

cdi-dlo



CDI-DLO

Postbus 65

8200 AB Lelystad



0000 0714 1142

1359

Redactiecommissie: Drs. P.W. van Olm en dr. J.M. van Leeuwen

Foto's en illustraties: A. van Welie en J. Iedema
Grafische tekstverwerking: H.M. Daus-Ooms

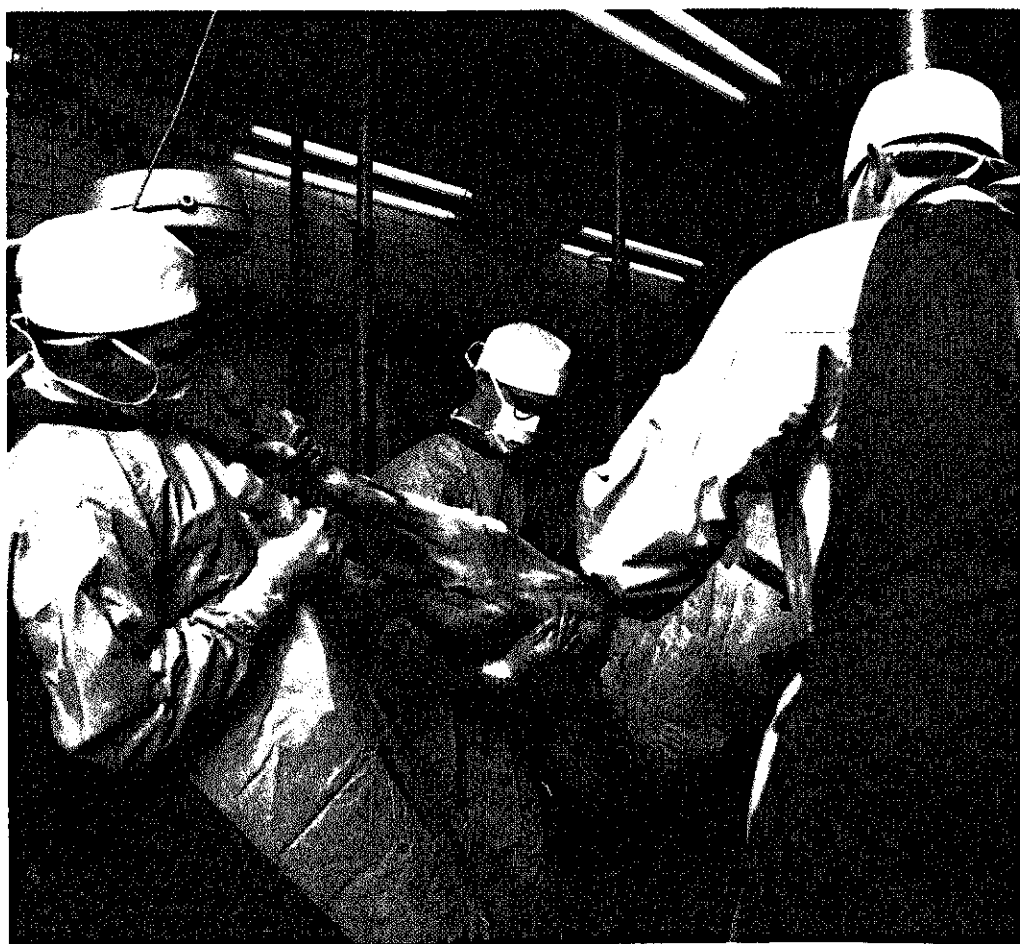
Druk: Drukkerij de Boer, Lelystad

© CDI-DLO, Lelystad 1993

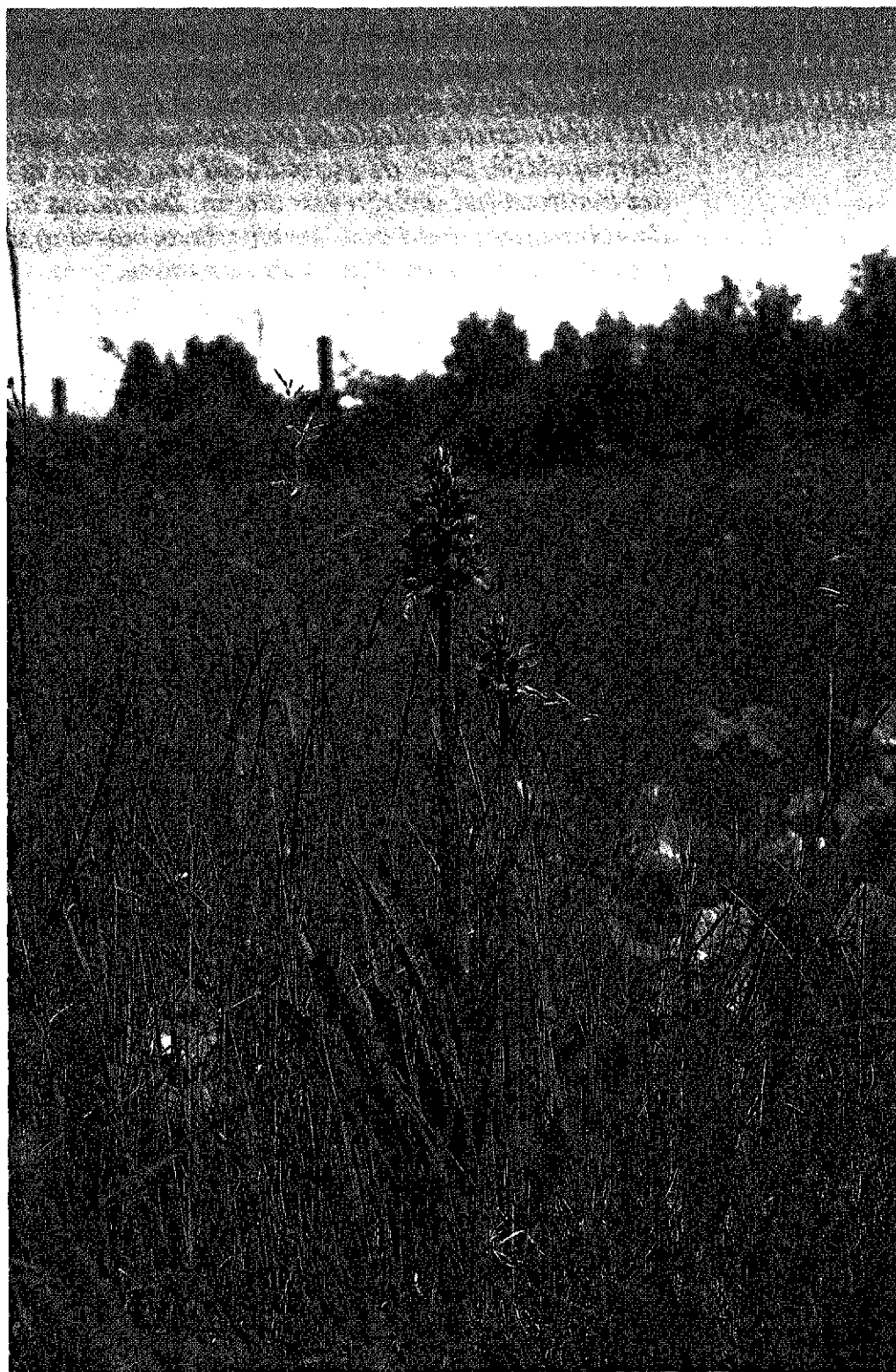
Niets uit deze uitgave mag worden overgenomen zonder voorafgaand overleg met het DLO-Centraal
Diergeneeskundig Instituut

