetic determinants of these cytolysins. Cloning was accomplished by the screening of DNA libraries for the presence of cytolytic activity and for the presence of DNA sequenes homologous to leukotoxin DNA of *Pasteurella haemolytica*. Both genetic determinants were found to be members of the RTX cytotoxin family. The CylII determinant was characterized in more detail. It appeared that CylII more closely resembled the leukotoxin of *P. haemolytica* than the alpha-hemolysin of *Escherichia coli*. The CylII amino acid sequence was identical to a hemolysin gene sequence of *A. pleuropneumoniae* serotype 5; this finding indicates that the latter gene also codes for CylII and not for CylI, as has previously been suggested. The genetic organization of the CylII determinant differed from the genetic organization of other RTX determinants. Genes responsible for secretion of CylII were not contiguous with the toxin gene. Instead, secretion genes were present elsewhere in the genome. These secretion genes, however, belong to the CylI operon. This indicates that the secretion genes of the CylI operon are responsible for secretion of CylI and CylII.

Full text in English.

1) CDI-DLO

ANAEROBIC BACTERIA

Pathogenic anaerobic bacteria and the environment

J. Haagsma[1)]

Office international des épizooties: Revue scientifique et technique 10, 1991, 749-764.

The distribution of pathogenic anaerobes in the environment and the relations with diseases in animals are discussed. A distinction between the spore-bearing anaerobes (clostridia) and the Gram-negative non-sporeforming anaerobes is necessary. The main habitat of clostridia is the soil but they are also found in dust, sewage, rivers, lakes, sea water, milk, vegetables, fresh meat, fish, insects and the intestinal tract. The Gram-negative non-sporeforming anaerobic bacteria are also widely distributed among animals, principally on mucous membranes of the alimentary tract. After a general introduction and a section on the isolation of anaerobes, the various diseases caused by clostridia (botulism, tetanus, blackleg, malignant oedema, infectious necrotic hepatitis, enterotoxaemia and gas gangrene) and Gram-negative anaerobes (infections due to *Fusobacterium* and *Bacteroides* spp., such as diphteria, footrot, etc.) are discussed. In particular, information concerning the reservoir of the causative agent and the mode of transmission is presented.

Full text in English.

1) CDI-DLO

BOTULISM

Botulismus bij runderen, een overzicht

Botulism in cattle, a review

J. Haagsma[1)]

Tijdschrift voor diergeneeskunde 116, 1991, 663-669.

Er wordt een overzicht gegeven van botulismus bij runderen, waarbij na de algemene gegevens over de aetiologie en de symptomatologie, de situatie in Nederland nader wordt belicht. In de laatste 15 jaar hebben zich verscheidene uitbraken van botulismus type C of D voorgedaan. Hierbij bleek pluimveestrooisel waarin toxische kadaverresten van kippen voorkwamen, de belangrijkste bron van het toxine te zijn. Botulismus type D trad de laatste jaren steeds sterker op de voorgrond, mogelijk mede omdat toxine type D geen ziekte bij pluimvee veroorzaakt en zodoende moeilijk tijdig is te onderkennen. Daarnaast zijn in 1977/1978 onder bijzondere omstandigheden gevallen van botulismus type B voorgekomen met bierbostel als bron van het toxine.
Er wordt daarna ingegaan op de moeilijkheden bij de diagnostiek, de differentieel-diagnostiek, de therapie, de preventieve mogelijkheden en de volksgezondheidsaspecten.

Full text in Dutch.

1) CDI-DLO

CLOSTRIDIUM PERFRINGENS

Testing strains of *Clostridium perfringens* type A isolated from diarrhoeic piglets for the presence of the enterotoxin gene

M. van Damme-Jongsten[1], J. Haagsma[2], S. Notermans[1]

The veterinary record 126, 1990, 191-192.

A diarrhoeic syndrome in piglets has been linked to *Clostridium perfringens* type A because this organism has been isolated in large numbers from all cases. The strains isolated from these cases and strains isolated from healthy piglets were screened for the enterotoxin gene of *C. perfringens* by DNA-hybridisation. Using two different synthetic DNA-probes, none of the strains isolated from diseased pigs was positive in this reaction, indicating that the enterotoxin of *C. perfringens* is not involved in the syndrome.

Full text in English.

1) National Institute of Public Health and Environmental Protection, Bilthoven, The Netherlands
2) CDI-DLO

CORYNEBACTERIUM PYOGENES

Effect of damage to the teat end on the experimental induction of mastitis in dry cows with *Corynebacterium pyogenes*

J.W. Seinhorst[1], J. Sol[2], U. Vecht[3]

The veterinary record 128, 1991, 54-56.

The teat ends of 12 dry cows were contaminated with *Corynebacterium pyogenes*. To determine whether a pre-existing (an)aerobic bacterial infection of the udder was a predisposing factor for a *C. pyogenes* mastitis they included infected and uninfected quarters. Anaerobic bacteria could not be found and mastitis was not induced. When the teats were contaminated with *C. pyogenes* after the teat ends had been injured 30 of the quarters became infected, and anaerobic bacteria were demonstrated in many quarters.

Full text in English.

1) Dairy Cattle Husbandry Research Institute, Lelystad, The Netherlands
2) Regional Animal Health Service, Zwolle, The Netherlands
3) CDI-DLO

LEPTOSPIRA INTERROGANS

Sample preparation method for polymerase chain reaction-based semiquantitive detection of *Leptospira interrogans* serovar *hardjo* subtype *hardjobovis* in bovine urine

M.J. Gerritsen, T. Olijhoek, M.A. Smits, B.A. Bokhout[1)]

Journal of clinical microbiology 29, 1991, 2805-2808.

An improved method of preparing bovine urine samples was developed for the rapid, specific, and sensitive detection of *Leptospira interrogans* serovar *hardjo* (subtype *hardjobovis*) DNA by the polymerase chain reaction (PCR). A total of 100 leptospire-free cows, 4 experimentally infected cows, and 2 negative control cows were used.
PCR results were improved by:
(i) using 10-ml urine samples instead of 1-ml samples,
(ii) adding 10^7 to 10^8 *Leptospira biflexa* serovar *patoc* cells as a carrier to each treated sample,
(iii) preventing the loss of pelleted leptospires, and
(iv) minimizing the presence of PCR-inhibiting factors in the samples.
The preparation method enabled us to use the PCR to reproducibly detect as few as 5 to 10 leptospires per ml of urine without the need for dot blot hybridization. In addition, we were able to estimate the number of leptospires shed by experimentally infected cows.

Full text in English.

1) CDI-DLO

LEPTOSPIRA INTERROGANS

The role of the common vole *(Microtus arvalis)* in the epidemiology of bovine infection with *Leptospira interrogans* serovar *hardjo*

T. Kuiken[1)], J.E. van Dijk[1)], W.J. Terpstra[2)], B.A. Bokhout[1)]

Veterinary microbiology 28, 1991, 353-361.

Control of leptospirosis in cattle depends on the presence of other possible maintenance hosts, with which cattle may have contact. Twenty-seven common voles *(Microtus arvalis)* were trapped on a dairy farm where the cattle were infected with *Leptospira interrogans* serovar *hardjo (hardjo)*. In the sera of 11 voles, titres $\geq$ 100 against serogroup *Grippotyphosa* were measured with the microscopical agglutination test (MAT). From 8 of these 11 voles, which also showed interstitial lymphoplasmacellular nephritis *Leptospira interrogans* serovar *grippotyphosa* was isolated. We found no evidence that the common vole is a maintenance host for *hardjo* in this biotope.

Full text in English.

1) CDI-DLO
2) WHO/FAO Collaborating Centre for Reference and Research on Leptospirosis, Royal Tropical Institute, Amsterdam, The Netherlands

LEPTOSPIRA INTERROGANS

Leptospirosa bij het varken; kanttekeningen bij de serologische diagnostiek van *Leptospira interrogans* serotype *bratislava*

Porcine leptospirosis. Remarks on the sero-diagnosis of *Leptospira interrogans* serotype *bratislava*

C.A.H. de Waal[1], E.G. Hartman[1], B.A. Bokhout[2], L.A.M.G. van Leengoed[2]

Tijdschrift voor diergeneeskunde 116, 1991, 173-179.

Leptospirose wordt als een belangrijke oorzaak van reproduktieverliezen bij varkens beschouwd. In dit verband is de laatste jaren het *Leptospira interrogans* serotype *bratislava (bratislava)* in de belangstelling gekomen. Dit artikel beschrijft resultaten van een oriënterend serologisch onderzoek op antistoffen tegen *bratislava*, uitgevoerd op een drietal varkensbedrijven. Twee van deze bedrijven hadden zeer goede reproduktieresultaten. Op een derde bedrijf met een hoog herdekpercentage, werd een beperkt longitudinaal onderzoek uitgevoerd. Op geen van deze bedrijven werd een relatie gevonden tussen de aanwezigheid van *bratislava* titers en reproduktiestoornissen.

Full text in Dutch.

1) Gezondheidsdienst voor Dieren in Gelderland, Velp
2) CDI-DLO

MYCOBACTERIUM PARATUBERCULOSIS

Mycobacterium paratuberculosis isolé chez des patients atteints de maladie de Crohn. Résultats préliminaires

Mycobacterium paratuberculosis isolated from patients with Crohn's disease

J. Haagsma[1], Ch.J.J. Mulder[2], A. Eger[1], G.N.J. Tytgat[3]

En 1913, Dalziel a décrit des observations compatibles avec une maladie de Crohn vraisemblablement en rapport avec une paratuberculose.
En 1984, Chiodini a isolé un *Mycobacterium paratuberculosis* chez des patients atteints de maladie de Crohn. Entre 1985 et 1990, nous avons isolé trois souches de *Mycobacterium tuberculosis.*
Depuis 1986, 4 autres groupes ont confirmé les résultats initiaux de Chiodini. Une étiologie microbienne de la maladie de Crohn, spécialement en rapport avec une mycobactérie type *M. paratuberculosis*, semble fondée sur des arguments de plus en plus prometteurs.

Full text in French.

1) CDI-DLO
2) Rijnstate Hospital, Arnhem, The Netherlands
3) Academic Medical Centre, Amsterdam, The Netherlands

MYCOPLASMA'S

Comparison of methods for in vitro testing of susceptibility of porcine *Mycoplasma* species to antimicrobial agents

E.A. ter Laak[1], A. Pijpers[2], J.H. Noordergraaf[1], E.C. Schoevers[2], J.H.M. Verheijden[2]

Antimicrobial agents and chemotherapy 35, 1991, 228-233.

The MICs of 18 antimicrobial agents used against strains of three porcine *Mycoplasma* species were determined by a serial broth dilution method. Twenty field strains of *M. hyorhinis*, ten field strains of *M.hyopneumoniae*, six field strains of *M.flocculare*, and the type strains of these species were tested. Twelve field strains and the type strain of *M.hyorhinis* were also tested by an agar dilution method. Tests were read at various time points. When the broth dilution method was used, the final MIC had to be read 2 days after color changes had stopped. MICs of tetracycline, oxytetracycline, doxy- cycline, and minocycline were low for the three *Mycoplasma* species tested. MICs of chlortetracycline were 8 to 16 times higher than MICs of the other tetracyclines. Spiramycin, tylosin, kitasamycin, spectinomycin, tiamulin, lincomycin, and clindamycin were effective against all strains of *M. hyorhinis* and *M. hyopneumoniae*. The quinolones were highly effective against *M. hyopneumoniae* but less effective against *M. hyorhinis*. The susceptibility patterns for *M. hyopneumoniae* and *M. flocculare* were similar.

Full text in English.

1) CDI-DLO
2) Faculty of Veterinary Medicine, University of Utrecht, Utrecht, The Netherlands

STREPTOCOCCUS SUIS TYPE 2

Identification of two proteins associated with virulence of *Streptococcus suis* type 2

U. Vecht, H.J. Wisselink, M.J. Jellema, H.E. Smith[1)]

Infection and immunity 59, 1991, 3156-3162.

The protein profiles of various cell fractions of 180 strains of *Streptococcus suis* type 2, which were isolated from diseased pigs, from healthy pigs when they were slaughtered, and from human patients, were analyzed by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and immunoblotting.
The isolates from diseased pigs contained two proteins that were absent in most of the isolates from healthy pigs. One of these proteins was a 136-kDa protein that was previously identified as the muramidase-released protein (MRP). This protein was predominantly detected in protoplast supernatants and culture supernatants. The second protein was a 110-kDa protein that was detected only in culture supernatants and therefore was provisionally called extracellular factor (EF). Three phenotypes of *S. suis* type 2 strains were recognized. Isolates from organs of diseased pigs mainly belonged to the MRP^+EF^+ phenotype (77%), while isolates from tonsils of healthy pigs mainly had the MRP^-EF^- phenotype (86%). Most of the isolates from human patients contained MRP (89%); 74% had the MRP^+EF^- phenotype. These findings confirm the results of previous investigations which demonstrated that *S. suis* type 2 strains differ in virulence. Monoclonal antibodies raised against the 110-kDa EF recognized proteins with higher molecular weights in culture supernatants of all of the strains with the MRP^+EF^- phenotype. However, none of the strains with the MRP^+ EF^+ phenotype produced these high-molecular weight proteins. Our results demonstrate that MRP and EF are associated with virulence. This suggests that one or both of these proteins are virulence factors that play a role in the pathogenesis of *S. suis* type 2 infections in pigs and human patients.

Full text in English.

1) CDI-DLO

TUBERCULOSIS

Tuberculose bij geïmporteerde alpaca's - een zoönose - en verder?

Tuberculosis in imported alpaca's in the Netherlands - a zoonosis - and further?

E.T.B. Dinkla[1], J. Haagsma[2], J.V. Kuyvenhoven[3], J. Veen[4], J.H.M. Nieuwenhuijs[5]

Tijdschrift voor diergeneeskunde 116, 1991, 454-460.

Er wordt een uitbraak van tuberculose door *Mycobacterium bovis* bij geïmporteerde alpaca's beschreven. Na een beschrijving van de ziekte-geschiedenis wordt nader ingegaan op de symptomatologie, het diagnostisch onderzoek met de huidtuberculinatie en de ELISA-test, de pathologische afwijkingen, het bacteriologisch onderzoek, de genomen controlemaatregelen en de wettelijke aspecten. Omdat tuberculose bij alpaca's niet in de Veewet wordt genoemd, moesten de controle-maatregelen worden gebaseerd op de Wet Bestrijding Infectieziekten en Opsporing Ziekte-oorzaken. In de discussie wordt er voor gepleit in de toekomstige Gezondheids- en Welzijnswet aandacht te schenken aan meer diersoorten dan uitsluitend het traditionele vee.

Full text in Dutch.

1) Gezondheidsdienst voor Dieren in Noord-Nederland, Drachten
2) CDI-DLO
3) Basis Gezondheidsdienst West- en Noord-Groningen, Bedum
4) Koninklijke Nederlandse Centrale Vereniging tot Bestrijding der Tuberculose, Groningen
5) Veterinaire Hoofdinspectie van de Volksgezondheid, Rijswijk

TUBERCULOSIS

Tuberculose bij alpaca's; een zoönose als importziekte

J. Veen[1)], J.V. Kuyvenhoven[2)], E.T.B. Dinkla[3)], J. Haagsma[4)], J.H.M. Nieuwenhuis[5)]

Nederlands tijdschrift voor geneeskunde 135, 1991, 1127-1130.

Het ontdekken van een groepsinfectie bij 12 alpaca's in Noord-Groningen in november 1988, die recentelijk uit Peru naar Nederland waren geïmporteerd, noodzaakte tot het instellen van een onderzoek bij personen en dieren die contact hebben gehad met de alpaca's. Bij de importeur en zijn assistent werd reeds longtuberculose vastgesteld, veroorzaakt door *Mycobacterium tuberculosis*, de dieren bleken later geïnfecteerd te zijn door *M. bovis*. De verzorger van de alpaca's en een laboratoriumassistent, aanwezig bij de secties, werden waarschijnlijk door contact met de dieren besmet. Elders in het land werd bij nog 3 alpaca's tuberculose gerapporteerd. Dit leidde tot een grootschalig onderzoek onder lama's, alpaca's en dergelijke, waarbij geen verdere gevallen van tuberculose werden ontdekt.
De mogelijkheid van het importeren van zoönosen, vooral in het Europa na 1992, wordt besproken.

Full text in Dutch.

1) Consultatiebureau voor Tuberculosebestrijding, Groningen
2) Basisgezondheidsdienst Noord- en West-Groningen, Bedum
3) Gezondheidsdienst voor Dieren Noord-Nederland, Drachten
4) CDI-DLO
5) Veterinaire Hoofdinspectie voor de Volksgezondheid, Rijswijk

VIBRIO CHOLERAE

Toxigenic *Vibrio cholerae* non-O:1 isolated from a goat in the Netherlands

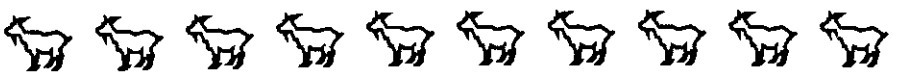
I.J.R. Visser[1], E.A. ter Laak[2], N.W. van Dijk[1], and W. Wouda[1]

The veterinary quarterly 13, 1991, 114-118.

A case of enterotoxicosis in a goat at necropsy is described. The animal had died without clinical signs. Toxigenic *Vibrio cholerae* non-O:1 was isolated from the intestines. This species has not been reported earlier from healthy or diseased farm animals, such as goats, in the Netherlands.

Full text in English.

1) Regional Animal Health Service, Drachten, The Netherlands.
2) CDI-DLO



MALE FERTILITY

Testis volumes, semen quality, and hormonal patterns in adolescents with and without a varicocele

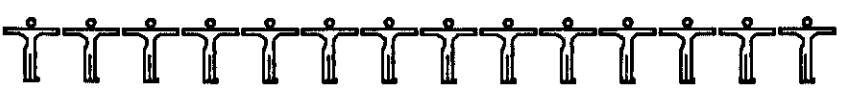
L.C. Haans[1], J.S. Laven[2], W.P. Mali[1], E.R. te Velde[1], C.J. Wensing[3]

Fertility and sterility 56, 1991, 731-736.

OBJECTIVE: To study the effects of varicocele on testicular function in adolescents. DESIGN: A prospective controlled study in 88 randomly selected adolescents. SETTING: All participants were referred to the fertility outpatient clinic of our University Hospital. PARTICIPANTS: All participants with a grade II varicocele (group 2) or a grade III varicocele (group 3) were selected at a district military medical council, whereas a similar group of healthy volunteers without a varicocele served as controls (group 3).
INTERVENTIONS: Testis volumes were measured using an orchiometer. Semen analysis was performed according to standard procedures, and serum hormone levels were determined using a radioimmunoassay.
MAIN OUTCOME MEASURE(S): Testis volumes, semen quality, and hormonal parameters in adolescents with and without a varicocele were compared.
RESULTS: In group 1 (n = 21), the mean left testis volume (24.5 mL; 95% confidence interval [CI]: 22.8 to 26.2) was significantly ($P<0.05$) different from group 2 (n = 15) (20.9 mL; 95% CI: 18.5 to 23.4) and group 3 (n = 52) (20.7 mL; 95% CI: 19.2 to 22.2) ($P<0.01$) adolescents. In adolescents with a pronounced varicocele-associated left testicular growth failure, the total sperm number was reduced. However, sperm concentration, motility, and morphology were not altered. Luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone, testosterone, and prolactin levels were all within the normal ranges in the three groups.
CONCLUSIONS: Left testicular growth failure, in adolescents with a varicocele is only associated with a decrease in total sperm number.

Full text in English.

1) University Hospital Utrecht, Utrecht, The Netherlands
2) Veterinary Faculty University of Utrecht, Utrecht, The Netherlands
3) CDI-DLO



POSTWEANING DIARRHEA

Etiologic and pathogenic studies on postweaning diarrhea. Scope of the thesis

M.J.A. Nabuurs[1)]

Thesis: University of Utrecht, Utrecht, 1991, pp. 7-11.