Inhoud

	pag
Voorwoord	7
Het jaar 1992	7
Vaccins.....	13
Niet-spreidende vaccins.....	16
Varkenspest en SVD	22
Bovine herpes virus	30
Kwaliteitsborging van laboratorium diagnostiek	35
<i>Salmonella enteritidis</i>	40
<i>Streptococcus suis</i> type 2	46
Mycoplasma's	51
 Algemeen	
Bestuur	60
Directie en staf	62
Projecten.....	66
Europese samenwerking	70
Ontwikkelingssamenwerking	72
Produkten en diagnostiek	73
Publikaties.....	77
Overige publikaties	131



Het CDI-DLO zet zich in voor een gezonde dierhouderij in het belang van mens en dier. Voorop staat een duurzame, rendabele veehouderij met een minimale belasting van het milieu. Het voornaamste doel is de instandhouding van een gezonde dierpopulatie. Door de gezondheid van dieren te bevorderen dient het instituut het welzijn van dieren. Daarnaast draagt het bij aan de volksgezondheid door kwaliteitsverbetering van het dierlijk produkt in de voedselketen van de mens.



*Wilde orchideeën bloeien bij
het complex Edelhertweg*

Voorwoord

Voor u ligt het Jaarverslag 1992 van het DLO-Centraal Diergeneeskundig Instituut (CDI-DLO).

Deze publikatie pretendeert niet een volledig overzicht te geven van alle activiteiten, zo wordt bijvoorbeeld niet de voortgang van alle lopende onderzoeksprojecten beschreven. Er is voor gekozen om enige hoogtepunten te belichten, aangevuld met gegevens van meer algemene aard. Wél wordt uitgebreid aandacht geschonken aan de CDI-DLO publikaties in gerefereerde wetenschappelijke tijdschriften; hiermee krijgt u een goed beeld van de totale wetenschappelijke output van het CDI-DLO in het afgelopen jaar.

Financiën en personeel

In 1992 moest op financieel gebied een essentiële bezuiniging doorgevoerd worden, terwijl er op het personele vlak verder gekrompen diende te worden.

Deze zware financiële taakstelling is gerealiseerd. Het CDI-DLO is erin geslaagd het jaar 1992 zonder een tekort op de materiële begroting van f 20 miljoen af te sluiten.

De goede invulling hiervan is mogelijk geworden door heel goed te letten op grote en kleine uitgaven binnen het Instituut, door een vergroting van de externe financiering van onderzoek en door het op peil houden van de inkomsten uit diensten en verkoop van producten. Daarnaast waren er een paar meevallers in de sfeer van de milieuheffingen.

Het beter beheersen van veel uitgaven is in dit verband heel belangrijk geweest. De afdelingen Technische Dienst (TD), Financiële, Materiële en Algemene Zaken (FMAZ) en Proefdiervoorziening en Biotechniek (PVB) zijn beheerders van een aantal grote algemene budgetten, die in 1992 beter in de hand zijn gehouden. Het vergde van veel medewerkers de nodige inventiviteit om sommige van deze bezuinigingen mogelijk te maken.

De personele krimp die doorgevoerd moest worden, is voor een belangrijk deel gerealiseerd door de portiersdiensten te privatiseren. Eind 1992 bedroeg de A-formatie 284 plaatsen. Het aantal tijdelijke formatieplaatsen, de z.g. Z-formatie bedroeg ongeveer 70. De

Z-formatie wordt geheel gefinancierd met externe middelen. Hiernaast telt het CDI-DLO een steeds wisselend aantal stagiaires en gedetacheerde werknemers.

Contracten

Voor 1992 was uitgegaan van een sterke uitbreiding van het extern gefinancierde onderzoek. Veel van deze uitbreidingen waren al voor 1992 in contracten vastgelegd, maar tijdens 1992 is er nog het nodige aan toegevoegd, vooral doordat de afdelingen Open Afdeling Virologie (OAV), Bacteriologie, Laboratorium voor Moleculaire Immunologie (LMI), Immunologie, Moleculaire Biologie (MB) en Zoogdier Virologie (ZV) succesvol zijn geweest bij het verwerven van EG subsidies. Het CDI-DLO is daarmee het Instituut binnen de DLO-organisatie met de meeste EG subsidies. Daarnaast is de afdeling Aviaire Virologie en Tumorigeniteit (AVTV) erin geslaagd een belangrijk extern contract voor drie jaar verlengd te krijgen en heeft OAV een belangrijk contract gerealiseerd voor Bovine herpesvirus (BHV1) onderzoek.

In de begroting 1992 was gerekend op inkomsten uit een belangrijk EG contract waarin het CDI-DLO wordt belast met referentietaken op het gebied van Mond- en klauwzeer (MKZ)-vaccin. Dit contract is met veel vertraging tot stand gekomen en heeft voor 1992 minder ingebracht dan waarop was gerekend. De definitieve ondertekening vond pas in de laatste week van het jaar plaats. Dit zogenaamde Community Coordinating Institute (CCI)-contract zal in de komen-

de jaren in belangrijke mate bijdragen aan de externe inkomsten van het instituut.

Inkomsten

Het is te verwachten dat de geleidelijke vermindering van de rijksbijdrage aan het totale Instituutsbudget ook in de komende jaren zal doorgaan. Dit houdt in dat de bestaande inkomstenbronnen zullen moeten worden verruimd en dat nieuwe bronnen zullen moeten worden aangeboord.

Mogelijkheden hiertoe liggen vooral in de sfeer van de CDI-DLO produkten. Te denken valt aan royalty inkomsten door overdracht van produkten aan de industrie, maar ook aan de verkoop van eigen produkten door de eigen organisatie. Deze laatste mogelijkheid verdient speciale aandacht en vraagt om een heel zorgvuldige behandeling.

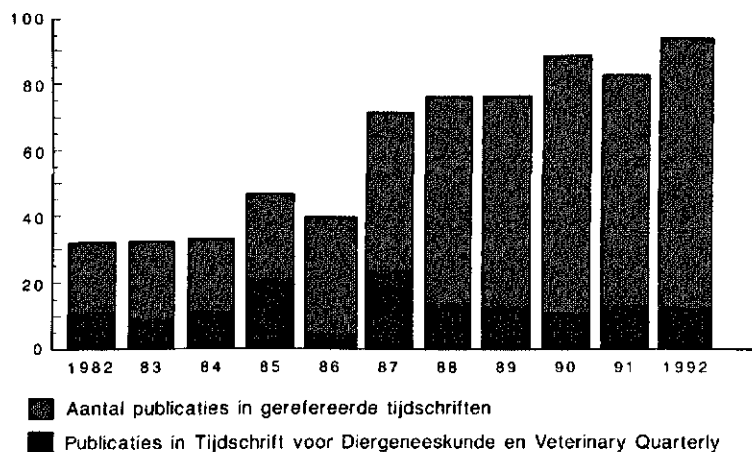
Traditioneel waren het twee produkten die ieder voor zich in belangrijke mate bijdroegen aan de CDI-DLO-inkomsten. Deze twee produkten zijn het MKZ-vaccin en de tuberculine.

In 1991 werd er nog van uit gegaan dat de productie van MKZ-vaccin tot het verleden zou behoren. Echter in de loop van 1992 is na overleg met de Directeur DLO, met de Departementsleiding en

met de afdeling Dierziektenbestrijding van de EG besloten de MKZ-productiefaciliteit in stand te houden en te renoveren. Door de medewerkers van de MKZ-productie-unit, medewerkers van de afdeling Produktie, Media-bereiding en Centrale Spoel- en Sterilisatie (PMC) en medewerkers van de TD is een grote inspanning geleverd om deze unit op te knappen en in gebruik te houden waarbij de productiecapaciteit zelfs vergroot is. Het eerste doel zal nu zijn om afzetmogelijkheden voor het geproduceerde vaccin te vinden.

Het tweede belangrijke produkt heeft in de afgelopen jaren te kampen gehad met productieproblemen. Door een goede gezamenlijke aanpak van deze problemen door medewerkers van de afdelingen PMC en Bacteriologie lijken deze problemen nu opgelost te zijn. De productiecapaciteit kan verhoogd worden. Dit houdt wel in dat ook hier nieuwe klanten gevonden dienen te worden.

Mogelijkheden om andere produkten grootschalig te gaan produceren worden thans onderzocht, terwijl tevens wordt nagegaan of enkele potentiële produkten tot echte produkten kunnen worden gemaakt.



Aantal CDI-DLO publikaties in wetenschappelijke tijdschriften over de afgelopen 10 jaar.

Public relations

Het is een belangrijke zaak om het werk van het CDI-DLO bekendheid te geven, niet alleen naar beleidsdirecties toe, maar ook naar een groter publiek. In aansluiting op het Meerjarenplan 1992-1997 is de profilering naar buiten toe extra aangezet. De afdeling Public Relations & Informatie (PRI) beijvert zich om via tal van activiteiten naar de pers toe het CDI-DLO extra te profileren en in 1992 is een begin gemaakt om dierenartsen en diergeneeskundige studenten directer te informeren over het CDI-DLO werk.

De traditionele manier om het CDI-DLO-onderzoekprodukt uit te dragen is uiteraard de wetenschappelijke publikatie. Sinds 1987 is er een duidelijk opgaande lijn geweest in het aantal CDI-publikaties in gerefereerde tijdschriften. Vorig jaar stakte deze opgaande lijn. In 1992 is deze opgaande trend duidelijk terug: er zijn in het afgelopen jaar 95 artikelen geplaatst in gerefereerde tijdschriften. Daarnaast zijn twee medewerkers van de afdeling Bacteriologie, U. Vecht en E.A. ter Laak, gepromoveerd tot Doctor aan de Rijksuniversiteit te Utrecht. Ook de wetenschappelijke visitatiecommissie, die afgelopen jaar het CDI-DLO onderzoek onder de loupe nam, kwam tot een positief oordeel.

Hoogtepunten

Enkele hoogtepunten in het onderzoek waren:

BHV1

Het BHV1 project van de Open Afdeling Virologie heeft geleid tot een conventioneel, geattenuëerd en geïnactiveerd gE deletiemutant vaccin. Met een bijbehorende diagnostische test voor antilichamen tegen virulent virus is een combinatie van vaccin en test beschikbaar die voor een gerichte bestrijding van koeiegriep kan worden ingezet. Na een soortgelijke ontwikkeling voor de

ziekte van Aujeszky is dit dus een tweede belangrijke stap voor een geheel andere aanpak voor de eliminatie van een ziekte die nog op grote schaal voorkomt.

Salmonella enteritides

Door drs. F.G. van Zijderveld en medewerkers is met behulp van monoclonale antilichamen een gevoelige en specifieke test ontwikkeld om antilichamen tegen de bacterie *Salmonella enteritides* in kipkesera of eieren aan te tonen. De oude testen waren niet in staat onderscheid te maken tussen verschillende *Salmonella* typen. De nieuwe test is een belangrijke verbetering die gebruikt kan worden bij de bestrijding van deze infectie in de gehele productieketen. Dit kan dus een belangrijke bijdrage gaan betekenen aan de bestrijding van voedselinfecties en de bevordering van de volksgezondheid.

Lelystad virus

De afdeling Moleculaire Biologie was bijzonder succesvol. In de eerste plaats werd in het begin van 1992 in bijzonder korte tijd de erfelijke informatie van het Lelystad virus opgehelderd. Inmiddels is hierop patent aangevraagd.

Varkenspestvirus

Daarnaast slaagde de varkenspestgroep onder leiding van dr. R.J.M. Moormann en dr. G. Wensvoort er in één van de oppervlakte-eiwitten van het varkenspestvirus in een systeem van insectencellen met behulp van een baculovirus-vector tot expressie te brengen. Met het zo geproduceerde recombinant eiwit blijkt het mogelijk varkens te beschermen tegen varkenspest. Een veilig, effectief vaccin lijkt binnen handbereik met als groot voordeel dat met een dergelijk vaccin in principe onderscheid gemaakt kan worden tussen gevaccineerde en geïnfecteerde dieren. Een dergelijk vaccin, dat thans nog op veel politieke problemen stuit, kan in de toekomst misschien gerealiseerd worden. Dit kan op termijn betekenen dat hier weer een interessant nieuw CDI-DLO produkt in zicht is.

Chicken anaemia virus

Ook de ontdekking dat het Chicken anaemia virus (CAV) geprogrammeerde celdood veroorzaakt is een opmerkelijke bevinding. Terwijl de ontdekking dat één van de CAV eiwitten in staat is dit proces te induceren als innovatief kan worden aangeduid.

Elders in dit jaarverslag wordt aan een aantal van de genoemde onderwerpen uitgebreid aandacht besteed.

Dierziektenbestrijding

De bestrijding en beheersing van een drietal uitbraken in Nederland van ziekten die genoemd worden in de veewet en de vogelziektenwet vergden veel inzet van instituutsmedewerkers. De goede samenwerking met andere diensten en instellingen binnen het zogenaamde veterinaire netwerk in Nederland was bij het oplossen van deze problemen onmisbaar.

In april brak er in Zuid-Holland varkenspest uit. Het betrof hier een ziekte, veroorzaakt door een virusstam die nog niet eerder in West-Europa was geïsoleerd. Er werd in de 2½ maand die de epidemie heeft geduurd een grote aanslag gedaan op de capaciteit van de betrokken afdelingen. Orgaanmonsters van meer dan 2500 dieren en ruim 32.000 sera werden in die periode onderzocht.

Nog voordat de varkenspest affaire afgesloten was werden we geconfronteerd met de zogenaamde blaasjesziekte in de buurt van Ede. In het kader van deze uitbraak werden 68.000 bloedmonsters onderzocht. Toen de blaasjesziekte nog volop problemen gaf, werd in Oost-Brabant in de omgeving van Weert pseudovogelpest geconstateerd. De twee eerste ziekten zijn inmiddels onder controle, terwijl de pseudovogelpestbestrijding nog volop in gang is.

Het jaar 1992 was in het opzicht van ziekte-uitbraken dus geen rustig jaar, verwacht kan worden dat met de open grenzen, die de Europese Gemeenschap

vanaf 1 januari 1993 tussen de lidstaten heeft ingesteld, hetere vuren ons te wachten staan. Het zal grote inspanningen vragen om de gezondheidsstatus van de Nederlandse veestapel op een hoog niveau te handhaven.