The scope of the thesis was:

- to investigate longitudinally pig herds with a long history of postweaning diarrhea for clinical signs and microbiological agents; and to relate rotavirus and enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) infections to the clinical signs;
- to measure villus height and crypt depth in the small intestine of these pigs after weaning, and to relate these measurements to clinical signs and to the prevalence of ETEC and rotavirus;
- to measure the effect of weaning and of supplemental feeding during the suckling period on villus height and crypt depth after weaning;
- to measure the effect of weaning, rotavirus infection, and supplemental feeding during the suckling period on net absorption in the small intestine of pigs after weaning, infected with ETEC;
- to measure the effect of decreased absorption in the large intestine on the pathogenesis of ETEC in weaned pigs.

Full text in English.

1) CDI-DLO

POSTWEANING DIARRHEA

Clinical and microbiological field studies of diarrhea in pigs at weaning time

M.J.A. Nabuurs[1)], F.G. van Zijderveld[1)], P.W. de Leeuw[2)]

Thesis: University of Utrecht, Utrecht, 1991, pp. 13-27.

A longitudinal study was performed to investigate the clinical signs and etiology of diarrhea in pigs at weaning time. Two litters of pigs were randomly selected from each of 4 herds with a history of postweaning diarrhea. Pigs were inspected and fecal samples were collected daily: from 1 week before weaning till 3 weeks after weaning in herds A and B, and from birth till 3 and 2 weeks after weaning in herds C and D. Pigs were weaned at 30 to 32 days of age. Fecal samples were examined bacteriologically by routine inoculation of the samples onto sheepblood agar plates; colonies were either typed directly or after they were subcultured. Fecal samples were examined virologically by ELISA and electron microscopy. Before weaning, enterotoxigenic *Escherichia coli* was isolated from only 2 pigs, both in the same litter. After weaning, however, enterotoxigenic and non-enterotoxigenic *E. coli* strains were isolated from all pigs. Different *E. coli* types appeared sequentially in the feces. Before weaning rotavirus was detected in almost all pigs of herds C and D and after weaning in most pigs of all 4 herds during 1 to 4 episodes. Pigs most frequently developed diarrhea during the second week after weaning (69%). Rotavirus or enterotoxigenic *E. coli* were generally detected at the same time that pigs had diarrhea; however, they were also detected in normal feces.

Full text in English.

1) CDI-DLO
2) Animal Health Service, The Hague, The Netherlands

POSTWEANING DIARRHEA

A comparative study of villus height and crypt depth in weaned and unweaned pigs, reared under various circumstances

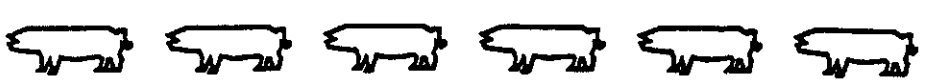
M.J.A Nabuurs[1)], A. Hoogendoorn[1)], E.J. van der Molen[1)†], A.L.M. van Osta[2)]

Thesis: University of Utrecht, Utrecht, 1991, pp. 29-41.

The relationship between weaning and villus height and crypt depth in the small intestine of pigs was studied under a variety of conditions. In experiment 1, pigs from 4 herds with a history of postweaning diarrhea (PWD) were compared at several times after weaning with pigs from a specific-pathogen-free (SPF) herd. In experiment 2, weaned SPF pigs and unweaned littermates were compared. In experiment 3, SPF pigs that were given supplemental feed during the suckling period were compared after weaning with littermates that were not so fed. In all experiments, villus height and crypt depth were measured at the 10%, 25%, 50%, 75%, and 95% sites along the small intestine. . .
From experiment 1, we concluded that mortality in PWD herds was associated with shorter villi, but not with deeper crypts. In all PWD pigs, diarrhea was associated with both shorter villi and deeper crypts. From experiment 2, we concluded that weaning is associated with villus shortening, crypt deepening, and subsequent villus lenghtening. From experiment 3, we concluded that giving supplemental feed during the suckling period is beneficial in apparently preventing villi from shortening and causing earlier deepening of crypts. In both experiments 1 and 3, we found that when crypts are deep at weaning, villi are prevented partly from shortening after weaning. We suggest that this condition may lessen the severity of PWD.

Full text in English.

1) CDI-DLO
2) TNO-Agricultural Mathematics Group, Wageningen, The Netherlands



POSTWEANING DIARRHEA

A long-term perfusion test to measure net absorption in the small intestine of weaned pigs

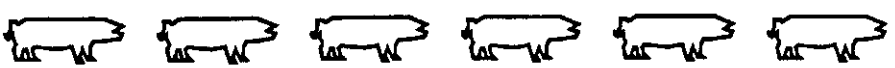
M.J.A. Nabuurs, P. de Vrey, A. Hoogendoorn, A.B. Korevaar[1)]

Thesis: University of Utrecht, Utrecht, 1991, pp. 43-53.

The purpose of this study was to develop a more comprehensive and ethic alternative to the ligated gut test (LGT), which is frequently used to study the effect of bacteria on net absorption in the small intestine of mammals. Six-4-week-old pigs, which had just been weaned, were anesthetized by inhalation anesthesia. Paired segments of the small intestine were prepared at the 10%, 25%, 50%, 75%, and 95% sites of the small intestine. The segments were fitted with a 3-mm-tube through which fluid was perfused and a 14-mm-tube through which fluid was perfused and a 14-mm-tube through which fluid drained. The cranial segment of every pair was infected with enterotoxigenic *Escherichia coli*, the caudal segments were injected with a control solution. The segments were continuously perfused in the craniocaudal direction for 10 hours, after which perfusion was stopped for 2 hours. Then pigs were killed by cutting of the oxygen supply in the gas mixture. Net absorption was determined as volume of inflow minus volume of outflow divided by the surface area of a segment. Outflow continued smoothly. Net absorption varied from 0.02 to 0.74 ml/cm^2 in infected segments and from 0.25 to 1.57 ml/cm^2 in uninfected segments. In both infected and uninfected segments, net absorption values and distance from stomach correlated well. Because the small intestine segment pefusion (SISP) test uses general anesthesia from start to finish, experimental pigs suffer no pain. Moreover, unlike the LGT, the SISP test does not necessitate extending the small intestine, a procedure which can affect net absorption. Unlike other perfusion tests, the SISP test analyzes five sites along the entire length of the small intestine, so that variations in absorption at different sites can be detected. Finally, in the SISP test, intestinal segments are perfused for a long time, so that even bacterial effects that are slowly developing can be detected.

Full text in English.

1) CDI-DLO



POSTWEANING DIARRHEA

Effects of weaning and enterotoxigenic *Escherichia coli* on net absorption in the small intestine of pigs

M.J.A. Nabuurs, A. Hoogendoorn, F.G. van Zijderveld[1)]

Thesis: University of Utrecht, Utrecht, 1991, pp. 55-66.

The purpose of this study was to measure net absorption in the small intestine of weaned pigs and of unweaned littermates infected or not with enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC). In addition, we correlated these values with villus height and crypt depth.
A total of 80 pigs were tested using a perfusion test. Paired segments were prepared at five sites along the small intestine; the cranial segment of each pair was injected with a strain of ETEC (0149:K91:K88); the caudal segment was injected with a saline solution. Pigs were tested on the day of weaning and on days 4, 7, 11, and 14 thereafter. Net absorption in all pigs and at all intestinal sites was significantly less in infected segments than in uninfected segments. In unweaned pigs, net absorption did not vary with time, neither in infected or uninfected segments. In contrast, however, in weaned pigs, net absorption varied with the time of testing and depending on whether segments were infected or not. In uninfected segments of weaned pigs, net absorption was significantly decreased on days 4, 7, and 14; in infected segments of these pigs, net absorption was significantly decreased on days 11 and 14. In unweaned pigs, no correlations were found between villus height or crypt depth with net absorption. In weaned pigs, in general, a positive correlation was found between villus height and net absorption in uninfected segments, but not in infected segments. No correlation was found between crypt depth and net absorption in either infected or uninfected segments. *(abstract truncated at 250 words).*

Full text in English.

1) CDI-DLO

POSTWEANING DIARRHEA

The effect of supplemental feeding during the suckling period on net absorption, villus height, and crypt depth in the small intestine of weaned pigs infected with *Escherichia coli*

M.J.A. Nabuurs, A. Hoogendoorn, A.M. van Zijderveld-van Bemmel[1)]

Thesis: University of Utrecht, Utrecht, 1991, pp. 67-78.

The purpose of this study was to measure effects of daily supplemental feeding during the suckling period on net absorption, villus height, and crypt depth in the small intestine of weaned pigs infected with enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC). Net absorption was measured in 5 paires of segments that were perfused for 10 hours. Cranial segments of pairs were infected with ETEC and caudal segments were uninfected. In 2 experiments, littermates of 14 litters were compared under different feeding regiments. In experiment 1, pigs of 1 group were temporarily (8 hours a day) weaned and fed a solid feed during that time (TWF pigs), and the other pigs remained continuously with the sow (CWS pigs). In experiment 2, pigs of a litter were allotted to 3 equal groups: TWF pigs, CWS pigs and pigs that were temporarily (8 hours a day) weaned (TW pigs) and not given a supplemental feed. In experiment 2, we also measured villus height and crypt depth . . .
We conclude that when pigs are temporarily weaned and are given supplemental feed during the suckling period, they are partly prevented from the usual decrease of net absorption in uninfected and in ETEC-infected segments after weaning and they are also partly prevented from the usual villus shortening after weaning. Thus, these pigs may partly be prevented from the adverse effects of weaning.

Full text in English.

1) CDI-DLO

POSTWEANING DIARRHEA

Effects of rotavirus on net absorption, villus height, and crypt depth, and of rotavirus and *Escherichia coli* on net absorption in the small intestine of weaned pigs

M.J.A. Nabuurs, A. Hoogendoorn, J.E. van Dijk[1)]

Thesis: University of Utrecht, Utrecht, 1991, pp. 79-91.

The purpose of this study was to measure effects of rotavirus infection on net absorption, villus height and crypt depth, and of rotavirus and *Escherichia coli* infection on net absorption in the small intestine of weaned pigs. Net absorption was measured on day 8 after weaning, four times (N=16) with a perfusion test and three times (N=12) with a modified xylose test. The perfusion test was performed on pigs that had been infected with rotavirus 1, 3, and 7 days before testing; one uninfected pig was used as a control. Five pairs of segments that were prepared at the 10%, 25%, 50%, 75%, and 95% sites along the small intestine were perfused for 10 hours; villus height and crypt depth were measured at the same sites. The cranial segment of each pair was injected with enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) and the caudal segment with a saline solution. Pigs infected with rotavirus 1 day before testing had significantly greater net absorption in control segments and significantly less net absorption in ETEC segments than other pigs, in which net absorption did not vary significantly. The modified xylose test was performed in two pigs that had been infected with rotavirus 1 day before testing, two uninfected pigs were used as controls. Five hours before the test one pig of each group was infected with ETEC. Plasma xylose concentrations did not vary significantly between groups. In pigs infected with rotavirus 1 day before testing, villi were significantly shorter at the 10% site than in control pigs and in pigs infected 7 days before testing. *(abstract truncated at 250 words).*

Full text in English.

1) CDI-DLO

POSTWEANING DIARRHEA

The influence of ileal flow reduction on weaned pigs perfused with *Escherichia coli* heat labile toxin

M.J.A. Nabuurs, G.J. de Graaf, A. Hoogendoorn, F.G. van Zijderveld[1)]

Thesis: University of Utrecht, Utrecht, 1991, pp. 93-106.

The purpose of the study was to determine how impaired absorption in the large intestine, simulated by reducing the ileal flow (Simulated Impaired Absorption, SIA), influences the adverse effects of *Escherichia coli* heat labile toxin (LT) in weaned pigs. The small intestine of weaned pigs were perfused with a suspension of LT administered through a duodenal fistula every two hours for 34 hours. Small intestinal content drained from a cranial ileal fistula and was termed ileal flow; the ileal flow was returned to the ileum by a caudal ileal fistula. In 8 of the 16 pigs, the ileal flow was reduced to half (SIA pigs); in 8 of the 16 pigs ileal flow was not reduced (control pigs). Ileal flow was totalled for each 2-hour period. Because ileal flow fluctuated it was expressed as moving average of three consecutive 2-hours periods, which were named episodes. In episodes 4 to 8, ileal flow in SIA pigs was significantly greater than in the other pigs and in episodes 16 and 17 significantly less. The amount of water drunk by both groups differed less throughout the experiment. Four hours after the first LT perfusion, the serum concentration of potassium rose significantly in the SIA pigs and continued to rise steadily throughout the experiment. All of the SIA pigs died from hyperkalemia 28 to 36 hours after the first LT perfusion; only 1 control pig died from hyperkalemia, 46 hours after the first LT perfusion. From 10 hours after the first LT perfusion until pigs died, the serum concentration of sodium in the SIA pigs was significantly less than in the other pigs and, during the same time, the plasma concentration of aldosterone was significantly higher in SIA pigs than in the other pigs. *(abstract truncated at 250 words).*

Full text in English.

1) CDI-DLO

POSTWEANING DIARRHEA

Aetiologische en pathogenetische aspecten van diarree bij biggen na het spenen

Etiological and pathogenic aspects of postweaning diarrhea

M.J.A. Nabuurs[1)]

Tijdschrift voor diergeneeskunde 116, 1991, 1175-1182.

In dit artikel wordt ingegaan op de aetiologie en de pathogenese van speendiarree. Naast eerder verkregen onderzoeksresultaten wordt vooral aandacht besteed aan de meest recente gegevens. Behalve microbiële agentia, zoals een beperkt aantal serotypen van *Escherichia coli* en rotavirussen, lijken voederregime tijdens de zoogperiode en bepaalde componenten in het voer belangrijke aetiologische factoren te zijn die het optreden van speendiarree kunnen veroorzaken. Pathogenetisch is vooral het voorkomen en de mate van vlokverkorting na het spenen van belang; recent herstelde villi kunnen gevoeliger zijn voor *Escherichia coli*-toxinen dan nog niet geregenereerde villi. De resorptie van natrium en vocht in de dikke darm lijkt eveneens van belang in de pathogenese van SD.

Full text in Dutch.

1) CDI-DLO

AVIAN IMMUNITY

Ontogeny and function of two non-lymphoid cell populations in the chicken embryo

E.M. Janse, S.H.M. Jeurissen[1)]

Immunobiology 182, 1991, 472-481.

The purpose of the study was to determine what type of nonlymphoid cells develop in chicken embryos during ontogeny, and whether these cells are functional. To detect these cells, we used monoclonal antibodies specific to two groups of nonlymphoid cells: CVI-ChNL-68.1, specific for mononuclear phagocytes, and CVI-ChNL-68.2, specific for a subpopulation of reticulum cells in spleen, liver and bursa. Monoclonal antibodies HIS-C7, HIS-C1, and HIS-C12, which are specific to leukocytes, B lymphocytes, and IgM respectively, were used to correlate the ontogeny of nonlymphoid cells and lymphoid cells. Mononuclear phagocytes and reticulum cells were detected in the liver, spleen, yolk sac, bursa, gut, and thymus at about the same time as leukocytes, but earlier than B lymphocytes. To determine whether mononuclear phagocytes and reticulum cells in spleen and liver absorb antigen, we injected embryos intravenously with colloidal carbon and the antigen FITC-Ficoll. In addition, acid phosphatase was used as a marker for phagocytic activity. Reticulum cells in the liver and spleen were functional from the first point of detection, whereas mononuclear phagocytes in the liver and spleen started to absorb antigen a few days after their development.

Full text in English.

1) CDI-DLO

AVIAN IMMUNITY

Het immuunsysteem bij pluimvee

The avian immune system

G. Koch[1)]

Tijdschrift voor diergeneeskunde 116, 1991, 728-734.

In dit artikel wordt een overzicht gegeven van het immuunsysteem bij vogels. Het immuunsysteem van vogels onderscheidt zich voornamelijk van dat van zoogdieren in de aan-/afwezigheid van de lymphoïde organen en de histologie van deze organen, in de antilichaamrespons, in de vorming van het antigeenrepertoire van antilichamen en in de transfer van maternale antilichamen. Het immuunsysteem van vogels zal worden besproken aan de hand van dat van kippen omdat het meeste aviaire immunologsche onderzoek bij dit dier verricht is.

Full text in Dutch.

1) CDI-DLO

MUCOSAL IMMUNITY

Induction of an enteric Ig-response against ovalbumin and stimulation of the response by cholera toxin and its B-subunit in mice

A.T.J. Bianchi, R.J. Zwart, P.J. van der Heijden[1)]

Regional immunology 3, 1990/1991, 131-138.

We induced ovalbumin (OA)-specific antibody responses in the murine small intestine and quantitated the responses by counting ovalbumin-specific antibody-containing cells (OACC) in the intestinal lamina propria, and by measuring anti-OA Ig titers in intestinal secretions. OA is a "weak" mucosal antigen and we could only induce intestinal anti-OA responses by intraperitoneal, primary injection of OA in water-in-oil emulsion and a mucosal booster with OA. Double staining of OACC for OA- and isotype-specificity demonstrated that 95% of all mucosal (intestinal) OACC produced IgA, whereas 95% of all systemic (splenic) OACC produced IgG. The intestinal anti-OA response could be stimulated by addition of cholera toxin (CT) or cholera toxin B-subunit (CTB) during the mucosal booster immunization. The stimulatory effect of CT did not depend on covalent coupling of CT and OA, while the stimulatory effect of CTB required covalent coupling of CTB with OA. Mucosal (intraduodenal) application of OA as such does not prime for a mucosal and systemic OACC response but induces tolerance. We demonstrated that coupling of OA with CT or CTB could overcome the inability of mucosal application of OA to prime for a mucosal OACC response. Although CT proved to be much more effective than CTB in stimulation of mucosal immune responses and possibly in prevention of tolerance induction, our results indicate that CTB is a useful (and safer) alternative.

Full text in English.

1) CDI-DLO

MUCOSAL IMMUNITY

Mucosale immuniteit

P.J. van der Heijden, A.T.J. Bianchi[1)]

Tijdschrift voor diergeneeskunde 115, 1990, 1058-1064.

Het mucosale immuunsysteem beschermt het individu tegen infecties welke via de slijmvliezen (mucosae) binnendringen. Kennis omtrent het functioneren van het mucosale immuunsysteem is dan ook van groot belang voor het beter kunnen activeren van het mucosale systeem door middel van vaccinatie. In dit artikel wordt beschreven hoe het mucosale immuunsysteem functioneert en op welke manier een respons tot stand komt. Ook wordt aangegeven welke vaccinatiemethoden op dit moment de beste mogelijkheden bieden voor een optimale inductie van een beschermende mucosale immuunrespons tegen bacteriële of virale infecties. Dit artikel draagt tevens bij aan de discussie over de mogelijkheden of onmogelijkheden tot mucosale vaccinatie tegen parasitaire infecties.

Full text in Dutch.

1) CDI-DLO

MUCOSAL IMMUNITY

Manipulation of intestinal immune responses against ovalbumin by cholera toxin and its B subunit in mice

P.J. van der Heijden, A.T.J. Bianchi, M. Dol, J.W. Pals, W. Stok, B.A. Bokhout[1)]

Immunology 72, 1991, 89-93.

We studied the effect of mucosal presentation of ovalbumin (OVA) conjugated to cholera toxin (CT) or cholera toxin B subunit (CTB) on the intestinal immune responses against OVA. Mice were primed intraperitoneally (i.p.) with OVA in a water-in-oil emulsion and boosted intraduodenally (i.d.) with OVA conjugated to CT or CTB in various molar ratios. Responses were evaluated by testing intestinal secretions for OVA-specific antibodies and by quantifying the OVA-specific antibody secreting cells (ASC) in the lamina propria of the small intestine. OVA-CT conjugates were tested in a molar ratio ranging from 1.8:1 to 4500:1. OVA-CTB conjugates were tested in a molar ratio ranging from 0.25:1 to 500:1. The optimum intestinal immune response was reached at a molar ratio of 1.8:1 for OVA-CT and 5:1 for OVA-CTB. The binding capacity of OVA-CTB, but not of OVA-CT, to GM1 ganglioside corresponded with the capacity to enhance the intestinal immune response. The effect of conjugating CTB or CT to OVA on the immune response against OVA was more striking when mice were not only boosted i.d., but also primed i.d. Both OVA-CT and OVA-CTB induced detectable immune responses, whereas free OVA did not. Therefore, the carrier effect of CT or CTB is essential to trigger a mucosal immune response against OVA when presented mucosally only. We conclude that enhancing antigen uptake greatly facilitates mucosal immune responses.

Full text in English.