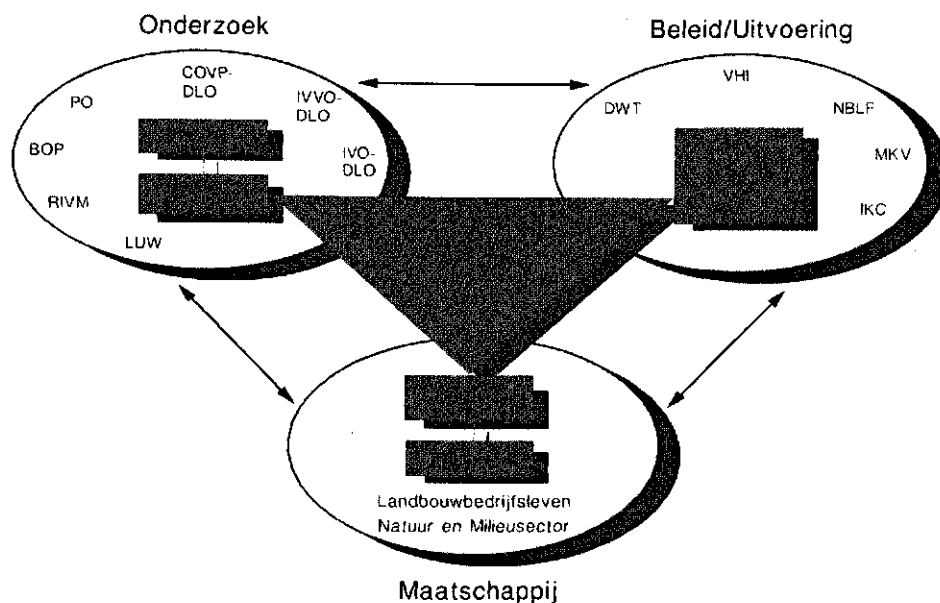
In dit verband kan verwezen worden naar de inzet en het werk van de visziekten-unit. Mw. ir. O.L.M. Haenen en haar medewerkers hebben in korte tijd een screening op het voorkomen van uitheemse vissenvirussen voorbereid. Ook in 1993 zal in dit verband nog veel van deze groep gevraagd worden.

Reorganisaties

In 1992 zijn binnen het CDI-DLO een aantal reorganisaties doorgevoerd. Zoals al gezegd de eigen portiersdienst is afgebouwd, daarnaast is de tekstverwerking gedecentraliseerd. Deze decentralisatie past in het streven om meer zaken en bevoegdheden naar de afdelingen te delegeren.

Ingrijpendere nog waren de organisatieaanpassingen als gevolg van de herziening en herverdeling van de taken van de afdeling Biochemie en Toxicologie (ABT). Na een (te) lang proces van studie en afweging is er duidelijkheid gekomen over ABT. De veterinaire toxicologie werd door de belangrijkste afnemers niet langer als een prioriteit gezien en het vogelziektenproject zal op een andere leest worden geschoeid. Dit heeft er toe geleid dat ABT heeft opgehouden te bestaan als zelfstandige afdeling en dat overblijvende onderzoeksactiviteiten zijn herverdeeld over de afdeling Bedrijfsdiergeneeskunde, Pathologie en Epidemiologie (ABPE) en LMI.

De herverdeling van ABT activiteiten naar ABPE, maar ook het streven meer nadruk te leggen op pathobiologie, heeft er toe geleid dat de afdeling ABPE zich grondig beraadt op het toekomstig takenpakket en op de mogelijkheden om verbindingen te leggen met onderzoeksgroepen buiten het Instituut. Vooral de ontwikkeling van onderzoek op het raakvlak van diergeneeskunde en zoötechniek zal veel creativiteit vragen.



Het veterinaire netwerk in Nederland.

*Verklaring van de gebruikte afkortingen: BOP: Buitenlandse Onderzoek Partners, COVP-DLO: DLO-Centrum voor Onderzoek en Voorlichting in de Pluimveehouderij, DWT: Directie Wetenschap en Technologie, Fac.D: Faculteit Diergeneeskunde Utrecht, IKC: Informatie en Kennis Centra, IVO-DLO: DLO-Instituut voor Vee-
teeltkundig Onderzoek, IVVO-DLO: DLO-Instituut voor Veevoedings Onderzoek, LUW: Landbouw-
universiteit Wageningen, MKV: Directie Milieu Kwaliteit en Voeding, PO: Praktijkonderzoek, RIVM: Rijks-
instituut voor Volksgezondheid en Milieuhygiëne, RVV: Rijksdienst voor de Keuring van Vee en Vlees, SGD: Stichting Gezondheidszorg voor Dieren, VD: Veterinaire Dienst, VHI: Veterinaire Hoofdinspectie van de
Volksgezondheid, VZ: Directie Veehouderij en Zuivel.*

Meerjarenplan 1992-1997

In 1992 is begonnen met het implemen-
teren van een aantal beleidsvoornemens
die in het Meerjarenplan zijn aange-
geven. Onder leiding van de Beleids-
adviesgroep Meerjarenplan zijn een
aantal activiteiten van start gegaan.
Als resultaten van deze activiteiten
kunnen worden genoemd:

Het opstarten van het Meerjaren
Programma Overleg met de Veterinaire
Dienst en met de Stichting
Gezondheidszorg voor Dieren en met de
directie Veehouderij en Zuivel van het
departement.

Het opstellen en verschijnen van een
rapport over Immunologische
mechanismen van ziekteresistentie.
Het verschijnen van een tussenrapport
over Epidemiologie.

Het verschijnen van een actieplan voor
de aanpak van de In- en Externe
Communicatie en de Personeelszaken in

het Instituut.

Het doorvoeren van een nieuw systeem
van rondzendoefeningen voor de
Gezondheidsdiensten voor Dieren met
gelijktijdig een uitbreiding van het aantal
rondzendoefeningen door zowel OAV als
Bacteriologie.

Naast genoemde zaken lopen er nog tal
van andere die in 1993 extra aandacht
behoeven. Met name de Sterlab
Certificering dient nader uitgewerkt en
gerealiseerd te worden.

Verzelfstandiging en fusie

De projectgroep Verzelfstandiging DLO
heeft in 1992 voortvarend gewerkt, maar
de behandeling van het uitgebrachte
rapport binnen het Ministerie verloopt
traag. Deze trage behandeling wordt
veroorzaakt door het feit dat er geen
uniformiteit in denken is over hoe 'ver'
de DLO-organisatie buiten het Ministerie
moet worden geplaatst.

De projectgroep en de stuurgroep

hebben gekozen voor externe verzelfstandiging met verlies van de ambtelijke status voor de medewerkers.

Het is te verwachten, dat de formele verzelfstandiging zonder meer doorgaat, maar dat de effectuering niet vóór 1996 zal plaatsvinden.