1) CDI-DLO

T-LYMPHOCYTES

Phenotype of intraepithelial lymphocytes in euthymic and athymic mice: implications for differentiation of cells bearing a CD3-associated γδ T cell receptor

B. de Geus[1], M. van den Enden[1], C. Coolen[1], L. Nagelkerken[1], P. van der Heijden[2], J. Rozing[1]

European journal of immunology 20, 1990, 291-298.

This study was carried out to determine the exact phenotype of intraepithelial lymphocytes (IEL) in euthymic and athymic nude mice. The phenotype of IEL in euthymic and athymic mice is mainly $CD3^+CD8^+$. However, based on Thy-1-and CD3-associated receptor expression we can subdivide the CD3CD8 population into different subpopulations in euthymic and athymic mice. In euthymic and athymic mice several CD3CD8 populations can be defined. One population expressing Thy-1 and the T cell receptor (TcR) αβ is absent in athymic mice. Two other $CD3^+CD8^+$ populations can be detected in euthymic and athymic mice. Based on Northern blot and flow cytometric analysis we have to conclude that these populations express the CD3-associated TcR γδ. One of the TcR γδ-expressing populations also expresses Thy-1 at low surface density. This is in contrast to the CD3CD8 population expressing the TcR αβ, which expresses Thy-1 at high surface density. There are also, however, especially in athymic nude mice, significant numbers of $CD3^-CD8^+$ cells present with the same localization as IEL. The function of these cells is yet unknown. Using a probe for the δ chain we have shown that IEL preferentially express 2-kb mRNA, while nearly no δ chain 1.7-kb mRNA is expressed by these cells. This is in contrast to δ mRNA in thymocytes. Equal quantities of the 1.7- and 2.0-kb δ chain mRNA species were found in RNA isolated from thymocytes.
The results imply that $CD3^+CD8^+$ intestinal IEL expressing the CD3-associated TcR γδ can differentiate in absence of the thymus and represent a thymus-independent lineage of cells bearing this receptor.

Full text in English.

1) TNO, Institute of Experimental Gerontology, Rijswijk, The Netherlands
2) CDI-DLO

T-LYMPHOCYTES

Peptidergic innervation of the Bursa Fabricii: interrelation with T-lymphocyte subsets

H.J. Zentel[1)], D. Nohr[1)], R. Albrecht[1)], S.H.M. Jeurissen[2)], O. Vainio[3)], E. Weihe[1)]

International journal of neuroscience 59, 1991, 177-188.

In birds, B-lymphocytes mature in a special immune organ, the Bursa Fabricii. This organ thus offers unique possibilities for the study of the microenvironment of B-lymphocyte differentiation. We previously reported tachykinin-, vasoactive intestinal peptide-, calcitonin gene-related peptide- and galanin-immuno-reactive (ir) fibres in the chicken bursa. As judged from light microscopic studies, each of the peptides was found in fibres contacting B-lymphocytes. Vasoactive intestinal peptide-ir fibres contacted macrophages. Now, we demonstrate neuropeptide Y, indicating the sympathetic nervous system, in fibres associated with arteries, not entering the follicles. CD4- and CD8-positive T-lymphocytes were dispersed in bursal follicles and the connective tissue, most densely in subepithelial regions. We could not find close apposition of fibres with either T-cell subset. We conclude that the potential neuro-immune axis in the Bursa Fabricii may represent a neuro-B-cell-link with only indirect participation of T-lymphocytes. The sympathetic input may influence the bursal micro-environment primarily by regulating the blood supply.

Full text in English.

1) Institute for Anatomy, Joh. Gutenberg-University, Mainz, Germany
2) CDI-DLO
3) Department of Medical Microbiology, Turku University, Finland

PEPSCAN

Immune response and epitope mapping of a candidate HIV-1 p17 vaccine HGP30

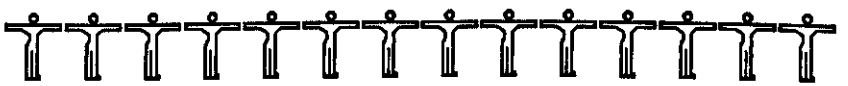
C.A. Boucher[1], W.J. Krone[1], W.J. Goudsmit[1], R.H. Meloen[2], P.H. Naylor[1], A.L. Goldstein[1], D.K. Sun[1], P.S. Sarin[1]

Journal of clinical laboratory analysis 4, 1990, 43-47.

A thirty amino acid synthetic peptide (HGP30) representing the conserved region of HIV-1 p17 induced high titer antibodies to the native p17 in rabbits. This immune sera neutralized HIV-1 replication in cell culture and one of the high titer antisera also inhibited CD4-dependent cell fusion. Pepscan analysis with overlapping nonapeptides derived from the sequence of HIV-1 p17 indentified the sequence (KE) ALDKIEE (EQ) as the major antibody binding site. Sera of 9% of AIDS patients (7/76) and 18% of HIV-1 seropositive healthy homosexuals (40/223) were positive for HGP30 antibodies. Decline in HIV-1 p17 antibodies has been shown to be related to disease progression in both children and adults, suggesting that HIV-1 p17 antibodies may be protective. Hence, a synthetic HIV-1 p17 peptide, representing the immunodominant epitope, could be useful as a candidate vaccine for immunization of HIV-1 seronegative or seropositive healthy homosexuals.

Full text in English.

1) Academic Medical Centre, University of Amsterdam, Amsterdam, The Netherlands
2) CDI-DLO



PEPSCAN

Characterization of murine monoclonal antibodies to the *tat* protein from human immunodeficiency virus type 1

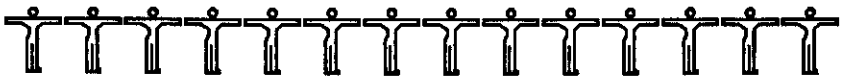
D.A. Brake[1], J. Goudsmit[2], W.J.A. Krone[2], P. Schammel[3], N. Appleby[3], R.H. Meloen[4], C. Debouck[1]

Journal of virology 64, 1990, 962-965.

A panel of murine monoclonal antibodies (MAbs) to the human immunodeficiency virus type 1 *trans* activator *tat* protein were characterized. The anti-*tat* MAbs were mapped to the different domains of the *tat* protein by Western blot (immunoblot) and Pepscan analyses. One-half of the MAbs tested mapped to the amino-terminal proline-rich region, and one-third of the MAbs tested mapped to the lysine-arginine-rich region of *tat*. The individual MAbs were tetsted for inhibition of *tat* -mediated *trans* activation, using a cell-based *in vitro* assay system. MAbs which mapped to the amino-terminal region of the *tat* protein demonstrated the highest degree of inhibition, whereas MAbs reactive to other portions of the molecule exhibited a less pronounced effect on *tat* function.

Full text in English.

1) *Smith Kline and French Laboratories, King of Prussia, Pennsylvania,* USA
2) Academic Medical Center, Amsterdam, The Netherlands
3) Beckman Instruments, Irvine, California
4) CDI-DLO



PEPSCAN

Map of sequential B cell epitopes of the HIV-1 transmembrane protein using human antibodies as probe

J. Goudsmit[1], R.H. Meloen[2], R. Brasseur[1]

Intervirology 31, 1990, 327-338.

Antibodies of individuals infected with the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) were used to probe the antigenicity of the HIV-1 transmembrane protein of 41 kD (gp41) by antibody-reactive peptide scanning (Pepscan). Eleven distinct sequential antibody-binding sites were defined by testing reactivity to 339 overlapping nonapeptides spanning the complete gp41 amino acid sequence. Such analysis only maps continuous antibody-binding sites of nine amino acids in length and does not identify putative discontinuous or assembled epitopes. Three B cell epitopes (aa 609-622; aa 655-699; aa 664-681) at the amino-terminal border of the putative transmembrane anchor and two (aa 732-748; aa 744-762) at the carboxyl-terminal border of this domain were the most antigenic. One antibody-binding domain,(aa 834-852) with four amino acids homologous to the beta-1 domain of HLA class II beta-chain was recognized by the serum in 1 of 4 AIDS patients tested and not by any of the eight sera from symptomfree individuals. Although functional domains of gp41 involved in virus replication, cytopathicity and possibly immunosuppression were shown to bind antibodes of HIV-1-infected individuals, no relationship between antibody recognition patterns and disease progression was apparent.

Full text in English.

1) Academic Medical Center, University of Amsterdam, Amsterdam, The Netherlands
2) CDI-DLO

PEPSCAN

HLA polymorphism and T cell recognition of a conserved region of p190, a malaria vaccine candidate

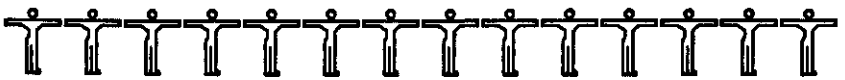
M. Guttinger[1], P. Romagnoli[1], L. Vandel[1], R. Meloen[2], B. Takacs[1], J. Pink[1], F. Sinigaglia[1]

International immunology 3, 1991, 899-906.

We have examined T cell recognition of a recombinant polypeptide (190L), corresponding to a 175-amino-acid-long conserved region of the major surface antigen (p190) of *Plasmodium falciparum* merozoites. We show that 190L contains a variety of T cell epitopes, and can be recognized in association with many different MHC class II molecules, including HLA-DR, DP, and DQ antigens. Most of the epitope-containing peptides are able to bind to more than one DR, and a single DR molecule can bind to different peptides. These findings, together with the fact that humans are generally heterozygous at the DR, DQ, and DP β chain loci, suggest that MHC restriction should not be a major constraint in the development of malaria subunit vaccines.

Full text in English.

1) Pharma Research Technology, F. Hoffmann-La Roche Ltd, Basel, Switzerland
2) CDI-DLO



PEPSCAN

Protection against lethal Sandai virus infection by *in vivo* priming of virus-specific cytotoxic T lymphocytes with a free synthetic peptide

W.M. Kast[1)], L. Roux[1)], J. Curren[1)], H.J. Blom[1)], A.C. Voordouw[1)], R.H. Meloen[2)], D. Kolakofsky[1)], C.J. Melief[1)]

Proceedings of the national academy of sciences USA 88, 1991, 2283-2287.

The only peptide of Sendai virus that is recognized by cytotoxic T. lymphocytes (CTL) in B6 mice was found with
(i) the use of recombinant vaccinia virus constructs containing separate genes of Sendai virus and
(ii) a set of overlapping peptides completely spanning the identified nucleoprotein (NP) gene product.
This immunodominant NP peptide is recognized by Sendai virus-specific CTL that are known to have therapeutic effects *in vivo*. By subcutaneous immunization, this peptide induced Sendai virus and NP peptide-specific CTL memory repsonses *in vivo*. Most importantly, mice that had been immunized with this peptide were protected against a lethal virus dose, indicating that viral peptides can be used as antiviral T-cell vaccines. The induction of T-cell memory by free peptide immunization potentially had wide applicability in biology and medicine, including protection against infectious disease.

Full text in English.

1) The Netherlands Cancer Institute, Amsterdam, The Netherlands
2) CDI-DLO

PEPSCAN

Neutralizing activity of anti-peptide antibodies against the principal neutralization domain of human immunodeficiency virus type 1

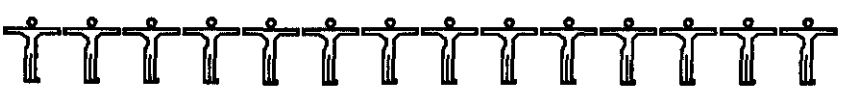
J.P.M. Langedijk[1], N.K.T. Back[2], P.J. Durda[3], J. Goudsmit[2], R.H. Meloen[1]

Journal of general virology 72, 1991, 2519-2526.

Monoclonal antibodies (MAbs) raised against a 15-mer peptide representing the centre of the principal neutralization domain of human immunodeficiency virus type 1 (strain BH10) showed wide variations in neutralizing activity against the homologous strain. The nature of this difference in neutralizing activity was studied by measuring antibody concentration, their affinity for peptide and specificity, by reaction with peptides which differed in the extent of sequence overlap, length and the presence of single amino acids replacements. All MAbs bound to approximately the same region in the principal neutralization domain, within the sequence RIQRGPGRAFV. The peptides with which each antibody was able to react differed by only a few amino acids. The neutralizing activity of each MAb preparation was related to its affinity and concentration; the affinity is related in part to the fine structure of the epitope recognized. MAbs with high affinity for the peptide tended to react only with peptides in which amino acid replacements did not affect the β-turn potential of the peptide, whereas the reactivity of MAbs with low affinity was relatively insensitive to amino acid replacements affecting the β-turn potential.

Full text in English.

1) CDI-DLO
2) Academic Medical Center, Amsterdam, The Netherlands
3) DuPont, Biotechnology Systems, North Billerica, Massachusetts, U.S.A.



PEPSCAN

The use of peptides to reconstruct conformational determinants; a brief review

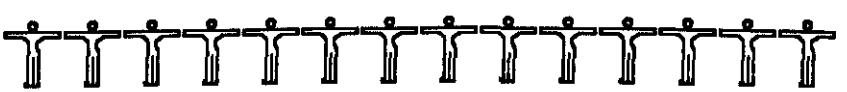
R.H. Meloen[1)], A. van Amerongen[1)], M. Hage-van Noort[1)], J.P.M. Langedijk[1)], W.P.A. Posthumus[1)], W.C. Puyk[1)], H. Plasman[2)], J.A. Lenstra[2)], J.P.M. Langeveld[1)]

Annales de biologie clinique 49, 1991, 231-242.

In many biological processes, defined regions of proteins are involved in selective recognition. These regions can often be mimicked with peptides and are the main targets for vaccine and drug development. The authors review the use of peptides, to define and ultimately mimic defined protein regions of interest. Especially the role of the Pepscan method is emphasized. This method has been proven to be a useful and fast tool in defining protein regions of interest. It is based on the simultaneously synthesis of multiple peptides coupled to solid supports. Hundreds of peptides can be produced and tested in a relatively short period of time. With the construction of random peptide libraries in recombinant DNA systems, it is now even possible to screen for peptidic determinants without the requirement of preliminary knowledge of primary structure. Having this information, the affinity of peptides can be further enhanced with the Pepscan approach. The power of this approach will be illustrated with results from studies on the development of synthetic vaccines and hormone analogues.

Full text in English.

1) CDI-DLO
2) Faculty of Veterinary Medicine, University of Utrecht, Utrecht, The Netherlands



PEPSCAN

A new attempt to distinguish serologically the subspecies of *Treponema pallidum* causing syphilis and yaws

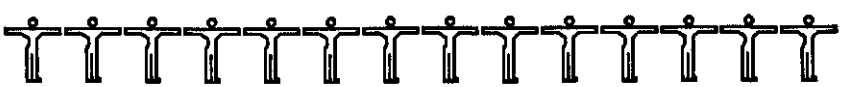
G.T. Noordhoek[1], A. Cockayne[2], L.M. Schouls[1], R.H. Meloen[3], E. Stolz[4], J.D.A. van Embden[1]

Journal of clinical microbiology 28, 1990, 1600-1607.

In an effort to serologically differentiate syphilis from yaws, 69 monoclonal antibody species raised against *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* were tested by immunoblotting for their reactivity with *Treponema pallidum* subsp. *pertenue*.
All monoclonal antibodies reacted with antigens with the same molecular weight of both subspecies. Furthermore, no differences in reactivity between sera from yaws patients and from syphilis patients were found by Western blot (immunoblot) analysis of cell lysates of *T. pallidum* subsp. *pallidum* and *T. pallidum* subsp. *pertenue*. We tried to exploit the only known molecular difference between the subspecies. The subunits of the 190-kilodalton multimeric proteins TpF1 and TyF1 of *T. pallidum* subsp. *pallidum* and *T. pallidum* subsp. *pertenue*, respectively, have previously been shown to differ in one amino acid residue at position 40.
In this study, no difference was found in immunoreactivity of TpF1 or TyF1 with either syphilis sera or yaws sera. Synthetic peptides based on the sequence of TpF1 and of TyF1 were used in enzyme-linked immunosorbent assay with syphilis sera and yaws sera. Again, no difference in reactivity between the *T. pallidum* subsp. *pallidum*- and *T. pallidum* subsp. *pertenue*-derived peptides was observed.

Full text in English.

1) National Institute of Public Health and Environmental Protection, Bilthoven, The Netherlands
2) University Hospital, Queen's Medical Centre, Nottingham, United Kingdom
3) CDI-DLO
4) University Hospital Rotterdam, Rotterdam, The Netherlands



PEPSCAN

Delineation of canine parvovirus T cell epitopes with peripheral blood mononuclear cells and T cell clones from immunized dogs

G.F. Rimmelzwaan[1], M.C. Poelen[1], R.H. Meloen[2], J. Carlson[1], F.G. UytdeHaag[1], A.D. Osterhaus[1]

Journal of general virology 71, 1990, 2321-2329.

Three synthetic peptides derived from the amino acid sequence of VP2 of canine parvovirus (CPV) which were recently shown to represent three distinct T cell epitopes for BALB/c mice could prime BALB/c mice for a CPV-specific proliferative T cell response upon immunization. Proliferative responses of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from CPV-immunized dogs upon stimulation with these and other peptides, covering the major part of the sequence of VP2', identified the presence of T cell epitopes for this species. Most of these epitopes were recognized by PBMC from only a minority of the dogs tested. With three newly generated canine Thy1$^+$ T cell clones, which recognized CPV antigen in association with major histocompatibility complex class II molecules, two distinct T cell epitopes were identified within the unique sequence of VP1.

Full text in English.

1) National Institute of Public Health and Environmental Protection, Bilthoven, The Netherlands
2) CDI-DLO

PEPSCAN

Identification of linear epitopes on Semliki Forest virus E2 membrane protein and their effectiveness as a synthetic peptide vaccine

A. Snijders[1], B.J. Benaissa-Trouw[1], T.A.M. Oosterlaken[1], W.C. Puijk[2], W.P.A. Posthumus[2], R.H. Meloen[2], W.A.M. Boere[1], J.D. Oosting[1], C.A. Kraaijeveld[1], H. Snippe[1]

Journal of general virology 72, 1991, 557-565.

Semliki Forest virus (SFV) *infection of mice was used as a model to study* the applicability of synthetic peptides containing only linear epitopes as viral vaccines. The identification of linear epitopes with vaccine potential on the E2 membrane protein of SFV was based on the binding of SFV-specific antibodies to a set of overlapping synthetic hexapeptides (Pepscan) representing the whole E2 amino acid sequence. The 14 available E2-specific monoclonal antibodies which were protective *in vivo* proved to be unsuitable for the identification of linear epitopes because they recognized only conformational epitopes, as indicated by their lack of reactivity with unfolded, reduced E2 protein on immunoblots. Three epitopes were detected with polyclonal anti-SFV serum at amino acid positions 135 to 141, 177 to 185 and 240 to 246 of the E2 protein. Synthetic peptides containing these epitopes were coupled to a carrier protein and tested as a vaccine. Mice immunized with the peptide containing amino acids 240 to 255 of protein E2 were protected against a challenge with virulent SFV but protection of mice immunized with the peptides containing amino acids 126 to 141 or 178 to 186 was only marginally better than that of controls. The prechallenge sera of most peptide-immunized mice reacted with SFV-infected cells but none of these sera neutralized the virus *in vitro.* However, protection of mice correlated well with SFV-specific antibody titre, suggesting antibody-mediated protection.

Full text in English.

1) Academic Hospital, Utrecht, The Netherlands
2) CDI-DLO

PEPSCAN

New B cell epitopes in the *Plasmodium falciparum* malaria circumsporozoite protein

D. Stüber[1], W. Bannwarth[1], J.R.L. Pink[1], R.H. Meloen[2], and H. Matile[1]

European journal of immunology 20, 1990, 819-824.

Most antibodies directed against the *Plasmodium falciparum* circumsporozoite (CS) protein react with its central domain, which contains about 40 repeats of the tetrapeptide Asn-Ala-Asn-Pro (NANP). To search for new epitopes in the non-repetitive part of the CS protein, we expressed the non-repetitive regions of the protein in *E. coli* as fusion proteins with mouse dihydrofolate reductase linked to six adjacent histidine residues. These fusion proteins were obtained at 70% purity by a single Ni-chelate affinity chromatography step. Of the new epitopes defined in the C-terminal portion of the CS protein, three are located in a stretch of 65 amino acids immediately C-terminal of the protein's central repetitive domain. Pooled sera from inhabitants of a malaria-endemic area reacted with epitopes in this region of the molecule, and four mouse monoclonal antibodies to this region also reacted with the native CS protein on sporozoites. Two of the monoclonal antibodies reacted with a peptide PNDPNRNVD derived from a conserved region of the CS protein. The other two antibodies showed different reactivities to sporozoites of the NF54 and Ro59 parasite isolates. One, which reacted with a peptide ENANANNAV, recognized Ro59 but not NF54 sporozoites, while the other reacted with a small percentage of NF54 but not Ro59 sporozoites. Antibodies which react with non-repetitive regions of the CS protein could contribute to maintaining its genetic variability.

Full text in English.

1) Central Research Units, F. Hoffmann-La Roche Ltd., Basel, Switzerland
2) CDI-DLO

PEPSCAN

Characterization of human antibody-binding sites on the external envelope of human immunodeficiency virus type 2

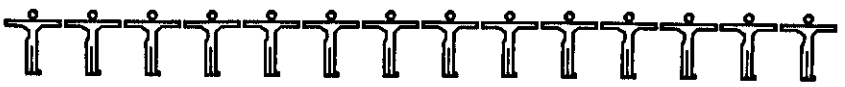
F. de Wolf[1], R.H. Meloen[2], M. Bakker[1], F. Barin[3], J. Goudsmit[1]

Journal of general virology 72, 1991, 1261-1267.

Antibody-reactive peptide scanning (Pepscan) using overlapping nonapeptides and human sera as probes allows the identification of amino acids contributing significantly to antigen-antibody interaction. Five-hundred and two overlapping nonapeptides derived from the human immunodeficiency virus type 2 strain Rod (HIV-2_{Rod}) external envelope glycoprotein gp125 were synthesized to serve as probes for reactivity with eight sera of HIV-2- infected individuals. Fifteen antibody-binding regions were identified, among which two amino-terminal regions [E3, amino acids (aa) 118 to 132; E4, aa 125 to 141] and four carboxy-terminal regions (E11, aa 303 to 324; E12, aa 340 to 358; E14, aa 436 to 452; E15, aa 486 to 507) were the most antigenic. The amino acids in binding sites E3 and E4 were highly variable among simian immunodeficiency virus (SIV), HIV-2 and HIV-1. The antibody-binding domains E14 and E15 were highly conserved among HIV-2 strains (94% and 86% identity of HIV-2_{Rod} to HIV-2_{Isy} and HIV-2_{NIHZ}, respectively). Both domains had more amino acids in common with SIV (88% for E14, 64% for E15) than with HIV-1 (41% for E14, 45% for E15). Epidemiological studies revealed that the sera of African HIV-2 infected individuals bound the E11 and E15 peptides best (31%, 8/26). The sera of African HIV-1-infected individuals showed significant levels of cross-reactivity to the HIV-2 peptides, especially to the E15 peptide, whereas the sera of European HIV-1-infected individuals showed only moderate levels of cross-reactivity *(abstract truncated at 250 words).*

Full text in English.

1) Academic Medical Centre, University of Amsterdam, Amsterdam, The Netherlands
2) CDI-DLO
3) Hôpital Bretonneau, Tours Cedex, France



PEPSCAN

Immunodominance and antigenic variation of the principal neutralization domain of HIV-1

G. Zwart[1], H. Langedijk[2], L. van der Hoek[1], J.J. de Jong[1], T.F.W. Wolfs[1], C. Ramautarsing[1], M. Bakker[1], A. de Ronde[1], J. Goudsmit[1]

Virology 181, 1991, 481-489.

The principal neutralization domain (PND) of HIV-1 is located in the third variable region (V3) of the envelope glycoprotein gp120. Cross reactivity of experimental and natural sera with recombinant proteins containing the V3 region of four HIV-1 variants showed that a group of viruses (among which HIV-1 MN) had antigenically similar V3 regions. The V3 regions of HIV-1 IIIB and HIV-1 RF were antigenically distinct. Antibodies raised to V3 domains of two isolates from the "MN group" neutralized HIV-1 MN (and not HIV-1 IIIB), thus confirming the antigenic similarity of V3 of these isolates to that of HIV-1 MN. Human antibodies to the V3 region were shown to be mainly directed to the central area in V3, where the neutralization domain is. In addition, antibody reactivities in sera of 397 Dutch and 39 Tanzanian HIV-1-infected individuals show that the V3 neutralization domain is highly antigenic, and that viruses from the MN group predominate in The Netherlands and to a lesser extent in Tanzania. Thus, if the protective value of antibodies to the PND can be established, then PND (poly)peptides derived from the MN group may be important components of a subunit vaccine against HIV-1.

Full text in English.

1) Academic Medical Centre, University of Amsterdam, Amsterdam, The Netherlands
2) CDI-DLO

PEPSCAN

Localization of epitopes on viral surface proteins

W.P.A. Posthumus[1)]

Thesis: University of Utrecht, Utrecht, 1991, 132p, Scope of the thesis, pp. 16/17.

The aim of this thesis was to map epitopes on the surface proteins of viruses using two different methods: the PEPSCAN analysis and the pEX expression method. The results of both methods were compared. Our main interest was focused on the determination of the B-cell epitopes of foot-and-mouth disease virus and coronaviruses. Foot-and-mouth disease is extremely contagious. Usually it is not fatal in natural infected cattle, but it leads to a serious loss of condition of the infected animal. After infection, vesicular eruptions on mouth, tongue, muzzle, hooves, and udder occurs. Mice, which are not susceptible to the disease, were used for the production of poly- and monoclonal antibodies. The determination of the exact binding locations of a set of monoclonal antibodies on the surface of foot-and-mouth disease virus, using PEPSCAN analysis, is described. The locations found provided information on the virusneutralization mechanism of antibodies and may be used to develop synthetic vaccines. Transmissible gastro-enteritis virus causes enteric disease in pigs of all ages, with high mortality for newborn piglets. The spike protein S (1,447 amino acids elicits antibodies that can neutralize virus infectivity. We determined a number of epitopes on the S protein using PEPSCAN analysis and cDNA fragments of transmissible gastroenteritis virus for pEX expression. These results were compared with data on the epitopes on surface proteins of other coronaviruses: infectious bronchitis virus and mouse hepatitis virus *(abstract truncated at 250 words).*

Full text in English.

1) CDI-DLO

PEPSCAN

Surface locations of foot-and-mouth disease virus type A10 epitopes of neutralizing monoclonal antibodies

W.P.A. Posthumus, W.C. Puijk, A.A.M. Thomas, R.H. Meloen[1)]

Localization of epitopes on viral surface proteins: Thesis: University of Utrecht, Utrecht, 1991, pp. 21-36.

We determined the reactivity of neutralizing monoclonal antibodies raised against purified foot-and-mouth disease virus type A10 with all 628 consecutive nonapeptides of the virus structural proteins. The three-dimensional model of the virus protomer was used to map the peptides that reacted with monoclonal antibodies. Reactive peptides were found on VP1, VP2, and VP3. The set of reactive peptides found on VP1 included peptdies derived from the previously described sequences 141 to 160 and 200 to 212 of VP1. Most locations of the reactive peptides and thus the binding locations of the monoclonal antibodies were in accordance with the serological properties of the monoclonal antibodies tested. Surprisingly, MAbs that reacted with peptides that are located next to each other on the viral surface did not compete with each other on whole virus. The location of the amino acids of the three structural proteins, which are substituted in escape mutants of foot-and-mouth disease virus, were found near or at the location of the reactive peptides. Because the surface locations of epitopes are spatially separated, we infer that foot-and-mouth disease virus can be neutralized by at least two different mechanisms.

Full text in English.

1) CDI-DLO

PEPSCAN

Analysis and simulation of a neutralizing epitope of transmissible gastroenteritis virus

W.P.A. Posthumus[1)], J.A. Lenstra[2)], W.M.M. Schaaper[1)], A.P. van Nieuwstadt[1)]

Localization of epitopes on viral surface proteins: Thesis: University of Utrecht, Utrecht, 1991, pp. 37-52. Also published in Journal of virology 64, 1990, 3304-3309.

The amino acid sequences recognized by monoclonal antibodies (MAbs) specific for the antigenic site IV of the spike protein S of transmissible gastroenteritis virus were analyzed by PEPSCAN. All MAbs of group IV recognized peptides from the S region consisting of residues 378 to 390. In addition, the neutralizing MAbs (subgroup IV-A) also bound to peptides from the region consisting of residues 1173 to 1184 and to several other peptides with a related amino acid composition. The contribution of the individual residues of both sequences to the binding of a MAb was determined by varying the lenght of the peptide and by a consecutive deletion or replacement of parental residues by the 19 other amino acids. The sequence consisting of residues 326 to 558, tested as part of a cro-ß-galactosidase hybrid protein, was antigenic, but the sequence consisting of residues 1150 to 1239 was not. Furthermore, antibodies raised in rabbits against the peptide SDSSFFSYGEIPFG (residues 377 to 390), but not those raised against the peptide VRASQLAKDKVNEC (residues 1171 to 1185), recognized the virus and had neutralizing activity. We infer that the epitope of the neutralizing MAbs is composite and consists of the linear sequence SFFSYGEI (residues 380 to 387) with contributions of A, D, K, N, Q, or V residues from other parts of the S molecule. The complex epitope was simulated by synthesizing peptides in which the sequences consisting of residues 380 to 387 and 1176 to 1184 were combined. MAbs of subgroup IV-A recognized the combination peptides two to six times better than the individual sequences. These results may offer prospects for the development of an experimental vaccine.

Full text in English.

1) CDI-DLO
2) Faculty of Veterinary Medicine, University of Utrecht, Utrecht, The Netherlands.

PEPSCAN

Residues involved in the antigenic sites of transmissible gastroenteritis virus S-glycoprotein

F. Gebauer[1], W.P.A. Posthumus[2], I. Correa[1], C. Suñé[1], C. Smerdou[1], C.M. Sánchez[1], J.A. Lenstra[3], R.H. Meloen[2], L. Enjuanes[1]

Localization of epitopes on viral surface proteins: Thesis: University of Utrecht, Utrecht, 1991, pp. 53-81.

The S glycoprotein of transmissible gastroenteritis virus has been shown to contain four major antigenic sites (A, B, C and D). Site A is the main inducer of neutralizing antibodies and has been subdivided previously into the three subsites Aa, Ab, and Ac. The residues that contribute to these sites are localized by sequence analysis of 21 mutants that escape neutralization or binding by TGEV specific monoclonal antibodies and by PEPSCAN analysis. Site A contains the residues 538, 591, 543 and 586, which were essential in the formation of subsites Aa, Ab, Ac and Aa and Ab, respectively. The peptide 537-MKRSGYGQPIA-547 represents, at least partially, subsite Ac, which is highly conserved among coronaviruses. The site may be relevant for protection reactions and could be of interest for diagnosis. Other residues contribute to site B (residues 97 and 144), site C (residues 50 and 51), and site D (residue 385). For the linear sites C and D these locations are in agreement with the PEPSCAN results. Site C can be represented by the peptide 48-P-P/S-N-S-D/E-52, but is not exposed on the surface of native virus. In accessibility can be modulated by treatment at pH>11 and temperatures >45°C. Sites A and B are fully dependent on glycosylation for proper folding, while sites C and D are fully or partially independent on glycosylation, respectively. Once the S glycoprotein has been assembled into the virion, the carbohydrate moiety is not essential for the antigenic sites.

Full text in English.

1) Centro de Biologia Molecular, Universidad Autónoma, Madrid. Spain
2) CDI-DLO
3) Faculty of Veterinary Medicine, University of Utrecht, Utrecht, The Netherlands

PEPSCAN

Linear neutralizing epitopes on the peplomer protein of coronaviruses

W.P.A. Posthumus[1], R.H. Meloen[1], L. Enjuanes[2], I. Correa[2], A.P. van Nieuwstadt[1], G. Koch[1], R.J. de Groot[3], J.G. Kusters[3], W. Luytjes[3], W.J. Spaan[3], B.A.M. van der Zeijst[3], J.A. Lenstra[3]

Localization of epitopes on viral surface proteins: Thesis: University of Utrecht, Utrecht, 1991, pp. 83-93.

Three years ago, we reported a comparison of the primary structures of the S peplomer proteins of three coronaviruses - mouse hepatitis virus (MHV, strain A59), infectious bronchitis virus (IBV, strain M41), and feline infectious peritonitis virus (FIPV, strain 79-1146) - which represent the three antigenic clusters in the coronavirus family. A periodicity in the C-terminal part of the S sequence indicated the presence of a coiled-coil structure, which forms the stalk of the peplomer. The non-conserved N-terminal sequence probably forms the bulbous part of the peplomer. In the work reported here, we used the sequence information to locate epitopes that mediate virus neutralization. We will report the results of an approach that focuses on linear epitopes, i.e. epitopes that depend only on the sequence and not on the native conformation of the protein.

Full text in English.

1) CDI-DLO
2) Centro de Biologia Molecular, Universidad Autónoma, Madrid, Spain
3) Faculty of Veterinary Medicine, University of Utrecht, Utrecht, The Netherlands

PEPSCAN

Immunogenicity of peptides simulating a neutralizing epitope of transmissible gastroenteritis virus

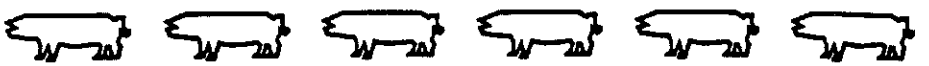
W.P.A. Posthumus[1], J.A. Lenstra[2], A.P. van Nieuwstadt[1], W.M.M. Schaaper[1], B.A.M. van der Zeijst[2], R.H. Meloen[1]

Localization of epitopes on viral surface proteins: Thesis: University of Utrecht, Utrecht, 1991, pp. 95-105. Also published in Virology 182, 1991, 371-375.

Previously, an epitope recognized by a set of neutralizing monoclonal antibodies directed against the S protein of transmissible gastroenteritis, has been identified. This neutralization epitope can be simulated by a single peptide combining residues 380 to 387 and 1176 to 1184 of the S protein; this combination peptide (SFFSYGEIQLAKDKVNE) was more antigenic than its single constituents. Here we describe the immunogenicity of this combination peptide, in comparison with monomer and tandem peptides of both constituents, and with a cycle peptide consisting of residues 373 to 398. All antisera, raised in rabbits, bound to the peptide used as immunogen. Only sera that recognized the residues 380 to 387 bound to whole virus. Three of the four antisera with the highest binding titers to whole virus also had neutralization activity. Analysis of the fine-specificity of the antisera with PEPSCAN peptides indicated that the spectrum of antibodies induced by the 380 to 387 sequence depended on the presentation of this sequence in a peptide to the immune system. The non-binding and nonneutralizing anti(380 to 387)-sera appeared to contain a limited spectrum of antipeptide antibodies. Furthermore, the lack of neutralization of the antiserum against the combination peptide could be explained by the immunodominance in rabbits of the 1176 to 1184 sequence over the 380 to 387 sequence. These findings demonstrate a few fundamental problems of simulating discontinuous epitopes by single synthetic peptides.

Full text in English.

1) CDI-DLO
2) Faculty of Veterinary Medicine, University of Utrecht, Utrecht, The Netherlands



ANGUILLICOLA CRASSUS

Experimental transmission of *Anguillicola crassus* (Nematoda, Dracunculoidea) larvae from infected prey fish to the eel *Anguilla anguilla*

O.L.M. Haenen[1)], P. van Banning[2)]

Aquaculture 92, 1991, 115-119.

Infected swimbladders with presumptive larvae of the nematode *Anguillicola crassus* were removed from freshwater smelt (*Osmerus eperlanus* L.) and ruffe (*Gymnocephalus cernuus* L.) and were fed to European eels *Anguilla anguilla* L. to test whether the larvae can infect eels via this route. The nematode larvae migrated to the swimbladder of eels and developed into adult *A. crassus*. It was concluded that smelt and ruffe can transmit *A. crassus* to European eels.

Full text in English.

1) CDI-DLO
2) Netherlands Institute for Fishery Research (RIVO-DLO), IJmuiden, The Netherlands

ANTHELMINTIC RESISTANCE

The prevalence of anthelmintic resistance of horse strongyles in the Netherlands

J.H. Boersema[1)], F.H.M. Borgsteede[2)], M. Eysker[1)], T.E. Elema[1)], C.P.H. Gaasenbeek[2)], W.P.J. van der Burg[2)]

The veterinary quartely 13, 1991, 209-217.

A survey to determine the prevalence of anthelmintic resistance of horse strongyles was carried out with 616 horses on 22 farms.
The tested drugs were cambendazole, pyrantel pamaote and ivermectin. Based on egg count reduction tests the efficacy of cambendazole varied from 0% to 93% and of pyrantel from 93% to 100%. Ivermectin treatments were 100% effective on all farms. Larval cultures after cambendazole treatments revealed exclusively cyathostome larvae. After pyrantel treatments besides cyathostome larvae other types of larvae were also found. After ivermectin treatments only a few cyathostome larvae were observed.
It can be concluded that benzimidazole resistance of cyathostomes is very common and widespread in the Netherlands. This means that benzimidazoles and pro-benzimidazoles should be excluded for strategic use in horses.

Full text in English.

1) Faculty of Veterinary Medicine, University of Utrecht, Utrecht, The Netherlands
2) CDI-DLO

ANTHELMINTIC RESISTANCE

Further studies with a strain of *Ostertagia ostertagi* resistant to morantel tartrate

F.H.M. Borgsteede1)

International journal for parasitology 21, 1991, 867-870.

Two experiments with a morantel resistant strain of *Ostertagia ostertagi* were carried out.
In the first experiment five groups of five calves were infected with 60,000 larvae of this resistant strain. Calves of one group remained untreated, calves of the other groups were treated with morantel tartrate, oxfendazole, levamisole, or ivermectin in the recommended doses. It was demonstrated that there was side resistance of levamisole, but not to oxfendazole or ivermectin. Compared with the untreated controls the reduction percentages of the worm burdens were 45.3 (morantel tartrate), 99.7 (oxfendazole), 83.5 (levamisole) and 100 (ivermectin).
In the second experiment a comparison was made between the effect of levamisole against a morantel susceptible strain of *O. ostertagi* and the resistant strain. Two groups of five calves were infected with the susceptible strain and two groups with the resistant one. One group of each pair remained untreated, the other was treated with levamisole. The reduction percentages of the worm burdens were 99.6 (susceptible strain) and 63.6 (resistant strain).
This result confirms the efficacy of levamisole to susceptible *O. ostertagi* and the side resistance of the morantel resistant strain.

Full text in English.

1) CDI-DLO

ANTHELMINTIC RESISTANCE

Molecular analysis of selection for benzimidazole resistance in sheep parasite *Haemonchus contortus*

M.H. Roos[1)], J.H. Boersema[1)], F.H.M. Borgsteede[2)], J. Cornelissen[2)], M. Taylor[3)], E.J. Ruitenberg[1,4)]

Molecular and biochemical parasitology 43, 1990, 77-88.

The molecular basis for the resistance of the sheep parasitic nematode *Haemonchus contortus* to the benzimidazole (BZ) group of anthelmintics was investigated. Three BZ-susceptible and three resistant populations from different geographical locations were characterized with respect to the egg-hatch assay with thiabendazole (TBZ), mebendazole (MBZ) binding tests and restriction fragment length polymorphism (RFLP) after Southern blotting. Cloned *H. contortus* α- and β-tubulin genes were used as probes to analyze the RFLPs of genomic DNA prepared from mixtures of infectious larvae (L3) or adults. The susceptible populations showed, with both α- and β-tubulin probes, 2 to 6 different fragments, depending on the restriction enzyme used. The three resistant populations showed as many fragments with the α-tubulin probe as the susceptible populations, but when probed with β-tubulin only 1 or 2 fragments were visible, but always less than in the susceptible populations. An *in vitro* selection experiment was carried out using a susceptible population that was isolated in the laboratory before BZ came on the market. The results showed that after two selections with increasing amounts of TBZ, the population had become resistant, according to the egg-hatch assay values and MBZ binding assay. Using RFPL, the number of β-tubulin probe reactive DNA fragments was reduced from 5 to 1. *(abstract truncated at 250 words).*

Full text in English.