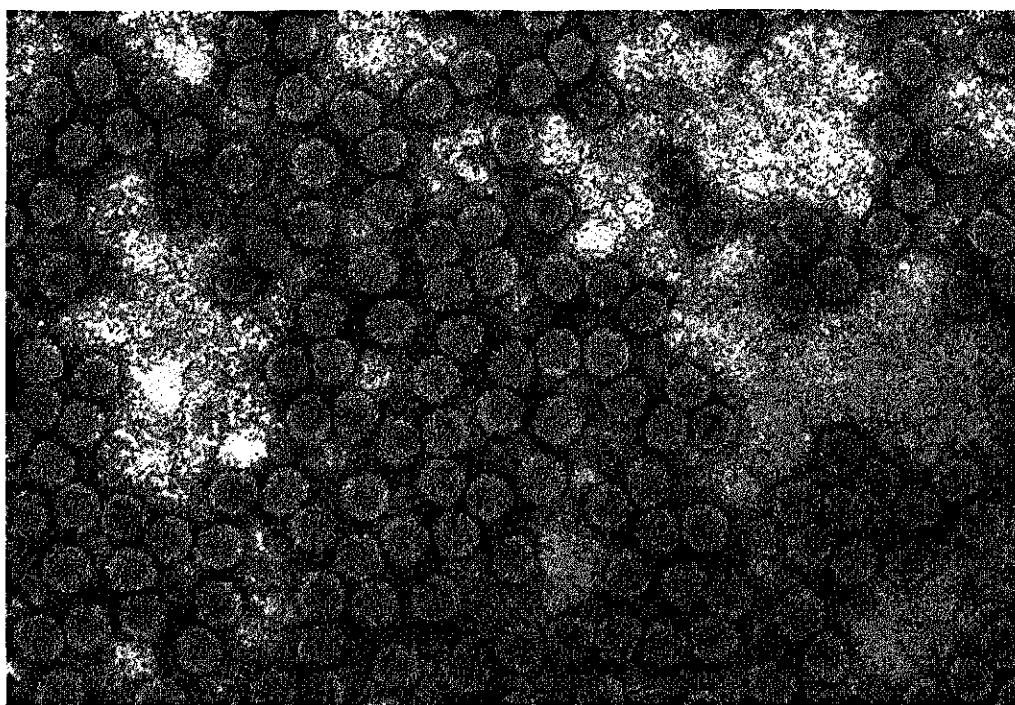
In februari 1992 werd een rapport uitgebracht over de wenselijkheid van fusie tussen de vier "Dierlijke" DLO Instituten. Deze fusie hield een samengaan in van het zootechnische en veterinaire onderzoek binnen de DLO organisatie. Het gaat dan om het Centrum voor Onderzoek en Voorlichting Pluimveehouderij (COVP-DLO) te Beekbergen, het Instituut voor Veeteeltkundig Onderzoek (IVO-DLO) te Zeist, het Instituut voor Veevoedingsonderzoek (IVVO-DLO) te Lelystad en het Centraal Diergeneeskundig Instituut (CDI-DLO) te Lelystad. In maart werd dit rapport door de Departementsleiding overgenomen met een voorbehoud ten aanzien van de financiële paragraaf. In juli is vervolgens f 42 miljoen

beschikbaar gesteld voor de bouwkundige voorzieningen voor het fusie-instituut, waarmee dit financiële voorbehoud verviel. De Secretaris-Generaal heeft vervolgens de directeur DLO opdracht gegeven om een concept beleidsvoornemen te formuleren en er op aangedrongen hierbij het personeel van de vier instituten zoveel mogelijk te betrekken.

Sinds september is door vertegenwoordigers van de vier instituten hard gewerkt aan een tekst voor dit concept beleidsvoornemen, waarbij er naar gestreefd is zo veel als mogelijk is overeenstemming te bereiken. Begin 1993 zal er een Beleidsvoornemen gereed zijn, in de loop van het jaar zal het besluit vallen of dit voornemen daadwerkelijk in een Beleidsbesluit wordt omgezet en de fusie daadwerkelijk gerealiseerd kan worden.

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

Mond- en klauwzeer virus blijft een belangrijk aandachtspunt voor het instituut. Op de foto: electronenmicroscopische opname van MKZ-virus 300.000 x vergroot.



Vaccins zijn onmisbaar op weg naar een duurzame veehouderij

J.T. van Oirschot^{1)*}

Er is een beweging gaande in de richting van een duurzame veehouderij, waarbinnen men het gebruik van geneesmiddelen en van vaccins tot een noodzakelijk minimum wil beperken. De Europese Gemeenschap (EG) volgt een non-vaccinatie beleid, met name ten aanzien van bepaalde epidemische ziekten. Een vraag hierbij is of men een dergelijke non-vaccinatie politiek ook moet nastreven voor infectieziekten die wijd verbreid zijn.

De EG en mond- en klauwzeer

Vanaf 1 januari 1993, is er vrij verkeer van dieren en dierprodukten binnen de EG, tenzij er in bepaalde landen specifieke ziekten heersen. De EG streeft daarom naar harmonisatie van de dierziektensituatie op een hoog niveau. Deze status is bereikt als een zeker micro-organisme niet meer in de EG lidstaten voorkomt en vaccinatie ertegen is verboden, zoals het geval is met mond- en klauwzeer. De meeste EG landen zouden, indien men dit wenst, echter nog een fikse inspanning moeten leveren om eenzelfde status te bereiken voor diverse andere infectieziekten. Bij dit streven kunnen vaccins een belangrijke rol spelen. Zij kunnen systematisch worden ingezet om de prevalentie van een ziekte te verminderen. Als dit parallel loopt met toepassing van een optimale diagnostiek bij uitbraken is dat de eerste stap naar uitroeiing. In het geval van mond- en klauwzeer is een dergelijke weg met succes afgelegd.

Het gevaar dat mond- en klauwzeer opnieuw uitbreekt binnen de EG is echter niet ondenkbaar. Ook is het niet onmogelijk dat daarbij naar het wapen van de noodenting gegrepen moet worden. In dit verband bestaat er een duidelijke behoefte aan een marker vaccin (= een vaccin waarvan de anti-lichaamsrespons te onderscheiden is van

die na een infectie). De beslissing om over te gaan tot een noodenting heeft dan mogelijk minder negatieve gevolgen voor de export. Dit geldt eveneens voor varkenspest. Er is derhalve bij infectieziekten die (vrijwel) geheel zijn uitgeroeid toch nog vraag naar onderzoek ter verbetering van vaccins.

De ziekte van Aujeszky en marker vaccins

Voor veel infectieziekten verschilt de prevalentie per land aanzienlijk. Zo is de ziekte van Aujeszky uitgeroeid in Engeland en Denemarken, terwijl in andere landen het virus nog op vele bedrijven aanwezig is. Engeland en Denemarken konden een uitroeicampagne starten, omdat de prevalentie laag was en vaccinatie altijd verboden is geweest. Andere landen konden dit voorbeeld niet volgen, vanwege de hoge prevalentie en de toepassing van vaccinatie tegen de ziekte van Aujeszky. Vaccinologisch onderzoek heeft geleid tot de ontwikkeling van marker vaccins en diagnostische tests, waardoor perspectieven zijn geschapen voor uitroeiing van de ziekte van Aujeszky, zelfs in zwaar besmette landen. Een intensieve en consequent uitgevoerde vaccinatiecampagne moet de virus-circulatie sterk terugdringen, waarna men de resterende geïnfecteerde dieren met de diagnostische test kan opsporen en verwijderen. Per bedrijf kan men een

1) CDI-DLO Open Afdeling Virologie

* Bijzonder hoogleraar Vaccinologie,
Ernest Solvay leerstoel Universiteit Utrecht

De eerste vaccinatie in de geschiedenis. Dr. E. Jenner (1749-1823) ent een jongen in met *Vaccinia virus* (koepokentstof) om hem tegen pokken te beschermen (1796). Dankzij deze vaccinatie werd het mogelijk om deze ziekte, wereldwijd, uit te roeien



eigen aanpak volgen. Zo kan een tijdelijke, intensieve toepassing van vaccins uiteindelijk leiden tot een uitroeiing van een agens, waarna men een non-vaccinatiebeleid kan afkondigen. Eenzelfde benadering is wellicht mogelijk bij infectieuze bovine rhinotracheïtis en andere infecties, bijvoorbeeld bij *Brucella melitensis*.