1) Institute of Infectious Diseases and Immunology, University of Utrecht, Utrecht, The Netherlands
2) CDI-DLO
3) Central Veterinary Laboratory, Weybridge, United Kingdom
4) National Institute of Public Health and Environmental Protection, Bilthoven, The Netherlands

HELMINTHS

Endoparasitic helminths of the harbour seal, *Phoca vitulina*, in the Netherlands

F.H.M. Borgsteede, H.G.J. Bus, J.A.W. Verplanke, W.P.J. van der Burg[1)]

Netherlands journal of sea research 28, 1991, 247-250.

The endoparasitic helminth fauna of harbour seals which had died during the epidemic of the phocine distemper virus in 1988 was studied. Lungs, heart and gastrointestinal tracts of 94 animals collected along the Dutch coast were available for investigation. The following parasites and infection percentages were found: Nematoda: *Dipetalonema spirocauda* (24.5%), *Otostrongylus circumlitus* (6.4%), *Parafilaroides gymnurus* (24.5%), *Ascaridoidea* spec. (58.5%); Trematoda: *Phagicola septentrionalis (66.0%), Cryptocotyle lingua* (74.5%); Cestoda: *Diphyllobothrium* spec. (8,5%); Acanthocephala: *Corynosoma strumosum* (70.2%). The presence of worm species was not evenly distributed over the age classes. Seals younger than one year harboured fewer parasites. The highest percentages were found in 1 to 2 year old seals. The number of worms per seal varied greatly. The highest burden for ascarids was 253, for *P. septentrionalis* 123 000, for *C. lingua* 112 000 and for *C. strumosum* 251. A comparison of the present results with those described in the literature shows that in Dutch seals the same species were present and that numbers of worms were not higher than before the 1988 mass mortality. It is therefore concluded that helminth parasites did not cause the mass mortality.

Full text in English.

1) CDI-DLO

LUNGWORM INFECTIONS

Identification and isolation of a specific antigen with diagnostic potential from *Dictyocaulus viviparus*

W.A. de Leeuw, J.B.J.W. Cornelissen[1)]

Veterinary parasitology 39, 1991, 137-147.

The purpose of the investigation was to isolate and identify a specific antigen of *Dictyocaulus viviparus* that can be used to diagnose lungworm infections in cattle. Somatic, excretion and secretion antigens of adult *D. viviparus* and somatic antigens of L3 larvae were examined in an indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to determine whether they cross-reacted with sera collected from calves with mono-infections of *Fasciola hepatica, Ostertagia ostertagi, Ascaris suum,* or *Cooperia oncophora*. Serum samples containing antibodies directed against *F. hepatica, A. suum,* and *O. ostertagi* cross-reacted with somatic antigens of adult *D. viviparus*; these sera cross-reacted less with excretion and secretion antigens. When somatic antigens of adult *D. viviparus* were analysed in a Westernblot, a 17-kDa protein that did not react with the heterologous sera was detected. This protein was isolated by ultrafiltration and anion chromatography. Sera collected from calves infected with *D. viviparus* or with a low molecular antigen fraction of this preparation containing the 17-kDa protein. The extinction values that were measured in both assays correlated well. We conclude that the 17-kDa protein isolated from somatic antigens of adult *D. vivparus* may be useful in developing an improved immunoassay to diagnose lungworm infections in cattle.

Full text in English.

1) CDI-DLO

MUSCLE / NERVE

Role of depolarisation and calcium in contractions of canine trachealis from endogenous or exogenous acetylcholine

E.E. Daniel[1], J. Jury[1], R. Serio[2], L.P. Jager[3]

Canadian journal of physiology and pharmacology 69, 1991, 518-525.

The relationships of the electrical to the mechanical responses of the canine trachealis muscle during stimulation of its cholinergic nerves or exposure to exogenous acetylcholine were recorded in the single or the double sucrose gap. At 27°C, the responses to a train of stimuli consisted of a transient depolarization excitatory junction potential of 10-30 mV followed by fading oscillations and contractions. When stimulus parameters were varied in the single sucrose gap, contractions were more closely associated with the occurrence of and varied in duration with the oscillations rather than with the amplitude of the EJP. Acetylcholine superfused at a concentration of 10^{-6} M for 30 s caused a prolonged depolarization of 10-20 mV, but a much larger contraction than could be elicited by nerve stimulation. None of the responses to acetylcholine was significantly affected by the Ca channel antagonists, nifedipine, nitrendipine, or verapamil in Ca channel blocking concentrations. When tissues were exposed to a Ca-free medium, the excitatory junction potentials and oscillations rapidly disappeared, but the electrical and mechanical responses to acetylcholine persisted and only gradually disappeared with repetitive exposures. *(abstract truncated at 250 words).*

Full text in English.

1) McMaster University Health Science Center, Hamilton, Canada
2) Universita di Palermo, Italia
3) CDI-DLO

OXYTETRACYCLINE

The influence of disease on feed and water consumption and on pharmacokinetics of orally administered oxytetracycline in pigs

A. Pijpers[1], E.J. Schoevers[1], H. van Gogh[1], L.A.M.G. van Leengoed[2], I.J.R. Visser[1], A.S.J.P.A.M. van Miert[1], J.H.M. Verheijden[1]

Journal of animal science 69, 1991, 2947-2954.

In the present study the feed and water consumption and pharmacokinetic parameters of orally administered oxytetracycline were compared in clinically healthy pigs and in the same pigs following a challenge with *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae* toxins. Endobronchial challenge with *A. pleuropneumoniae* toxins was accompanied by anorexia, increased lassitude, labored breathing, fever, and increased white blood cell counts. Pleuropneumonia was evident in all pigs on autopsy. Following the challenge, both feed and water consumption were markedly reduced. In contrast to recommendations in the literature, it is concluded that drugs should not be administered to pneumonic pigs via water. In healthy pigs the oral bioavailability of oxytetracycline (50 mg/kg), given on an empty stomach, was 4.8% and the elimination half-life ($t_{1/2}\beta$) was 5.92h. After challenge, the pigs showed great variation in oxytetracycline plasma concentrations. In addition, the mean computed elimination rate constant (β), $t_{1/2}\beta$, the area under the plasma concentration-time curve (AUC), and clearance in pneumonic pigs differed significantly ($P < .05$) from the values found in healthy pigs. The elimination half-life ($t_{1/2}\beta$), AUC, and volume of distribution ($V_{d\ area}$) were increased. In diseased pigs the mean of maximum plasma concentrations (.87 µg/ml) was reached after 7 h, in contrast to 1.74 h (1.87 µg/ml) in the healthy pigs.

Full text in English.

1) University of Utrecht, Utrecht, The Netherlands
2) CDI-DLO

INTOXICATIONS

De dader ligt niet altijd op het kerkhof: een geval van alfachloralosevergiftiging bij wilde vogels

The cat has not always done it: a case of alphachloralose poisoning of wild birds

P.E.F. Zoun[1)], H. Peeters[2)]

Tijdschrift voor diergeneeskunde 116, 1991, 887-888.

Op een begraafplaats werd overlast ondervonden van verwilderde kippen. Na ingewonnen veterinair advies werd met alfachloralose behandeld voer uitgelegd, met de bedoeling de dieren te verdoven en ze naar een meer passende omgeving te brengen. Echter, ook andere vogels aten van het voer, terwijl bovendien kennelijk de dosering alfachloralose te hoog was. Eén en ander leidde tot sterfte onder de kippen en een aantal wilde vogels. Hieruit blijkt eens te meer dat alfachloralose voor dit soort situaties niet het geëigende middel is.

Full text in Dutch.

1) CDI-DLO
2) Nederlandse vereniging tot bescherming van vogels, Zeist

WILD BIRD MORTALITY

Verschillen in doodsoorzaken tussen havik *Accipiter gentilis* en sperwer *A. nisus* in 1975-1989

Differences in causes of death between goshawk *Accipiter gentilis* and sparrowhawk *A. nisus* in 1975-1989

T. Smit, P.E.F. Zoun, E. Colijn[1)]

Limosa 64, 1991, 137-142.

Havik en sperwer hebben zich hersteld van de populatiedaling welke in de jaren zestig ontstond door het gebruik van gechloreerde koolwaterstoffen als bestrijdingsmiddelen in de landbouw. Over ziekten en doodsoorzaken van in het wild levende haviken en sperwers zijn weinig pathologische gegevens bekend. Recente gegevens zijn interessant omdat de havik gemakkelijk aas als voedsel blijkt te accepteren, waardoor de soort even gevoelig voor vergiftigingen is als buizerd *Buteo buteo* en de rode wouw *Milvus milvus*. Het door ons onderzochte materiaal werd ontvangen in het kader van monitoringsonderzoek van de Werkgroep Vogelsterfte. Het doel van dit onderzoek is het inventariseren van ziekten en doodsoorzaken bij wilde vogels, om zo nodig richtlijnen te kunnen geven ter voorkoming van ongewenste of onnatuurlijke sterfte.

Full text in Dutch.

1) CDI-DLO

AUJESZKY'S DISEASE VIRUS / PSEUDORABIES VIRUS

Epitope analysis of glycoprotein I of pseudorabies virus

L. Jacobs, R.H. Meloen, A.L. Gielkens, J.T. van Oirschot[1)]

Journal of general virology 71, 1990, 881-887.

A panel of 11 monoclonal antibodies (MAbs) raised against pseudorabies virus (PRV) was used to map epitopes on the virus glycoprotein I (gI). We employed three approaches to map epitopes on gI. By a competition binding assay, six groups of MAbs were defined as reacting with distinct antigenic domains on gI. To identify regions along the gI polypeptide chain encompassing the domains recognized by these MAbs, DNA fragments derived from the gI-coding region were cloned into pEX expression plasmids. The antigenic reactivity of the fusion proteins expressed in *Escherichia coli* was analysed by immunoblotting. Five antigenic domains were mapped within the first 238 amino acids of gI: domains A, B and D were mapped between amino acids 52 and 123 and domains C and E between amino acids 78 and 238. One MAb, representing domain F, did not react with the expressed fusion proteins. To assess the precise location and amino acid sequences of the epitopes, overlapping nonapeptides covering the amino acid sequence 52 to 238 were synthesized. The antibody-binding activity of these peptides was tested by an ELISA (Pepscan-method). Three antigenic domains were mapped: domain A was localized to amino acids 64 to 73 and 75 to 84, domain B to amino acids 52 to 67 and domain D to amino acids 68 to 82. Four MAbs representing antigenic domains C, E and F did not react in the Pepscan. Finally, sera from pigs infected experimentally with PRV reacted with the fusion protein of plasmid ps 1 (aminoacids 52 to 238).

Full text in English.

1) CDI-DLO

AUJESZKY'S DISEASE VIRUS / PSEUDORABIES VIRUS

Aujeszky's disease in horses fulfils Koch's postulates

T.G. Kimman[1], G.J. Binkhorst[2], T.S.G.A.M. van den Ingh[2], J.M.A. Pol[1], A.L.J. Gielkens[1], M.E. Roelvink[2]

Veterinary record 128, 1991, 103-106.

Aujeszky's disease virus was isolated from the brain of a horse which had shown severe neurological signs, including excessive sweating, muscle tremors and periods of mania. Pathological examination revealed a non-suppurative meningoencephalitis. The virus was propagated in cell culture and inoculated into the conjunctiva and nostrils of two ponies. The ponies developed fever seven days after inoculation and subsequently started to behave abnormally, showing severe neurological signs on the ninth day after inoculation. One pony became excited and the other was depressed. One pony died on the ninth day after inoculation and the other was euthanased on the 10th day. Both ponies had a significant increase in serum antibody titre against the virus. The virus was recovered from several parts of the brains and the eyes of the ponies. Aujeszky's disease in horses therefore fulfils Koch's postulates. Although horses do not appear to be very susceptible to the virus, Aujeszky's disease should be included in the differential diagnosis of horses with fatal or transient neurological signs of disease in areas where the virus is endemic.

Full text in English.

1) CDI-DLO
2) Faculty of veterinary medicine, University of Utrecht, Utrecht, The Netherlands

AUJESZKY'S DISEASE VIRUS / PSEUDORABIES VIRUS

Comparative evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to detect antibodies directed against glycoprotein I of pseudorabies virus and a conventional ELISA and neutralization tests

J.T. van Oirschot[1)]

Journal of clinical microbiology 29, 1991, 5-9.

To determine whether a newly developed enzyme-linked immumosorbent assay (ELISA), which detects antibodies directed against glycoprotein I (gI) of pseudorabies virus, is suitable for serodiagnosis, it was compared with a conventional ELISA and two neutralization tests. The gI ELISA was 99.2% as sensitive and 100% as specific as the conventional ELISA. Antibody titers measured by the gI ELISA were lower than those measured by the conventional ELISA, comparable to those measured by the 24-h neutralization test, and higher than those measured by the 1-h neutralization test. After experimental infections in pigs, antibodies were first detected by the gI ELISA on postinoculation day (PID) 14, by both neutralization tests on PID 7, and by the ELISA on PID 10. All four tests showed the same rate of decline of maternal antibodies in pigs born to sows that had been vaccinated with inactivated vaccine. Thus, not only is the gI ELISA unique in being able to differentiate infected pigs from those vaccinated with gI-negative vaccines, but it is also as useful as a conventional ELISA and as neutralization test for serodiagnosis.

Full text in English.

1) CDI-DLO

AUJESZKY'S DISEASE VIRUS / PSEUDORABIES VIRUS

Intranasal vaccination of pigs against Aujeszky's disease: protective immunity at 2 weeks, 2 months and 4 months after vaccination in pigs with maternal antibodies

J.T. van Oirschot[1)]

Veterinary microbiology 27, 1991, 103-113

The purpose of the study was to evaluate the short- and longterm immunity after intranasal vaccination in pigs with maternally derived antibodies (MDA). In two experiments, 10-week-old pigs with moderate MDA titres against Aujeszky's disease virus (ADV) were vaccinated intranasally with the Bartha strain of ADV to evaluate the protective immuntiy conferred at 2 weeks, 2 months and 4 months after vaccination. Protection was evaluated on the basis of severity of clinical signs, periods of fever and growth arrest, and duration and amount of virus excreted after challenge with a virulent ADV. During the first 2-3 weeks after vaccination, antibodies to ADV continued to decline as in unvaccinated control pigs. After that, antibody titres stabilized or gradually increased. At 2 weeks, 2 months and 4 months after vaccination, vaccinated pigs were significantly better protected than unvaccinated controls. The vaccinated pigs challenged 2 weeks after vaccination hardly developed any sign of disease. Mild signs of Aujeszky's disease and a growth arrest period of 5 days were observed in vaccinated pigs challenged 2 months after vaccination, whereas vaccinated pigs challenged 4 months after vaccination developed severe signs of disease and a growth arrest period of 13 days. Vaccinated pigs challenged 2 weeks after vaccination did not excrete challenge virus, and pigs challenged 2 or 4 months after vaccination excreted far less than unvaccinated controls. The results demonstrate that intranasal ADV vaccination of pigs with moderate MDA titres protected them from 2 weeks to at least 4 months after vaccination. Immunity steadily declined, however, after vaccination.

Full text in English.

1) CDI-DLO

AUJESZKY'S DISEASE VIRUS / PSEUDORABIES VIRUS

De ziekte van Aujeszky bij het varken in Nederland, A.D. 1991

Aujeszky's disease in pigs in the Netherlands, A.D. 1991

J.T. van Oirschot[1)]

Tijdschrift voor diergeneeskunde 116, 1991, 1231-1236.

De ziekte van Aujeszky wordt veroorzaakt door een herpesvirus. Het varken is de natuurlijke gastheer en de enige bron van verspreiding van het virus. Na een primaire infectie scheidt het varken gedurende zo'n 10-14 dagen virus uit, waarna het virus latent in de gastheer aanwezig blijft. Op individuele bedrijven, in bepaalde streken en in landen met een lage prevalentie is men erin geslaagd het virus uit te roeien. Door toepassing van zogenaamde "marker"-vaccins en bijbehorende diagnostische testen is het virus op individuele bedrijven geëlimineerd. De eerste resultaten van grootschalige veldproeven om de viruscirculatie door intensieve vaccinatie terug te dringen zijn bemoedigend.

Full text in Dutch.

1) CDI-DLO

AUJESZKY'S DISEASE VIRUS / PSEUDORABIES VIRUS

Antibody response to glycoprotein I in maternally immune pigs exposed to a mildly virulent strain of pseudorabies virus

J.T. van Oirschot, F. Daus, T.G. Kimman, D. van Zaane[1)]

American journal of veterinary research 52, 1991, 1788-1793.

To study the antibody response to glycoprotein I (gI) of pseudorabies virus (PRV) in maternally immune pigs, 3 groups of 6 pigs were given low doses of the mildly virulent Sterksel strain of PRV at 3 and 11 weeks of age.
Group A consisted of seronegative pigs; groups B and C consisted of pigs with maternal antibodies to gI. At 3 weeks of age, 3 pigs of each group were inoculated intranasally with $10^{2.5}$ plaque-forming units (groups A and B), or with $10^{3.5}$ plaque-forming units (group C) of PRV. The 3 other pigs in each group were contact-exposed to the inoculated pigs.
In group A, 4 of 6 pigs shed virus and all developed antibodies to gI of PRV and produced PRV-specific IgM and virus-neutralizing antibodies. In groups B and C, 10 pigs shed virus and all developed low and inconsistent titers of gI antibodies, whereas only 3 pigs produced PRV-IgM antibodies with low titers. Thus, after PRV infection of pigs with high concentrations of maternal antibodies deficient of gI antibodies, the antibody responses to PRV were severely inhibited. The pigs were reinoculated with 10^3 plaque-forming units of the same virus 8 weeks after the first inoculation. The pigs in group A did not respond at all, as they were immune. The pigs in groups B and C shed considerable amounts of virus. Three pigs had a clear secondary antibody response to gI, whereas the others developed an early to normal antibody response to gI. None of the pigs mounted a secondary neutralizing antibody response to PRV. We concluded that inoculation of pigs having high titers of gI-deficient maternal antibodies with low doses of a mildly virulent PRV, induced low to undetectable concentrations of antibodies to gI.

Full text in English.

1) CDI-DLO

AUJESZKY'S DISEASE VIRUS / PSEUDORABIES VIRUS

Efficacy of a pseudorabies virus vaccine based on deletion mutant strain 783 that does not express thymidine kinase and glycoprotein I

J.T. van Oirschot[1], R.J.M. Moormann[1], A.J.M. Berns[2], A.L.J. Gielkens[1]

American journal of veterinary research 52, 1991, 1056-1060.

The vaccine efficacy of a genetically engineered deletion mutant strain of pseudorabies virus, strain 783, was compared with that of the conventionally attenuated Bartha strain. Strain 783 has deletions in the genes coding for glycoprotein I and thymidine kinase.
In experiment 1, which had a 3-month interval between vaccination and challenge exposure, strain 783 protected pigs significantly ($P < 0.05$) better against virulent virus challenge exposure than did the Bartha strain. The growth of pigs vaccinated with strain 783 was not arrested, whereas that of pigs vaccinated with the Bartha strain was arrested for 7 days. Of 8 pigs given strain 783, 4 were fully protected against challenge exposure; none of the pigs given strain Bartha was fully protected. In experiment 2, which had a 3-week interval between vaccination and challenge exposure, the growth of pigs vaccinated with strain 783 was arrested for 3.5 days, whereas that of pigs vaccinated with the Bartha strain was arrested for 6 days.
In experiment 3, pigs with moderate titer of maternal antibodies were vaccinated twice IM or once intranasally with either strain 783 or Bartha and were challenge-exposed 3 months after vaccination. Pigs given strain 783 twice IM were significantly ($P < 0.05$) better protected than were the other pigs. They had growth arrest of only 6 days, compared with 9 days for pigs of other groups, and shed less virus after challenge exposure. Results of this study indicate that the vaccine based on the deletion mutant strain 783 is more efficacious than is the Bartha strain of pseudorabies virus.

Full text in English.

1) CDI-DLO
2) Netherlands Cancer Institute, Amsterdam, The Netherlands

AUJESZKY'S DISEASE VIRUS / PSEUDORABIES VIRUS

The influence of porcine recombinant interferon-1 on pseudorabies virus infection of porcine nasal mucosa *in vitro*

J.M.A. Pol[1], J.M. Broekhuysen-Davies[1], F. Wagenaar[1], C. La Bonnardière[2]

Journal of general virology 72, 1991, 933-938.