De ontwikkeling van marker vaccins moet primair gericht zijn op het voorkomen en onderdrukken van de vermeerdering van micro-organismen bij het gevaccineerde dier, waardoor een optimale populatie-immuniteit kan worden opgewekt. Bij ziekten die in potentie uitroeibaar zijn zou overwogen kunnen worden, op termijn alleen nog maar marker vaccins op de markt toe te laten.

"Economisch" vaccineren

Naast potentieel uitroeibare infecties zijn er ziekten, waarmee we moeten leren leven, bijvoorbeeld parvovirusinfecties bij het varken, pinkengriep bij het rund en

de ziekte van Gumboro bij de kip. Het is dan een vereiste om de economische schade ervan zo laag mogelijk te houden. Hierbij zijn vaccins onmisbaar. De pluimveehouderij zou waarschijnlijk niet renderen zonder de toepassing van vaccins. Het starten van een non-vaccinatiebeleid tegen dergelijke vooralsnog onuitroeibare ziekten die tot flinke financiële verliezen leiden is dan ook niet realistisch.

Bacteriële en parasitaire vaccins

Bacteriële ziekten vormen nog steeds een flinke schadepost voor de veehouderij. De massale preventieve en therapeutische toepassing van antibiotica heeft mede geleid tot de bestaande resistentie en residu problematiek. Het gevolg hiervan is dat de aandacht voor ontwikkeling van bacteriële vaccins enorm is toegenomen. Het lijkt te verkiezen om bacteriële ziekten te bestrijden met vaccins in plaats van met antimicrobiële pharmaca. Het verschuiven van de aandacht van een curatieve naar een meer preventieve aanpak lijkt mogelijk ook van toepassing op parasitaire aan-

doeningen. Hoewel er een vaccin tegen longwormen bij kalveren op de markt is, staat de ontwikkeling van parasitaire vaccins nog in de kinderschoenen.

Toekomst

Toepassing van biotechnologische methoden in het vaccinologisch onderzoek heeft ons inzicht in pathogenese en immunologie van infectieziekten en de structuur en eigenschappen van de ziekteverwekkers geweldig vergroot. Het is derhalve te verwachten dat deze toename in kennis zal uitmonden in nieuwe, werkzaamere en veiligere vaccins. Zo is recent aangetoond dat avipokkenvirussen, die zich niet vermenigvuldigen in zoogdieren, toch als vector kunnen dienen voor het opwekken van immuniteit tegen pathogenen van zoogdieren. Tevens zijn onlangs door onderzoekers van de afdeling Moleculaire biologie herpesvirus deletiemutanten ontwikkeld die wel immuniteit induceren, maar geen infectieuze viruspartikels kunnen produceren. Bij dergelijke kandidaat vaccins zijn de voordelen van werkzaamheid van levende vaccins gecombineerd met de voordelen van veiligheid van geïnactiveerde vaccins.

Conclusie

Het is een juist uitgangspunt om te streven naar een beperking van het gebruik van vaccins in het kader van een duurzame veehouderij. Om echter een non-vaccinatie beleid te kunnen voeren moet eerst de prevalentie van ziekten laag zijn. Vaccins, bij voorkeur marker vaccins, die op een systematische wijze in een optimaal schema worden toegepast kunnen daartoe in hoge mate bijdragen. Op zo'n manier kan een tijdelijke toepassing van vaccins op termijn leiden tot stopzetten van vaccinatie. Het volgen van een non-vaccinatiebeleid tegen vooralsnog onuitroeibare, economisch belangrijke, infectieziekten lijkt weinig realistisch. Vanwege de resistentie en residu problematiek rond antibiotica zien we een heropleving van het onderzoek

naar bacteriële vaccins. Modern vaccinologisch onderzoek zal nieuwe, werkzame en veilige vaccins opleveren.

Kortom, vaccins zijn vooralsnog onmisbaar voor een duurzame en rendabele veehouderij. Per slot van rekening: voorkomen is beter dan genezen.



*Observatiekoepel in een
varkensproefdierverblijf in het
high-containment complex
Houtribweg.*

Een nieuwe generatie veilige, niet-spreidende vaccins en vectoren gebaseerd op het virus van de ziekte van Aujeszky

B.H.P. Peeters¹⁾, A.L.J. Gielkens¹⁾, T.G. Kimman²⁾, J.M.A. Pol³⁾,
R.J.M. Moormann¹⁾

Overige projectmedewerkers: A. Bouma³⁾, T. de Bruin²⁾, M. Elgersma¹⁾, F. Wagenaar³⁾

Aujeszky's disease virus (ADV), ook wel pseudorabies virus (PRV) genoemd, veroorzaakt de ziekte van Aujeszky bij varkens. De ziekte is fataal voor jonge biggen en veroorzaakt klinische symptomen, abortus en groeivertraging bij oudere dieren. Uit het oogpunt van dierlijk welzijn en vanwege de grote economische schade, wordt tegen deze endemische ziekte gevaccineerd. In het recente verleden zijn onderzoekers van het CDI-DLO en het Nederlands Kanker Instituut erin geslaagd een veilig en effectief marker vaccin te maken door middel van gerichte genetische modificatie van het virus. Dit levende vaccin wordt gebruikt voor een gerichte bestrijding en eradicatie van de ziekte van Aujeszky.

Levende vaccins

De huidige generatie genetisch gemodificeerde levende vaccins is over het algemeen zeer veilig, desalniettemin zijn er situaties denkbaar waarbij het gebruik van dergelijke vaccins problemen kan veroorzaken. Levende vaccins kunnen door een gevaccineerd dier worden uitgescheiden en kunnen zo in het milieu terecht komen. Bovendien kunnen levende herpesvirus vaccins latent worden en daardoor in de populatie aanwezig blijven. Indien een dier gelijktijdig wordt geïnfecteerd door vaccinstammen die veranderingen bevatten in niet-identieke virulentie genen, zouden via recombinatie tussen deze vaccins nakomelingen kunnen ontstaan die virulent zijn. Levende vaccins kunnen worden gebruikt als drager (carrier of vector) voor de expressie van een immunodominant antigeen van een ander pathogeen agens. Met behulp van carrier