To determine the effect of interferon (IFN) on the pathogenesis of pseudorabies virus (PRV), porcine nasal mucosa explants were first treated with recombinant porcine methionyl-IFN-α1 and then infected with one of three strains of PRV. The stroma of treated mucosal explants were protected against infection with virulent PRV or PRV of intermediate virulence because the infection was restricted to the epithelial cells. In contrast, untreated mucosal explants were readily infected by virulent PRV or PRV of intermediate virulence; the infection spread from epithelial cells to stromal fibroblasts. Avirulent PRV infection was restricted to the epithelial cells of treated and untreated mucosal explants. IFN treatment limited the extend of all three PRV infections in the epithelial cells. Cultured porcine fibroblasts and porcine kidney cells were also treated with IFN and subsequently infected with PRV; infection was prevented in most porcine fibroblasts and the virus yield from porcine kidney cells was reduced. Budding of virulent PRV nucleocapsids through the inner nuclear membrane was observed more frequently in treated than in untreated mucosal explants and enveloped virus particles accumulated between the inner and outer nuclear membranes, indicating that the membrane-associated events of PRV replication had been affected. We conclude that IFN-α protects stromal fibroblasts against PRV infection and reduces virus replication in epithelial cells.

Full text in English.

1) CDI-DLO
2) INRA-Biotechnologies, Jouy en Josas, France

AUJESZKY'S DISEASE VIRUS / PSEUDORABIES VIRUS

Pseudorabies virus infections in explants of porcine nasal mucosa

J.M.A. Pol[1], W.G.V. Quint[2], G.L. Kok[1], J.M. Broekhuysen-Davies[1]

Research in veterinary science 50, 1991, 45-53.

The spread of infection and the morphogenesis of three pseudorabies virus strains were studied in explants of porcine nasal mucosa. Virulent NIA-3 virus was compared with a deletion mutant 2.4N3A, and with a nonvirulent Bartha virus. All three virus strains infected nasal epithelial cells. NIA-3 virus particles were enveloped mainly at the inner nuclear membrane; the virus rapidly invaded the stroma, causing widespread necrosis. In contrast, 2.4N3A virus particles were enveloped mainly at the endoplasmic reticulum and the infection spread more slowly. Bartha virus particles were enveloped mainly at the endoplasmic reticulum; the infection spread slowly and remained restricted to the epithelial cells. In situ DNA hybridisation showed an accumulation of Bartha virus DNA in the nucleus 24 hours after inoculation. In nasal mucosa viral virulence seemed directly related to the speed of replication and release of virus from infected cells.

Full text in English.

1) CDI-DLO
2) Diagnostic Centre SSDZ, Delft, The Netherlands

Morphogenesis of three pseudorabies virus strains in porcine nasal mucosa

J.M.A. Pol, F. Wagenaar, A.L.J. Gielkens[1)]

Intervirology 32, 1991, 327-337.

After intranasal inoculation of pseudorabies virus in 10-week-old pigs, the morphogenesis of three pseudorabies virus strains was studied in nasal mucosa. Virulent NIA-3 virus rapidly invaded the lamina propria of the nasal mucosa. NIA-3 nucleocapsids were enveloped at the nuclear membrane. Invasion of the lamina propria was delayed after immediate virulent 2.4N3A virus infection or absent after nonvirulent Bartha virus infection. 2.4N3A virus was mainly enveloped by membranes of the smooth endoplasmic reticulum. Bartha virus replication was delayed for at least 24 h as compared with NIA-3 virus, and Bartha virus was also enveloped by membranes of the smooth endoplasmic reticulum. The virulence of 2.4N3A and Bartha virus may be diminished because of altered envelopment and delayed viral replication and release.

Full text in English.

1) CDI-DLO

AUJESZKY'S DISEASE VIRUS / PSEUDORABIES VIRUS

Linker insertion mutagenesis of herpesviruses: inactivation of single genes within the us region of pseudorabies virus

N. de Wind[1)], A. Zijderveld[1)], K. Glazenburg[2)], A. Gielkens[2)], A. Berns[1)]

Journal of virology 64, 1990, 4691-4696.

We describe a technique for the systematic inactivation of non-essential genes within the genome of a herpesvirus without the requirement for phenotypic selection.
This technique is based on the insertion of an oligonucleotide containing translational stop codons at a random site within a large cloned viral DNA fragment. Mutant virus is then reconstituted by cotransfection with overlapping viral clones, together comprising the entire viral genome, as described previously (M. van Zijl, *et al.* J. Virol. 62, 1988, 2191-2195). This technique was used to construct, in a single experiment, a set of 13 viable pseudorabies virus strains with oligonucleotide insertions within all known genes of the Us region except for the gp50 gene, which proved essential for virus growth in cell culture. The growth rate in porcine kidney cells of mutants of all nonessential Us genes was similar to that of the parental virus, with the exception of a mutant of the recently identified protein kinase gene.

Full text in English.

1) Division of Molecular Genetics of The Netherlands Cancer Institute and Department of Biochemistry, University of Amsterdam, Amsterdam, The Netherlands
2) CDI-DLO

AUJESZKY'S DISEASE VIRUS / PSEUDORABIES VIRUS

Identification of two genes in the unique short region of pseudorabies virus; comparison with herpes simplex virus and varicella-zoster virus

M. van Zijl[1], H. van der Gulden[1], N. de Wind[1], A. Gielkens[2], A. Berns[1]

Journal of general virology 71, 1990, 1747-1755.

We have determined the nucleotide sequence of two genes in the unique short region of the genome of pseudorabies virus (PRV). Near the internal repeat, upstream of the gene encoding glycoprotein gX, we identified an open reading frame (ORF) encoding a protein of 390 amino acids. We designated this gene PK because the predicted protein contains most of the con- served motifs of a eukaryotic protein kinase. The protein shares amino acid homology with the protein kinases encoded by gene US3 of herpes simplex virus type 1 (HSV-1) and gene 66 of varicellazoster virus. Near the terminal repeat, downstream of a gene encoding an 11K protein, we identified an ORF encoding a protein of 256 amino acids. We designated this gene 28K, the M_r of the predicted protein. Part of the amino acid sequence of 28K is homologous to the predicted US2 protein of HSV-1.
Northern blot analysis revealed a 2-7 kb mRNA encoding the putative protein kinase and a 1-2 kb mRNA encoding the 28K protein in PRV-infected cells. The 5' ends of the mRNAs were mapped by primer extension. Two transcriptional start sites were identified for the PK mRNA: a minor start site immediately upstream of the ORF and a major start site (>95% of the mRNA) within the ORF, 64 nucleotides upstream of an internal ATG codon. A single transcriptional start site was identified for the 28K mRNA immediately upstream of the ORF. Immunoblot analysis with anti-peptide sera revealed that, in cells infected with PRV, the PK gene was translated into two proteins with M_rs of 53K and 41K, and the 28K gene into a single protein with an M_r of 28K.

Full text in English.

1) Division of Molecular Genetics, Cancer Institute and Department of Biochemistry, University of Amsterdam, Amsterdam, The Netherlands
2) CDI-DLO

AUJESZKY'S DISEASE VIRUS / PSEUDORABIES VIRUS AND SWINE FEVER VIRUS / HOG CHOLERA VIRUS

Live attenuated pseudorabies virus expressing envelope glycoprotein E1 of hog cholera virus protects swine against both pseudorabies and hog cholera

M. van Zijl[1], G. Wensvoort[2], E. de Kluyver[2], M. Hulst[2], H. van der Gulden[1], A. Gielkens[2], A. Berns[1], R. Moormann[2]

Journal of virology 65, 1991, 2761-2765.

To investigate whether live attenuated pseudorabies virus (PRV) can be used as a vaccine vector, PRV recombinants that expressed envelope glycoprotein E1 of hog cholera virus (HCV) were generated.
Pigs inoculated with these recombinants developed high levels of neutralizing antibodies against PRV and HCV and were protected against both pseudorabies and hog cholera (classical swine fever).

Full text in English.

1) The Netherlands Cancer Institute, and University of Amsterdam, Amsterdam, The Netherlands
2) CDI-DLO

BOVINE VIRAL DIARRHEA VIRUS

Bovine virusdiarree virusinfecties bij varkens

Bovine viral diarrhoea virus infections in pigs

C. Terpstra, G. Wensvoort[1)]

Tijdschrift voor diergeneeskunde, 116, 1991, 943-948.

Vanaf 1976 werden bij de laboratoriumdiagnostiek van varkenspest negentien natuurlijk en acht door een besmet vaccin geïnduceerde gevallen van congenitale bovine virusdiarree virus (BVDV)-infecties onderkend.
In bijna alle natuurlijke gevallen beperkte het ziekteprobleem zich tot één toom. De symptomen en het ziektebeeld kwamen overeen met dat van chronische varkenspest. Op een enkele uitzondering na stierven alle besmet geboren biggen binnen vier maanden na de geboorte. Eén persisterend geïnfecteerd varken vertoonde op een leeftijd van zes maanden een seroconversie voor BVDV. Een ander dier uit dezelfde toom ontwikkelde een persisterende infectie en bleef een immuuntolerante virusdrager tot het werd geslacht op een leeftijd van 24 maanden. Postnatale infecties van varkens met BVDV-varkensisolaten verliepen daarentegen nagenoeg volledig subklinisch. Uit een serologisch onderzoek bleek dat 20% van de slachtzeugen en slachtberen BVDV-antilichamen hadden. Het percentage seropositieve varkens op bedrijven met rundvee was significant hoger dan op bedrijven zonder runderen en nam op beide soorten bedrijven toe met de leeftijd. Behalve runderen kunnen schapen, varkens, en ook de mens de oorzaak zijn van een BVDV-besmetting bij varkens.

Full text in Dutch.

1) CDI-DLO

CHICKEN ANEMIA VIRUS

Characterization of cloned chicken anemia virus DNA that contains all elements for the infectious replication cycle

M.H.M. Noteborn[1], G.F. de Boer[2], D.J. van Roozelaar[2], C. Karreman[3], O. Kranenburg[1], J.G. Vos[2], S.H.M. Jeurissen[2], R.C. Hoeben[1], A. Zantema[1], G. Koch[2], H. van Ormondt[1], A.J. van der Eb[1]

Journal of virology 65, 1991, 3131-3139.

Circular double-stranded replication intermediates were identified in low-molecular-weight DNA of cells of the avian leukemia virus-induced lymphoblastoid cell line 1104-X-5 infected with chicken anemia virus (CAV). To characterize the genome of CAV, we cloned linearized CAV DNA into the vector pIC20H. Transfection of the circularized cloned insert into chicken cell lines caused a cytopathogenic effect, which was arrested when a chicken serum with neutralizing antibodies directed against CAV was added. Chickens inoculated at 1 day of age with CAV collected from cell lines transfected with cloned CAV DNA developed clinical signs of CAV. The 2,319-bp cloned CAV DNA sequence has three partially overlapping major reading frames coding for putative peptides of 51.6, 24.0, and 13.6 kDa. The CAV genome probably contains only one promoter region and only one poly(A) addition signal. Southern blot analysis using oligomers derived from the CAV DNA sequence showed that infected cells contained double- and single-stranded CAV DNAs, whereas purified virus contained only the minus strand.
It is the first time that the genome of one of the three known single-stranded circular DNA viruses has been completely analyzed.

Full text in English.

1) Sylvius Laboratory, University of Leiden, Leiden, The Netherlands
2) CDI-DLO
3) Academic Hospital Leiden, Leiden, The Netherlands

EQUINE INFLUENZA VIRUS

Maternal antibodies against equine influenza virus in foals and their interference with vaccination

J.T. van Oirschot[1], G. Bruin[2], E. de Boer-Luytze[1], G. Smolders[2]

Journal of veterinary medicine B 38, 1991, 391-396.

Foals that were born to mares vaccinated twice a year against influenza had moderate to high haemagglutination-inhibition antibody titers at 24 hours after birth. The foals were vaccinated at six and ten weeks of age, and again at three to five months after birth. Four months after the third vaccination no antibodies against A/H7N7 and A/H3N8 influenza viruses were detected in these foals. Thus, maternal antibodies probably prevented the development of antibodies against equine influenza virus after vaccination. Foals born to the same mares one year later were monitored to determine the rate of decline of maternal antibodies against influenza viruses. Antibody titers of the foals shortly after birth were similar to those of the mares at foaling. The antibodies persisted for three to six months, and their biological half-life was estimated to be approximately 38 days. Two vaccinations of foals against influenza after the maternal antibodies had virtually disappeared resulted in an antibody response in most, but still not all, foals. These findings suggest that foals should not be vaccinated against influenza until maternal antibodies have disappeared.

Full text in English.

1) CDI-DLO
2) Research Station for Cattle, Sheep and Horse Husbandry, Lelystad, The Netherlands

FOOT-AND-MOUTH DISEASE VIRUS

Protection of guinea-pigs against foot-and-mouth disease virus by immunization with a PhoE-FMDV hybrid protein

M. Agterberg[1)], H. Adriaanse[1)], S. Barteling[2)], K. van Maanen[2)], J. Tommassen[1)]

Vaccine 8, 1990, 438-440.

A hybrid protein was constructed containing two antigenic determi- nants of the structural protein VP1 of foot-and-mouth disease virus, insert- ed in a cell surface-exposed region of *Escherichia coli* outer membrane protein PhoE. Immunization of guinea-pigs with partially purified protein resulted in high levels of neutralizing antibodies and complete protection against challenge with the virus.

Full text in English.

1) Institute of molecular biology, University of Utrecht, Utrecht, The Netherlands
2) CDI-DLO

FOOT-AND-MOUTH DISEASE VIRUS

Outer membrane PhoE protein of *Escherichia coli* as a carrier for foreign antigenic determinants: immunogenicity of epitopes of foot-and-mouth disease virus

M. Agterberg[1], H. Adriaanse[1], H. Lankhof[2], R. Meloen[2], J. Tommassen[1]

Vaccine 8, 1990, 85-91.

Outer membrane protein PhoE of *Escherichia coli* was used for the expression of antigenic determinants of foot-and-mouth disease virus. Five hybrid PhoE proteins were constructed containing different combinations of two antigenic determinants of VP1 protein of the virus. The hybrid proteins were expressed in two *E. coli* strains and the proteins were correctly assembled into the outer membrane. The inserted epitopes were exposed at the surface of the cell and were antigenic in this PhoE-associated conformation. Immunization experiments, performed with partially protein, resulted in all cases in a significant anti-peptide antibody titre. In one case in which the hybrid protein with the largest insert was used, a neutralizing antibody response was detected.

Full text in English.

1) Institute of molecular biology and medical biotechnology and Department of molecular cell biology, University of Utrecht, Utrecht, The Netherlands
2) CDI-DLO

FOOT-AND-MOUTH DISEASE VIRUS

Developments in foot-and-mouth disease vaccines

S.J. Barteling, J. Vreeswijk[1)]

Vaccine 9, 1991, 75-88.

The current status of foot-and-mouth disease (FMD) vaccine production is reviewed. The production of antigen in bovine tongue epithelium (Frenkel culture) is described and improvements in monolayer and suspension cultures of cell lines are outlined. Inactivation of viral antigen and safety tests are discussed. A "minimum safety level" is recommended: at the end of the inactivation process, antigen batches of any size should contain less than one virus particle. After inactivation the antigen can be formulated into a vaccine or purified and concentrated for storage at ultra-low temperatures in a vaccine bank. Vaccines prepared with the adjuvant $Al(OH)_3$ and saponin are compared with (double) oil emulsion. Because oil vaccines can protect both cattle and pigs and induce longterm protection, they are most suitable for use in ring vaccinations. A new generation of vaccines, based on constructed modified-live viruses or (bio-)synthetic peptides, is briefly reviewed.

Full text in English.

1) CDI-DLO

HERPES SIMPLEX VIRUS

Improved detection of HSV by electron microscopy in clinical specimens using ultracentrifugation and colloidal gold immunoelectron microscopy: comparison with viral culture and cytodiagnosis

E. Folkers[1], J. Vreeswijk[2], A.P. Oranje[3], F. Wagenaar[2], J.N. Duivenvoorden[1]

Journal of virological methods 34, 1991, 273-289.

Three tests were compared to diagnose herpes virus infection: electron microscopy (EM), viral culture (VC) and cytodiagnosis (Tzanck smear). The study com- prised 67 patients with skin or mucous membrane lesions sugges- tive of herpes simplex virus (HSV) infection. The sensitivity of EM increased 25% after virus concen- tration by ultracentrifugation. Herpes virus infection was confirmed in 55 of the 67 cases by EM or VC or both. EM detected 53 herpes virus-positive lesion samples of which 14 were not detected by VC; only two lesion samples that were herpes virus-positive in VC were not detected by EM. The sensitivities of EM, VC and Tzanck smear for the group of 55 herpes virus-positive cases were 96%, 75% and 76%, respectively. The specificity of the Tzanck smear was 83% (prevalence 82%). Colloidal gold immuno-EM was used to rapidly type HSV-1, HSV-2 and varicella zoster virus (VZV) present in skin and mucous membrane lesions in less than 4 h. Immuno-EM was able to detect antiviral anti- bodies on viral envelopes and viral cores in lesion samples with negative VC. Antiviral antibodies do not interfere with typing of herpes viruses by immuno-EM. It is suggested that formation of viral immune complexes and inactivation of virus particles by antibodies may have caused a negative VC. Improved EM is discussed for its applicability to special cases that cannot rely on VC and cytodiagnosis or when rapid diagnosis is required.

Full text in English.

1) Hospital De Heel, Zaandam, The Netherlands
2) CDI-DLO
3) Erasmus University, Rotterdam, The Netherlands

PEARS

Mystery swine disease in the Netherlands: the isolation of Lelystad virus

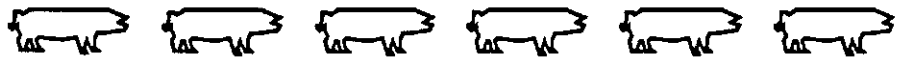
G. Wensvoort, C. Terpstra, J.M.A. Pol, E.A. ter Laak, M. Bloemraad, E.P. de Kluyver, C. Kragten, L. van Buiten, A. den Besten, F. Wagenaar, J.M. Broekhuijsen, P.L.J.M. Moonen, T. Zetstra, E.A. de Boer, H.J. Tibben[1)], M.F. de Jong[2)], P. van 't Veld[3)], G.J.R. Groenland[3)], J.A. van Gennep[3)], M.Th. Voets[4)], J.H.M. Verheijden[5)], J. Braamskamp[6)]

The veterinary quarterly 13, 1991, 121-130.

In early 1991, the Dutch pig industry was struck by the so-called mystery swine disease. Large-scale laboratory investigations were undertaken to search for the etiological agent. We focused on isolating viruses and mycoplasmas, and we tested paired sera of affected sows for antibodies against ten known pig viruses. The mycoplasmas *M. hyosynoviae, M. hyopneumoniae*, and *Acholeplasma laidlawii*, and the viruses encephalomyocarditis virus and porcine enterovirus types 2 and 7 were isolated from individual pigs. An unknown agent, however, was isolated from 16 of 20 piglets and from 41 of 63 sows. This agent was characterised as a virus and designated Lelystad virus. No relationship between this virus and other viruses has yet been established. Of 165 sows reportedly afflicted by the disease, 123 (75 per cent) seroconverted to Lelystad virus, whereas less than 10 per cent seroconverted to any of the other virus isolates or to the known viral pathogens. Antibodies directed against Lelystad virus were also found in pigs with mystery swine disease in England, Germany and in the United States. We conclude that infection with Lelystad virus is the likely cause of mystery swine disease.

Full text in English.

1) CDI-DLO
2) Regional Animal Health Service, Zwolle, The Netherlands
3) Regional Animal Health Service, Velp, The Netherlands
4) Regional Animal Health Service, Boxtel, The Netherlands
5) Faculty of Veterinary Medicine, University of Utrecht, Utrecht, The Netherlands
6) National Animal Health Committee, The Hague, The Netherlands



PEARS

Experimental reproduction of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (mystery swine disease) by infection with Lelystad virus: Koch's postulates fulfilled

C. Terpstra, G. Wensvoort, J.M.A. Pol[1)]

The veterinary quarterly 13, 1991, 131-136.

Aerosol exposure of eight pregnant sows to cell-culture-propagated Lelystad virus resulted in clinical signs characteristic of so-called mystery swine disease. After an incubation of 4-7 days, all sows were inappetant and listless for 6-9 days. Two sows developed a transient red-blue discolouration of the ears ("abortus blauw" or blue ear disease) accompanied by abdominal respiration, and two had a fever for one day only. One sow aborted at 109 days of gestation. The other seven sows, farrowing between 113 and 117 days of gestation, gave birth to numerous mummified, dead, and weak piglets. Of these seven, the mean number of piglets born dead to each sow was 4.6 and the mean number born alive was 7.7; 3.1 piglets per sow (40%) died within the first week. Lelystad virus was isolated from 31 piglets, which were born dead or died shortly after birth. Antibody was detected in precolostral blood samples or ascitic fluids of 23 piglets, a finding which demonstrated transplacental passage of the virus in six out of eight litters. We conclude that Lelystad virus is the causal agent of mystery swine disease. Since its etiology is no longer a mystery, we propose the more appropriate name "porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARS)".

Full text in English.

1) CDI-DLO

PEARS

Pathological, ultrastructural, and immunohistochemical changes caused by Lelystad virus in experimentally induced infections of mystery swine disease (synonym: porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARS))

J.M.A. Pol, J.E. van Dijk, G. Wensvoort, C. Terpstra[1)]

The veterinary quarterly 13, 1991, 137-143.

The pathogenicity and pathogenesis of Lelystad virus was studied in six 6-day-old SPF piglets. A third passage of the agent was propagated on porcine alveolar macrophages and intranasally inoculated into pigs. Pigs were killed at hours 24, 48, 60, and 72, and on days 6 and 8 after inoculation. From day 2 on pigs developed diffuse interstitial pneumonia with focal areas of catarrhal pneumonia, and from this day on splenic red pulp macrophages were enlarged and vacuolated. Lelystad virus was reisolated from the lungs of infected pigs from day 2 after inoculation. Lelystad virus antigens were detected by immunohistochemical techniques in bronchiolar epithelium and alveolar cells, and in spleen cells of infected pigs from day 2 after inoculation. Ultrastructural examination of tissues by electron microscopy revealed degenerating alveolar macrophages and epithelial cells in lungs and nasal mucosa, with excessive vacuolation of the endoplasmic reticulum. Although the respiratory tract seems to be the target organ for this virus, macrophages in other organs, such as the spleen, can also be infected. This preference for macrophages may impair immunological defences.

Full text in English.

1) CDI-DLO

PESTIVIRUS

An ELISA detecting antibody to conserved pestivirus epitopes

D.J. Paton[1], G. Ibata[1], S. Edwards[1], G. Wensvoort[2]

Journal of virological methods 31, 1991, 315-324.

A monoclonal antibody based competition-ELISA is described for the detection of pestivirus antibodies directed against conserved epitopes on the p80 viral protein. The ELISA detected increases in serum antibody following experimentally induced infections of pigs, cattle and sheep with a wide range of pestiviruses, although the sensitivity of the test was not uniform for the different viruses studied. The ELISA was compared with virus neutralization tests for the assessment of porcine, bovine and ovine field sera. At a cut-off value of 50% inhibition, the ELISA showed a high specificity relative to virus neutralization tests, but appeared less sensitive for the detection of some weakly positive samples from pigs. Sera from both ruminants and pigs could be assessed without any modification of the test.

Full text in English.

1) Central Veterinary Laboratory, Weybridge, United Kingdom
2) CDI-DLO

PORCINE EPIDEMIC DIARRHEA VIRUS

Use of two enzyme-linked immunosorbent assays to monitor antibody responses in swine with experimentally induced infection with porcine epidemic diarrhea virus

A.P. van Nieuwstadt, T. Zetstra[1)]

American journal of veterinary research 52, 1991, 1044-1050.

A blocking ELISA was developed to detect antibodies directed against porcine epidemic diarrhea virus (PEDV). The PEDV antigen was first incubated with dilutions of test sera. Any antigen that was not blocked by antibodies in the serum was assayed in a double-antibody sandwich ELISA, using 2 monoclonal antibodies directed against different antigenic sites on PEDV as capture and detecting antibodies, respectively. The blocking ELISA was compared with a fixed-cell ELISA that used monolayers of Vero cells infected with PEDV prototype strain CV777 as a solid phase and a conju- gate of an IgG-specific monoclonal antibody for antibody detection. Pigs were inoculated with PEDV strain CV777 or 1 of 2 field isolates, and antibody responses were measured by use of the 2 tests. Antibodies were detected by the blocking ELISA as early as postinoculation day 7 and, by the fixed-cell ELISA, as early as postinoculation day 14. From day 14 on, antibody titers for both tests correlated highly. Titers for the fixed-cell ELISA were 5.4 times higher than those for the blocking ELISA. The latter technique is easier to perform and discriminates well between infected and noninfected pigs, which makes this test useful for routine diagnosis and serologic surveys of porcine epidemic diarrhea.

Full text in English.

1) CDI-DLO

SWINE FEVER VIRUS / HOG CHOLERA VIRUS

The development of an international reference panel of monoclonal antibodies for the differentiation of hog cholera virus from other pestivirus

S. Edwards[1], V. Moennig[2], G. Wensvoort[3]

Veterinary microbiology 29, 1991, 101-108.

A panel of 30 monoclonal antibodies was defined and characterized with respect to the binding capacity in immunoperoxidase assay to different strains of pestivirus. Using the panel it was possible to identify specifically all strains and isolates of hog cholera virus, hog cholera vaccins derived from 'C' strains, and most strains of bovine viral diarrhoea/border disease (BVD/BD) viruses (including those isolated from pigs). A small proportion of BVD/BD isolates from pigs and ruminants reacted only with the monoclonals specific for pestivirus group antigen. It is recommended that monoclonal typing methods be introduced into official procedures for the diagnosis of hog cholera/classical swine fever.

Full text in English.

1) Central Veterinary Laboratory, Weybridge, United Kingdom
2) EEC Liaison Laboratory for Hog Cholera, Institute of Virology, Hannover, Germany
3) CDI-DLO

SWINE FEVER VIRUS / HOG CHOLERA VIRUS

Hog cholera: an update of present knowledge

C. Terpstra[1)]

British veterinary journal 147, 1991, 397-406.

The article reviews the characteristics and properties of the virus, the epidemiology, clinical signs, pathology, diagnosis and differential diagnosis of the disease as well as methods for its prevention and control.
Eradication of hog cholera by means of stamping out, supported by veterinary legislation and zoo-sanitary measures has been achieved in, for example, Australia, Canada, the USA and the United Kingdom. Elsewhere, however, the disease prevails or persisted for decades, despite control measures. Unregistered movements of unidentified pigs, the "carrier sow" syndrome and the presence of strains of low virulence are the main reasons that hamper the tracing of outbreaks to their source. Experience in Europe has proven beyond doubt that the uncontrollable spread of field virus can be broken and that the disease can be eradicated from enzootic areas, if a systematic and strict regimen of vaccination supported by legislation and zoo-sanitary measures is pursued for a length of time. Vaccination should be compulsory and the initial mass vaccination should be followed by supplementary vaccination of 8-to-10-week-old and newly introduced piglets at monthly intervals. To smother all foci of residual virus, the monthly supplementary vaccination programmes should be continued at least 1 year after the start of the mass vaccination and preferably until 1 year after the last outbreak.
The review concludes with a perspective on future lines of research, which are aimed at developing more sensitive methods for virus detection and of vaccines, which induce antibodies that can be distinguished from antibodies induced by field strains of hog cholera virus.

Full text in English.

1) CDI-DLO

OTHER PUBLICATIONS

Amerongen A. van, R.H. Meloen, P.J.A. Beckers, R.W. Sauerwein, J.H.E.T. Meuwissen.
PEPSCAN based amino acid modifications of a *P. falciparum* pfs25 peptide sequence substantially increase reactivity with transmission blocking monoclonal antibodies.
In: Vaccines 90. — Cold Spring Harbor : Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1990, p. 461-465.

Baars A.J., L.P. Jager, T.J. Spierenburg, G.J. de Graaf.
Residues of carbadox metabolites in edible pork products.
In: Recent developments in toxicology: Trends, methods and problems : Proceedings Eurotox '90 Congress. — Archives of toxicology, Supplement 14, 1991, pp. 289-293.

Baars A.J., P.E.F. Zoun, T.J. Spierenburg, T. Smit.
Acute intoxications as a cause of wild bird mortality in the Netherlands from 1975-1989.
In: Recent developments in toxicology: Trends, methods and problems : Proceedings Eurotox '90 congress. - Archives of toxicology Supplement 14, 1991, 312-316.

Bianchi A.T.J., B. Moonen, J.W. Scholten, P.J. van der Heijden.
Development of the intestinal B-cell compartment of the pig. Proceedings congress July 1990, Compiègne, France. — In: Lymphatic tissues and *in vivo* immune responses / Edited by Beat A. Imhof, Sonia Berrih-Aknin, Sophie Ezine. — New York : Marcel Dekker, 1991, ch 68, pp. 407-411.

Blauwgeers J.L.G., C.J.J. Mulder, P.K. Das, J. Haagsma, G.N. Tytgat.
Crohn's disease, a mycobacterial etiology?
In: Pathogenesis of inflammatory bowel disease / Edited by Derek Jewell. — Review in depth : European journal of gastroenterology and hepatology 2, 1990, 237-240.

Borgsteede F.H.M., S. Schavemaker, W.P.J. van der Burg, C.P.H. Gaasenbeek, J.J. Pekelder.
Increase of anthelmintic resistance in sheep in the Netherlands.
Veterinary record 129, 1991, 430-431.

Borgsteede F.H.M.
Wormbesmettingen. Bijna alleen coccidiose heeft kans op stal.
Het Schaap 1991 4, 8-9.

Borgsteede F.H.M.
Hemonchus laat schapen bloeden.
Het Schaap 1991 6, 24-25.

Borgsteede F.H.M.
Inhibitie bij nematoden, een intrigerend fenomeen.
Jansen medisch-wetenschappelijk nieuws, Veterinair supplement 2, 1991, 66-71.

Borgsteede, F.H.M.
Anthelmintic resistance in gastrointestinal nematodes of herbivorous animals in Europe.
In: Resistance of parasites to antiparasitic drugs / J.C. Boray, P.J. Martin, R.T. Roush (editors). — New Jersey : MSD Agvet, 1990, pp. 81-87.

Biedenbeek P.J., E.J. Snijder, A.F.H. Noten, J.A. den Boon, W.M.M. Schaaper, M.C. Horzinek, W.J.M. Spaan.
The polymerase gene of corona- and toroviruses: evidence for an evolutionary relationship.
In: Pathogenesis and molecular biology of coronaviruses / Eds.: D. Cavanagh and T.D.K. Brown. — New York ; London : Plenum, 1990. — Adv. exp. med. biol. 276, 1990, 307-316.

Dungen H.M. van den, E. Smolders, C.C.F. Accord-Burleson, G. Bruin.
Effect of frequent milking on fertility in dairy cattle.
Journal of reproduction and fertility, Abstract series 8, 1991, 29.

Dungen H.M. van den, L.P. Jager, N.B. Lucas Luijckx, G.J. de Graaf, A.J. Baars.
Adrenal toxicity of carbadox and furazolidone *in vitro*.
Acta veterinaria Scandinavica Supplement 87, 1991, 338-340.

Engvall A., E. Olsson, N. Bleumink-Pluym, E.A. ter Laak, B.A.M. van der Zeijst.
Epidemiology and control of contagious equine metritis in Sweden.
Sixth international conference on equine infectious diseases, Cambridge, England, 7th-11th July 1991, p. 23.

Enjuanes L., F. Gebauer, I. Correa, M.J. Bullido, C. Sune, C. Smerdou, C. Sanchez, J.A. Lenstra, W.P.A. Posthumus, R.H. Meloen.
Location of antigenic sites of the S-glycoprotein of transmissible gastroenteritis virus and their conservation in coronaviruses.
In: Pathogenesis and molecular biology of coronaviruses / Eds.: D. Cavanagh and T.D.K. Brown. — New York ; London : Plenum, 1990. - Adv. exp. med. biol. 276, 1990, 159-172.

Fentener van Vlissingen J.M., J.G.M. Bakker, L.P. Jager, N.P. Lenis, H. de Visser, F.G.M. Russel, J.E. van Dijk.
The kinetics of plasma lysine after oral and parenteral administration to pigs.
In: Digestive physiology in pigs : Proceedings of the Vth international symposium on digestive physiology in pigs, Wageningen, Netherlands, 24-26 April 1991 / Edited by M.W.A. Verstegen, J. Huisman, L.A. den Hartog. - Wageningen : PUDOC, 1991, pp. 88-98. — (EAAP publication ; no. 54). - ISBN 90-220-1040-6.

Giessen J.W.B. van der, A. Eger, J. Haagsma, B.A.M. van der Zeijst.
Sequence analysis of 16S ribosomal RNA of *Mycobacterium paratuberculosis* and several atypical mycobacteriae; applications for diagnosis.
Proceedings 5th Northam. reg. meeting on paratuberculosis, Toronto, June 1989. In: The paratuberculosis newsletter 1, 1989, 14.

Graaf G J. de, H.M. van den Dungen, C.C.F. Accord-Burleson, A.J.Baars.
Dispersed cells from porcine adrenal cortex as a tool in *in vitro* toxicity testing.
Proceedings 32nd meeting of the Dutch federation of medical scientific societies, 1991, p. 100.

Haagsma J., C.J.J. Mulder, A. Eger, J. Bruin, R.J. van Ketel, G. Tytgat.
Mycobacterium paratuberculosis isolated from patients with Crohn's disease in the Netherlands.
Scandinavian journal of gastroenterology 24, Supplement 158, 1989, 168.

Haagsma J., J.F. Poilane.
Tuberculosis in captive Arabian oryx.
Proceedings 1st symposium on wildlife conservation and development in Saudi Arabia, Riyadh, February 1987, Publication no 3, 1989, p. 349-357.

Haagsma J., A. Eger.
Elisa for diagnosis of tuberculosis and chemotherapy in zoo and wildlife animals.
Proceedings American association of zoo veterinarians, South Padre Island, 1990 pp. 99-103.

Haenen O.L.M.
Visziekten en therapie in Nederland : 1985-1990.
Aquacultuur september 1991, 14-18.

Haenen O.L.M., A. Davidse.
Susceptibilities of various freshwater fish species to pike fry rhabdovirus and spring viremia of carp virus.
Vth. Int. Conf. "Diseases of fish and shellfish", E.A.F.P., August 25-29, 1991, Budapest. Abstract p. 47.

Heijden P.J. van der, A.T.J. Bianchi, M. Dol., B.A. Bokhout.
Comparison of two methods for collecting murine intestinal secretions to detect antigen-specific antibodies.
Proceedings congress July 1990, Compiègne, France ; In: Lymphatic tissues and *in vivo* responses / Edited by Beat A. Imhof, Sonia Berrih-Aknin, Sophie Ezine. - New York : Marcel Dekker, 1991, ch 87, pp. 513-517.

Heijden P.J. van der, A.T.J. Bianchi, W. Stok, B.A. Bokhout.
Influence of the time of weaning on the spontaneous (background) immunoglobulin production in the murine small intestine.
In: Advances in mucosal immunity / Eds.: T.T. MacDonald *et al.* — Dordrecht [etc.] : Kluwer Academic Publ., 1990, pp. 479-481.

Heijden P.J. van der, A.T.J. Bianchi, M.A. Dol, J.W. Pals, W. Stok, R. Zwart.
Enhancement of enteric mucosal immune response by cholera toxin of cholera toxin B-unit.
In: Advances in mucosal immunity / Eds.: T.T. MacDonals *et al.* — Dordrecht [etc.] : Kluwer Academic Publ., 1990, pp. 371-373.

Heijden P.J. van der, A.T.J. Bianchi, L.W.S. Loyens, H.W.M. Moonen-Leusen, J.W. Scholten.
Development of the intestinal B and T cell compartment in the pig.
In: Advances in mucosal immunity / Eds.: T.T. MacDonals *et al.* — Dordrecht [etc.] : Kluwer Academic Publ., 1990, 473-475.

Heijden P.J. van der, W.A. de Leeuw.
Ten geleide bij feature issue "Immunologie van gastro-intestinale helminth infecties".
Tijdschrift voor diergeneeskunde 115, 1990, 1041.

Ingh T.S.G.A.M. van den, T.G. Kimman, G.J. Binkhorst, J.M.A. Pol, J.T. van Oirschot, A.L.J. Gielkens, M.E. Roelvink.
Ziekte van Aujeszky bij het paard.
Verslag van de vergadering van de Nederlandse Vereniging voor Pathologie, gehouden op 16 maart 1991 te Maastricht : Nederlands tijdschrift voor geneeskunde 135, 1991, 2305.

Jeurissen S.H.M., J.M.A. Pol, G.F. de Boer.
De rol van niet-lymfoïde cellen bij de ziekte van Marek.
Verslag van de vergadering van de Nederlandse Vereniging voor Pathologie, gehouden op 16 maart 1991 te Maastricht : Nederlands tijdschrift voor geneeskunde 135, 1991, 2306-2307.

Jeurissen S.H.M., D. van Roozelaar, E.M. Janse.
Absorption of carbon from the yolk into gut-associated lymphoid tissues of chickens.
Developmental and comparative immunology 15, 1991, 437-442.

Jeurissen S.H.M.
Structure and function of the chicken spleen.
38th Forum in immunology : Research in immunology 142, 1991, 352-355.

Jeurissen S.H.M., E.M. Janse, G.F. de Boer.
Antigen handling by non-lymphoid cells in the chicken spleen.
Proceedings congress, July 1990, Compiègne, France; In: Lymphatic tissues and *in vivo* immune responses / Edited by Beat A. Imhof, Sonia Berrih-Aknin, Sophie Ezine. — New York : Marcel Dekker, 1991, ch 132, pp. 771-775.

Jong M.C.M. de, L.A.M.G. van Leengoed, G. Wensvoort, C. Terpstra, J.H.M. Verheijden.
Population-biological studies of the porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARS) before and after the isolation of the Lelystad virus.
VEEC Proceedings. — Utrecht, 1991, 1-16.

Kimman T.G.
Experimental infection of calves with respiratory syncytial virus as model for studies of viral pathogenesis and immunity.
Animal models of respiratory syncytial virus infections : Proceedings of a symposium organized at Fondation Marcel Mérieux, Veyrier-du-Lac, France, October 23-25, 1990, pp. 93-99.

Kimman T.G.
Vaccination and ELISA: A partnership against Aujeszky's disease.
In: Isotope and related techniques in animal production : Proceedings of an international symposium on nuclear and related techniques in animal production and health jointly organized by the International Atomic Energy Agency and the Food and Agriculture Organization of the United Nations. — Vienna, 15-19 April 1991, pp. 509-519.

Kimman T.G., A.T.J. Bianchi, D. van Zaane.
The immune system and the response to pseudorabies virus infection.
First international symposium on the eradication of pseudorabies (Aujeszky's) virus, May 19-22, 1991, St. Paul, Minnesota, USA, pp. 6.

Kimman T.G., N. de Wind, N. Oei-Lie, J.M.A. Pol, A.J.M. Berns, A.L.J.Gielkens.
Role of different Us genes in the virulence and pathogenesis of Aujeszky's disease virus.
Proceedings 2nd congress of the European society for veterinary virology, Uppsala, 23-26 Sept., 1991, p. 37.

Kimman, T.G.
Safety of genetically engineered vaccines. Contribution to the course "Introduction of genetically modified organisms into the environment : Biosafety aspects".
Held on December 4-8, 1991, at the Agricultural University, Wageningen, The Netherlands.

Koch G., A. Kant.
Binding of antibodies that strongly neutralise infectious bronchitis virus is dependent on the glycosylation of the viral peplomer protein.
In: Coronaviruses and their diseases / Edited by D. Cavanagh and T.D.K. Brown. — New York : Plenum Press, 1990, pp. 143-150.

Laak E.A. ter, B.E.C. Schreuder.
Serological diagnosis of caseous lymphadenitis in goats and sheep.
Veterinary record (letter), 128, 1991, 436.

Laak E.A. ter
Identification of *Mycoplasma* F38 biotype.
Veterinary record (letter) 129, 1991, 295.