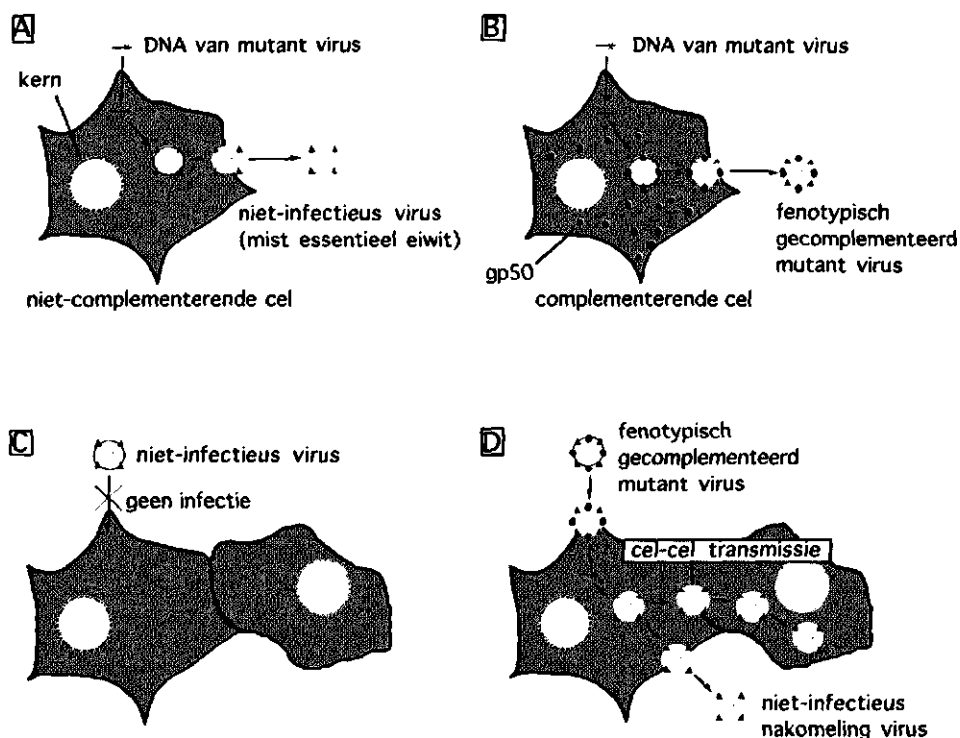
vaccins is het mogelijk door middel van één vaccinatie bescherming te induceren tegen twee of meer ziekten. Voordat dergelijke vaccins kunnen worden toegepast, moeten ze uitvoerig worden getest omdat de eigenschappen van zo'n recombinant virus anders zouden kunnen zijn dan die van het drager virus. Verder is er de mogelijkheid (die overigens nog niet experimenteel bevestigd is), dat het geïnserteerde vreemde gen door middel van recombinatie wordt overgedragen van het verzwakte drager-virus naar een virulent veldvirus. De potentiële nadelen van levende vaccins zouden opgeheven kunnen worden indien het vaccin niet meer in staat is tot verspreiding van dier tot dier en wanneer geïnserteerde vreemde genen niet meer kunnen worden overgedragen naar een veldvirus. Onlangs zijn er bij het CDI-DLO met behulp van recombinant DNA technieken ADV mutanten geconstrueerd die aan bovengenoemde eigenschappen voldoen.

1) CDI-DLO, Afdeling Moleculaire Biologie

2) CDI-DLO, Afdeling Zoogdier Virologie

3) CDI-DLO, Afdeling Bedrijfsdiergeneeskunde, Pathologie en Epidemiologie

Figuur 1. De introductie van een mutatie in een essentieel gen van het virus levert géén levensvatbare nakomelingen op (A). Indien de cel in staat is het ontbrekende essentiële eiwit te produceren kan de mutatie van het virus worden gecompenseerd en kunnen er fenotypisch gecompenseerde nakomelingen ontstaan (B). Een virus dat een eiwit mist dat essentieel is voor het binnendringen van het virus in de cel is niet levensvatbaar (C). Fenotypisch gecompenseerde mutanten kunnen een cel infecteren, ze kunnen vervolgens echter niet het eiwit produceren dat wordt gecodeerd door het ontbrekende gen. gp50 mutanten kunnen zich desondanks verspreiden via cel-cel transmissie, maar de nakomelingen virussen zijn niet-infectieus (D). In tegenstelling tot gp50 mutanten zijn gII of gH mutanten niet meer in staat tot cel-cel transmissie (zie ook Figuur 2).



Essentiële mantel eiwitten

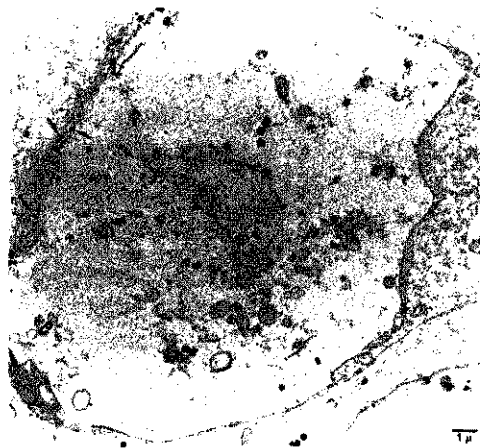
ADV bevat minstens zeven geglycosylerde eiwitten (glycoproteïnen) die verankerd zijn in de lipide dubbelmembraan (mantel of envelop) die de buitenkant van het virusdeeltje vormt. Deze glycoproteïnen spelen een belangrijke rol bij het binnendringen van het virus in de cel (infectie). De functie van een drietal van deze glycoproteïnen wordt bij het CDI-DLO nader bestudeerd. Uit analyses is gebleken dat het uitschakelen van de genen die coderen voor de glycoproteïnen gII, gH en gp50, géén levensvatbaar virus oplevert; dat wil zeggen de betreffende eiwitten zijn essentieel voor overleving van het virus (zie Figuur 1A).

Om toch een virus in handen te krijgen met een uitgeschakeld essentieel gen, kan men gebruik maken van cellen die in staat zijn het ontbrekende glycoproteïne te produceren. Door de genen die coderen voor de essentiële glycoproteïnen

gII, gH en gp50 te isoleren en in geschikte gastheercellen tot expressie te brengen werden zogenaamde complementerende cellen verkregen. Deze cellen werden vervolgens gebruikt voor het maken van virussen die zelf geen gII, gH of gp50 kunnen produceren (zie Figuur 1B). Indien dergelijke mutanten (bijvoorbeeld met het uitgeschakelde gp50 gen) worden gekweekt op de overeenkomstige (in dit geval gp50) complementerende cellen, spreken we van fenotypisch gecompenseerde mutant virussen. Dit betekent dat de virussen voor wat betreft hun eiwit-samenstelling identiek zijn aan het wild-type virus, echter hun genetische informatie (genoom) is nog steeds veranderd (bijvoorbeeld gp50 negatief). Indien men de fenotypisch gecompenseerde mutanten gebruikt voor infectie van normale (niet-complementerende) cellen kan men vervolgens het effect van de geïntroduceerde mutatie op de levenscyclus van het virus bestuderen.

gp50 is nodig voor penetratie maar niet voor cel-cel transmissie

Indien niet-complementerende cellen worden geïnfecteerd met fenotypisch gecomplementeerde gII, gH of gp50 mutanten, blijkt dat alleen de gp50 mutant in staat is om plaques te vormen. Indien de virussen die tijdens deze infectie met de gp50 mutant worden gemaakt opnieuw worden gebruikt voor infectie van cellen die gevoelig zijn voor ADV, blijkt dat deze virussen nog wel kunnen hechten aan deze cellen, maar niet meer in staat zijn om deze cellen binnen te dringen (penetreren). Omdat de virusdeeltjes die geproduceerd zijn door niet-complementerende cellen géén gp50 bevatten, is gp50 kennelijk essentieel voor penetratie van het virus in de cel. Aangezien een gp50 mutant virus, nadat het eenmaal in de cel is binnengekomen, nog wel plaques vormt, concluderen we dat gp50 wel nodig is voor penetratie, maar niet voor cel-cel transmissie van het virus (zie Figuur 1C + D).



Figuur 2.
Electronenmicroscopische opname van een niet-complementerende cel die geïnfecteerd is door een gH mutant van ADV. De mutant is nog wel in staat tot de vorming van nakomeling virussen (zie pijlen), echter deze zijn niet infectieus en er vindt geen verspreiding van het virus plaats door middel van cel-cel transmissie.