Laven J.S.E., L.C.F. Haans, W.P.Th.M. Mali, E.R. te Velde, C.J.G. Wensing, J.M. Elmers.
Effecten van varicocele behandeling bij adolescenten: een prospectieve gecontroleerde studie.
Annalen van de vereniging voor fertiliteitsstudie, Amsterdam, 27 april 1991, achttiende jaargang deel I, p. 7.

Laven J.S.E., C.J.G. Wensing, J.C. Meijer, W.T.C. Wolvekamp, K.J. Teerds.
Total ligation of the left renal vein in the dog: An inappropriate model for varicocele.
International journal of andrology 14, 1991, 348-358.

Lensing H.H.
Aspects of efficacy and target animal safety by registration of veterinary medicines.
Proceedings 5th international technical consultation on veterinary drug registration, Oktober 8-12, 1990, The Hague, p. 74-79.

Leeuw W.A. de.
Enkele aspecten van de immuunrespons bij *Fasciola hepatica* infecties bij rund en schaap.
NRLO rapport 90/31, Helminthen-infecties bij landbouwhuisdieren, 1990, p. 19.

Leeuw W.A. de.
Immunodiagnostiek van longworm- en leverbot-infecties.
NRLO rapport 90/31, Helminthen-infecties bij landbouwhuisdieren, 1990, p. 161.

Leeuw W.A. de, J.B.W.J. Cornelissen, C. van Deursen.
Fasciola hepatica Infektionen beim Rind: Isotypspezifische humorale Immunantwort im Serum und Fäzes.
Proc. 14. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Parasitologie, Marburg, 4-6 April 1990, V 70.

Madic J., J. Magdalena, J. Quak, M.A. Veldhuis, J.T. van Oirschot.
Epitope-specific and isotype-specific antibody responses in sera and mucosal secretions of calves experimentally infected with bovine herpesvirus type 1.
Proceedings 2nd congress of the European society for veterinary virology, Uppsala, 23-26 Sept., 1991, p. 129.

Maes R.K., F.A.M. Rijsewijk, J.T. van Oirschot.
PCR based detection of bovine herpesvirus type 1 DNA in bovine semen.
Proc. XVIth international herpesvirus workshop, Pacific Grove, California, USA, July 7-12, 1991, p. 247.

Meloen R.H.
Een klein maar belangrijk virusfragment.
In: AIDS : De jacht op een virus / Editor: Simon Rozendaal. — Maastricht ; Brussel : Centrale Uitgeverij, 1990, pp. 82-83. — ISBN 90 73 035 04 X.

Oirschot J.T. van, A.J.M. Berns, R.J.M. Moormann, A.L.J. Gielkens.
Un vaccino marcato per la prevenzione della malatti di Aujeszky ottenuto per ingegneria genetica ed il relativo test diagnostico.
Estratto de selezione veterinaria XXXII, 1991, 1 bis, 177-189.

Oirschot J.T. van.
Pseudorabies, its host and the environment.
Proceedings of the first international symposium on eradication of pseudorabies, St. Paul, Minnesota, USA, May 19-22, 1991, p. 1.

Oirschot J.T. van.
Why pseudorabies is a candidate for eradication.
Proceedings of the first international symposium on eradication of pseudorabies, St. Paul, Minnesota, USA, May 19-22, 1991, p. 13.

Oirschot J.T. van.
Vaccinaties bij landbouwhuisdieren.
Proceedings symposium IBR en BVD, recente ontwikkelingen, Raamsdonkveer, 15 mei 1991, pp. 19-23.

Oirschot J.T. van.
Bovine herpesvirus type 1: pathogenese en bestrijding.
Proceedings symposium luchtweginfecties bij rundvee, Oosterbeek, 29 oktober 1991, pp. 13-18.

Oirschot J.T. van.
Vaccinatie tegen IBR en parainfluenza.
Syllabus PAO-Diergeneeskunde, Zeist, 1991, 6 p.

Oirschot J.T. van.
Vaccinatie tegen infecties van het respiratie-apparaat bij het varken.
Syllabus PAO-Diergeneeskunde, Zeist, 1991, 8 p.

Over H.J., J. Jansen, P.W. van Olm.
The impact of helminthoses on animal production in the developing countries.
CDI-FAO report, July 1991, Part one, 37 p., Part two, Regional inventory, Annexes: unnumbered.

Pijpers A., E.J. Schoevers, J.C.M. Vernooy, L.A.M.G. van Leengoed, J.H.M. Verheijden.
The prophylactic effect of doxycycline in feed medication against an App challenge in pigs.
Acta veterinaria Scandinavica 87 Supplement, 1991, 369-371.

Pol J.M.A.
Interferons affect the morphogenesis and virulence of Aujeszky's disease virus.
Seminaire INRA Jouy en Josas, 23 nov. 1990.

Pol J.M.A., G.J. Kok, F. Wagenaar, J. Broekhuijsen-Davies.
Effecten van interferon-alpha op herpes suis infectie van het neusepitheel van varkens.
Verslag van de vergadering van de Nederlandse Vereniging voor pathologie, gehouden op 16 maart 1991 te Maastricht : Nederlands tijdschrift voor geneeskunde 135, 1991, 2305.

Posthumus W.P.A., R.H. Meloen, L. Enjuanes, I. Correa, A.P.K.M.I. van Nieuwstadt, G. Koch, J.G. Kusters, R.J. de Groot, W. Luytjes, W.J. Spaan, B.A.M. van der Zeijst, J.A. Lenstra.
Linear neutralizing epitopes on the peplomer protein of coronaviruses.
In: Pathogenesis and molecular biology of coronaviruses / Eds.. D. Cavanagh and T.D.K. Brown. — New York ; London : Plenum Press, 1990. — Adv. exp. med. biol. 276, 1990, 181-8 . also in thesis University of Utrecht, 1991, ch. 5, 83-94.

Rozing J., C. Coolen, P.J. van der Heijden, W. Stok, J. Weegenaar, A.T.J. Bianchi.
Decrease of IgA-secreting cells in aging mice.
Proceedings congress, july 1990, Compiègne, France ; In: Lymphatic tissues and *in vivo* responses / Edited by Beat A. Imhof, Sonia Berrih-Aknin, Sophie Ezine. — New York : Marcel Dekker, 1991, pp. 401-405.

Schaaper W.M.M., H. Lankhof, W.C. Puijk, R.H. Meloen.
Role of flanking amino acids in the immunogenicity of peptides.
In: Peptides 1990, Proceedings of the twenty-first European peptide symposium / E. Giralt and D. Andreu (Eds.). — Leiden : ESCOM Science Publishers, 1991, pp. 862-863.

Schreuder B.E.C.
CDI start onderzoek naar BSE en scrapie.
Het schaap augustus 1991, 8-11.

Schreuder B.E.C.
East Coast Fever (ECF)-vaccination, Muguga cocktail versus local isolates.
Equator 3, July 1991.

Smits M.A., J. Briaire, R. Jansen, L.A.M.G. van Leengoed, J.E. van Dijk, E.M. Kamp.
Endobronchial inoculation with cytolysins (cly) of *Actinobacillus pleuro-pneumoniae*.
Proceedings CRWAD, Chicago 1991.

Stegeman J.A., W.A. Hunneman, T.G. Kimman, F.W. Berndsen.
Attempts to reduce the spread of Aujeszky's disease (Pseudorabies) virus by intensive vaccination in an area with high pig density.
First international symposium on the eradication of pseudorabies (Aujeszky's) virus, St. Paul, Minnesota, May 19-22, 1991, p. 26.

Teerds K.J., D.G. de Rooij, F.F.G. Rommerts, C.J.G. Wensing.
Can hCG pretreatment protect Leydig cells against the cytotoxic effects of EDS?
Testis workshop 1990.

Teerds K.J., D.G. de Rooij, F.F.G. Rommerts, C.J.G. Wensing.
Development of a new Leydig cell population after destruction of existing Leydig cells by ethane dimethane sulphonate (EDS).
Testis workshop 1990.

Terpstra C.
Control and eradication programmes of Aujeszky's disease in EC-countries.
OIE-FAVA symposium on the control of major livestock diseases in Asia. — Pattaya, Thailand, 8-9 November 1990. — Paris : Office International des Epizooties, 1991, pp. 59-64. — ISBN 92-9044-283-2.

Terpstra C., G. Wensvoort.
Epizootiology and control of classical swine fever in high density pig production areas.
OIE-FAVA symposium on the control of major livestock diseases in Asia. — Pattaya (Thailand), 8-9 November 1990. — Paris : Office International des Epizooties, 1991, pp. 31-37. — ISBN 92-9044-283-2.

Terpstra C., G. Wensvoort, E.A. ter Laak.
The "new" pig disease: Laboratory investigations.
Report on the seminar/workshop on the new pig disease (PRRS), Brussels, 29-30 April 1991, EC, Directorate General of Agriculture, pp. 36-45.

Terpstra C.
Laboratory diagnosis of African swine fever in ASF-free and ASF-endemic countries.
Proceedings EC workshop on African swine fever.

Wensing C.J.G.
Morphological and endocrinological aspects of normal and abnormal descent of the testis.
Journal de gynécologie obstrétrique et biologie de la reproduction 20, 1991, 595.

Zoun P.E.F.
Onderzoek naar de oorzaak van de vogelsterfte langs de Nederlandse kust gedurende december 1988 en januari 1989.
Rapport nr. H-121519, 18 april 1991, DLO-Centraal Diergeneeskundig Instituut, Lelystad, 1991.

Zoun P.E.F., H. Peeters.
De dader ligt niet altijd op het kerkhof : Een geval van alfachloralosevergiftiging bij wilde vogels.
Tijdschrift voor diergeneeskunde 116, 1991, 887-888.
Nieuwsbrief voor vogelasielhouders 17, 1991 / Ministerie van Landbouw, Natuurbeheer en Visserij, Directie Natuur, Bos, Landschap en Fauna.

Zoun P.E.F., R.S. Boshuizen.
Jan van Genten slachtoffer van lozing van dodecylfenol in de Noordzee.
Vogelnieuws 2, 1991, 7.

Zoun P.E.F.
Het veilig schoonmaken van met chemicaliën besmeurde vogels.
Nieuwsbrief voor vogelasielhouders / Ministerie van Landbouw, Natuurbeheer en Visserij, Directie Natuur, Bos, Landschap en Fauna 17, 1991, 7.

Zoun P.E.F., A.J. Baars, R.S. Boshuizen.
A case of seabird mortality in the Netherlands during the winter of 1988/1989 caused by a spillage of nonylphenol and vegetable oils.
Proccedings of the NZG/NSO workshop "Oil pollution, beached bird surveys and policy : towards a more effective approach to an old problem", Rijswijk, The Netherlands, 19 April 1991 / C.J. Camphuysen & J.A. van Franeker (editors). — SULA 5 (special issue), 1991, 47-48. — also in SULA 5, 1991, 101-103.

Produktenlijst

I. Sera

Miltvuurserum voor herkauwer, varken

II. Vaccins

Mond- en klauwzeer vaccin* voor herkauwer, trivalent type A, O en C
Mond- klauwzeer vaccin* voor varken, monovalent type O en C
* alléén voor gebruik buiten de EG
Miltvuurvaccin voor paard, herkauwer, varken
Pseudomonas aeruginosa-vaccin voor nertsen
Paratuberculose-vaccin

III. Sensitinen

Bovine tuberculine PPD
Aviaire tuberculine PPD
Johnine PPD
Malleïne PPD

IV. Voor laboratoriumtoepassing

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

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

c) *Conjugaten en sera voor diagnostiek*
FITC anti PPV-conjugaat voor IFT
FITC anti IBRV-conjugaat voor IFT
FITC anti BRSV-conjugaat voor IFT
FITC anti Aujeszky virus-conjugaat voor IFT
FITC anti TGEV-conjugaat voor IFT
FITC anti PI_3V-conjugaat voor IFT
Anti BVDV-serum varken voor IFT
Standaard anti IBRV-serum, rund (SN-test)
Standaard anti Aujeszky virus-serum, varken (SN-test)
Standaard anti PPV-serum, varken (HI-test + ELISA)
Standaard negatief varkensserum (diverse testen)
Standaard anti PI_3V-serum, rund (HI-test)
Standaard anti BRSV-serum, rund (ELISA)
Standaard negatief runderserum (diverse testen)
Standaard anti BVDV-serum, rund (ELISA)
Standaard anti influenza H_1N_1-serum, varken (HI-test)
Standaard anti influenza H_3N_2-serum, varken (HI-test)
Standaard anti *Brucella abortus* voor SAT
Testserum dysenterie (Doyle) voor IFT
Runderplasma voor clumpingtest

d) *ELISA-componenten*
BRS-ELISA antilichaam-gecoate plaat
BRS-ELISA BRSV-antigeen
BVD-ELISA antilichaam-gecoate plaat
BVD-ELISA BVDV-antigeen
BVD-ELISA HRPO-conjugaat
PPV-ELISA antilichaam-gecoate plaat
PPV-ELISA PPV-antigeen
PPV-ELISA HRPO-conjugaat
Paardeserum, onderdeel ELISA-buffers

e) *Diversen*
Gedefibrineerd runderbloed
Geïnactiveerd normaal runderserum
Rundererythrocyten met kristalviolet (voor H.E.T.-medium)
Staphylococcen β-toxine (voor H.E.T.-medium)
PPV-antigeen voor HI-test
Spoelapparaat voor ELISA
PI_3V-antigeen voor HI-test
Mycobactine P/Fe voor Mycobacteria-groeibodems
MCA-anti-BRSV voor IFT
MCA-anti-Aujeszky voor IFT

PROJECTENLIJST 1991

Titel — projectnummer
projectleider, projectgroepleden (alfabetisch)

Diagnostiek en bijbehorend onderzoek van visziekten in verband met aquacultuur 01
Haenen, Ter Laak, de Leeuw, Pol

Diarree bij biggen rond de speenleeftijd incl. slingerziekte 02
Nabuurs, Baars, Van Dijk, Van Nieuwstadt, Van Zijderveld

Infectieziekten en intoxicaties bij de wilde fauna 06
Van Dijk, Baars, De Boer, Borgsteede, Haagsma, Ter Laak

Reproductie-stoornissen, incl. endocrinologie 10
Van Dijk, Baars, Van den Dungen, Van Leeuwen, Meloen, Moerman, Nabuurs, Thoolen

Veterinaire toxicologie in praktijksituaties 12
Baars, Van den Dungen

Mycobacteriële infecties en sensitinen 14
Van Zijderveld, Haagsma

Anaerobe infecties 16
Haagsma, Nabuurs, Vecht

Algemeen bacteriologisch en taxonomisch onderzoek ten behoeve van dierziekteproblemen 18
Ter Laak, Smeysters

***Mycoplasma*-infecties** 19
Ter Laak

***Actinobacillus*-infecties varken** 20
Van Leengoed, Cruysen, Kamp, Smits

Atrofische rhinitis bij het varken 21
Kamp, Van Leengoed, Moerman, Smits

Gedragsfysiologie, ecologie en bestrijding van ziekteverwekkende arthropoden 22
Thomas

Colibacillosis bij biggen 23
Van Zijderveld, Nabuurs

Aetiologische, immunologische en epidemiologische aspecten van mastitis 24
Vecht

***Streptococcus suis* type 2 infecties bij varkens** 25
Vecht, Smith, Smits

Overleving pathogenen in drijfmest 28
van Leeuwen, Borgsteede, de Jong, Moen, Moerman, Terpstra, Van Zijderveld

Mucosaal immuunsysteem van het varken 29
Bianchi, Bokhout, Van der Heijden

Brucellose 30
Bercovich, Dokter, Haagsma, Ter Laak, Olijhoek, Smits

Leptospirose 31
Olijhoek, Bercovich, Bokhout, Haagsma, Moerman ,Smits

Inductie, manipulatie en expressie van de mucosale immuunrespons 33
Van der Heijden, Bianchi, Bokhout

Epidemiologisch onderzoek m.b.t. helminthen 36
Borgsteede, Thomas

Onderzoek van mond- en klauwzeervaccins 46
Barteling, Van Maanen, Terpstra, Vreeswijk

MKZ vaccincontrole en epidemiologisch onderzoek 47
Terpstra, Barteling, Van Maanen

Varkenspest en exotische virale dierziekten 49
Terpstra, Moormann, Wensvoort

Virusinfecties bij paarden 53
Van Maanen, Gielkens, Terpstra

Ziekte van Aujeszky 54
Kimman, Bianchi, Gielkens, de Jong, Moormann, Van Oirschot, Peeters, Pol
thema's:
- Moleculaire biologie en vaccin-ontwikkeling
- Diagnostiek, epidemiologie en bestrijding
- Cellulaire immunologie
- Pathogenese
- Functionele rol van gI

Virale diarree bij varkens 55
Terpstra, Nabuurs, Van Nieuwstadt, Vreeswijk

Aviaire leukose 57
De Boer, Koch, Moormann

Ziekte van Marek 58
De Boer, Jeurissen, Pol

Enzoötische leukose bij het rund 59
Van Oirschot, De Boer

Infectieuze bronchitis 60
Koch, De Boer, Jeurissen

Mucosaal immuunsysteem van de kip 61
Koch, Jeurissen

Rabiesdiagnostiek 68
Van Oirschot, Van Dijk, Haagsma, Ter Laak, Schreuder, Van Zijderveld

Bovine virus diarree 70
Van Oirschot, Dekker, Moerman, Moormann, Straver, Terpstra, Wensvoort

Produktie van virologische diagnostica en begeleiding van het gebruik 71
Van Oirschot, vacature

Pathogenese en immunologie van RS-virusinfecties bij runderen 72
Van Oirschot, Kimman, Schreuder, Straver, vacature

Produktie tuberculine 73
Dokter, Haagsma, Wiers
* Produktie overige biologische preparaten
* Ontwikkeling en verbetering van veterinaire biologische produkten en produktiemethoden
Dokter, Wiers

Onderzoek kwaliteitsbewaking 76
Wiers, Dokter, Ter Laak
* Routinematige kwaliteitscontrole van CDI-produkten

Immunopathologie en immunodiagnostiek van *Fasciola hepatica* infecties 78
De Leeuw, Bokhout

Produktie van SPF, MDF en kiemvrij proefdiermateriaal 79
Kroon, Moerman
* Wet op de Dierproeven (Artikel 14)

Biochemische toxicologie van cadmium bij landbouwhuisdieren 80
Baars

Rijkskwaliteitscontrole van immunobiologische diergeneesmiddelen 81
Lensing, Oei, Woltjes

Ontwikkelings- en standaardisatie onderzoek m.b.t. de rijkskwaliteitscontrole van immunobiologische diergeneesmiddelen 82
Lensing, Oei, Woltjes

Rijkskwaliteitscontrole van desinfectiemiddelen en insecticiden voor diergeneeskundig gebruik 83
Lensing, Oei, Seinhorst, Woltjes

Rijkskwaliteitscontrole van farmaceutische diergeneesmiddelen 84
Lensing, Jager, Prenen, Sandberg, Seinhorst

Onderzoek van transport-mechanismen in het maag-darm-kanaal van varkens 86
Jager, Lensing

Advisering en ad hoc onderzoek t.a.v. ziekten bij herkauwers 87*
Van Oirschot

Advisering en ad hoc onderzoek t.a.v. ziekten bij varkens en paarden 88*
Terpstra

Advisering en ad hoc onderzoek t.a.v. ziekten bij pluimvee 90*
De Boer

Bovine herpesvirussen 91
Van Oirschot, Gielkens, Moerman, Moormann, Rijsewijk Straver

Diagnostisch onderzoek van dieren, incl. im- en export-onderzoek 93
Van Oirschot, De Boer, Van Dijk, Haagsma, Ter Laak, Smeijsters, Terpstra

Ontwikkelingssamenwerking 99
Schreuder, Over

Synthetische peptiden 100
Meloen, Oonk, Schaaper
thema's:
- Mond- en Klauwzeer
- Endocrinologie
- Human immunodeficiency virus
- Coronavirussen
- Mimotopen

Certificering diagnostisch onderzoek 105
Meulepas

Infectieuze anaemie bij de kip 106
De Boer

Bovine spongieuze encefalopathie (BSE) 107
Schreuder, Van Keulen, Meloen, Smits

* Deze projecten zijn bedoeld om activiteiten te verantwoorden die niet in relatie staan tot één der andere projecten.