Uit electronenmicroscopische analyses is gebleken dat de gII en gH mutanten, ondanks het feit dat ze geen plaques vormen, nog wel in staat zijn tot DNA replicatie en de vorming van nakomeling virusdeeltjes. Deze nakomeling virussen zijn echter niet meer in staat tot penetratie van buurcellen en bovendien vindt er geen transmissie van virus plaats door middel van direct cel-cel contact (zie Figuur 2). Dit betekent dat gII en gH

essentieel zijn voor zowel penetratie als cel-cel transmissie.

Om na te gaan of cel-cel verspreiding van gp50 mutanten niet alleen *in vitro* (in weefselkweek cellen) maar ook *in vivo* (in levende dieren) plaatsvindt, werden muizen geïnfecteerd met fenotypisch gecomplementeerde gp50 mutanten. Uit deze experimenten bleek dat gp50 mutanten vrijwel even virulent waren als het wildtype virus. Indien we een virus gebruikten dat gestoord was in de expressie van zowel gp50 als gp63 (gp50+gp63 dubbelmutant), bleek de overlevingstijd veel langer te zijn. Het virus kon met behulp van immunohistologie (aantonen van viraal antigeen met behulp van antisera gericht tegen het virus) worden aangetoond in de hersenen en organen van geïnfecteerde dieren. Na blootstelling van cellen die gevoelig zijn voor het virus, aan hersenen en orgaanextracten van de geïnfecteerde muizen kon echter géén infectieus virus worden aangetoond.

Uit deze gegevens kan worden geconcludeerd dat gp50 mutanten ook *in vivo* in staat zijn tot cel-cel transmissie en dat nakomeling virussen niet-infectieus zijn. De bevinding dat gp50 mutanten vrijwel even virulent zijn als het wildtype virus wijst erop dat directe cel-cel transmissie een belangrijk verspreidingsmechanisme is voor het virus. Mogelijk is dit een strategie om te ontsnappen aan neutraliserende antilichamen van de gastheer.

Een nieuwe generatie niet-spreidende vaccins

Uit het bovenstaande blijkt dat de eigenschappen van de gp50 mutanten voldoen aan de eisen die in de inleiding gesteld zijn aan een niet-sprekend vaccin. Aangezien de nakomelingen van een gp50 mutant niet-infectieus zijn, kan er geen infectie plaats vinden van contact dieren.

Een vaccin moet niet alleen veilig maar ook effectief zijn. Het is daarom belangrijk om na te gaan of de gp50 mutanten

voldoende afgezwakt en immunogeen zijn. Dit houdt in dat biggen die gevaccineerd zijn met een gp50 mutant voldoende beschermd worden tegen een veldvirus infectie. Om dit te testen werden biggen intranasaal geïnoculeerd met 10^5 infectieuze virus deeltjes van de gp50 mutant en de gp50+gp63 mutant.

De resultaten (Tabel 1) tonen aan dat de gp50 mutant sterk verminderd virulent is ten opzichte van het wildtype virus. De biggen vertoonden geen neurologische symptomen en ze vertoonden een beperkt aantal dagen koorts en groeivertraging. De dubbelmutant bleek zelfs helemaal niet virulent te zijn voor biggen. De geïnoculeerde dieren produceerden antilichamen tegen ADV, echter de hoeveelheid neutraliserende antilichamen was minder in dieren die

waren geïnoculeerd met de gp50 of gp50+gp63 mutant dan in dieren die waren geïnoculeerd met een gp63 mutant (gp63 is een niet-essentieel glycoproteïne) of met wildtype virus. Zoals verwacht kon in de neus- en keelholte van dieren die waren geïnfecteerd met de gp50 mutant of de gp50+gp63 mutant géén infectieus virus worden aangetoond.

Na intranasale inoculatie van de gevaccineerde dieren met 10^5 infectieuze deeltjes van de virulente ADV stam NIA-3, bleken de biggen die gevaccineerd waren met de gp50 mutant compleet beschermd te zijn tegen klinische verschijnselen van de ziekte van Aujeszky en vertoonden ze geen koorts of groeivertraging (Tabel 2). Biggen gevaccineerd met de gp50+gp63

Tabel 1. Virulentie en immunogeniciteit in varkens

Geïnoculeerd virus	Koorts ¹⁾	Groeivertraging ¹⁾	Ziek ²⁾	VN titer ³⁾
wildtype	5.3 ± 0.6	8.3 ± 7.3	+	3.1 ± 0.1
gp63 mutant	2.4 ± 1.5	2.4 ± 2.2	-	2.5 ± 0.5
gp50 mutant	3.8 ± 1.6	0.8 ± 1.8	-	1.4 ± 0.3
gp50+gp63 mutant	0	0	-	0.7 ± 0.3

1) gemiddeld aantal dagen (± S.D.)

2) stuiprekkingen, coördinatie stoornissen, verlamingsverschijnselen

3) gemiddelde virus neutralisatie titer ($10^{\log \pm S.D.}$) op dag 27 na inoculatie

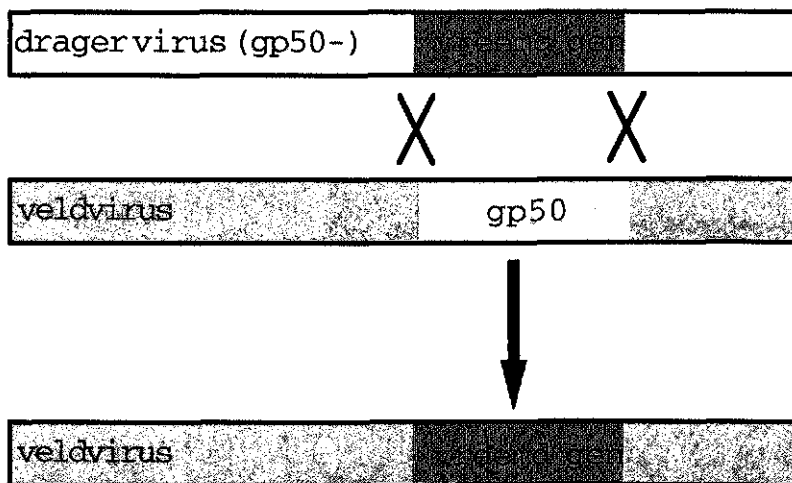
Tabel 2. Bescherming van gevaccineerde biggen tegen een wildtype ADV infectie

Vaccinatie	Sterfte	Koorts ¹⁾	Groeivertraging ¹⁾	Ziek
geen	2	6.8 ± 0.5	10.3 ± 7.1	+ ²⁾
gp63 mutant	0	0	0	-
gp50 mutant	0	0	0	-
gp50+gp63 mutant	0	3.6 ± 1.1	1.4 ± 3.1	- ³⁾

1) gemiddeld aantal dagen (± S.D.)

2) stuiprekkingen, coördinatie stoornissen, verlamingsverschijnselen

3) sommige biggen waren loom en twee biggen braakten



het veldvirus, altijd een niet-infectieus virus ontstaat. Op deze wijze kan het vreemde gen niet worden verspreid naar een ander dier (zie Figuur 3).

Figuur 3. Homologe recombinatie van het dragervirus met een veldvirus levert een veldvirus op dat weliswaar het heterologe gen bevat maar dat tevens gp50 negatief, en dus niet-infectieus is.

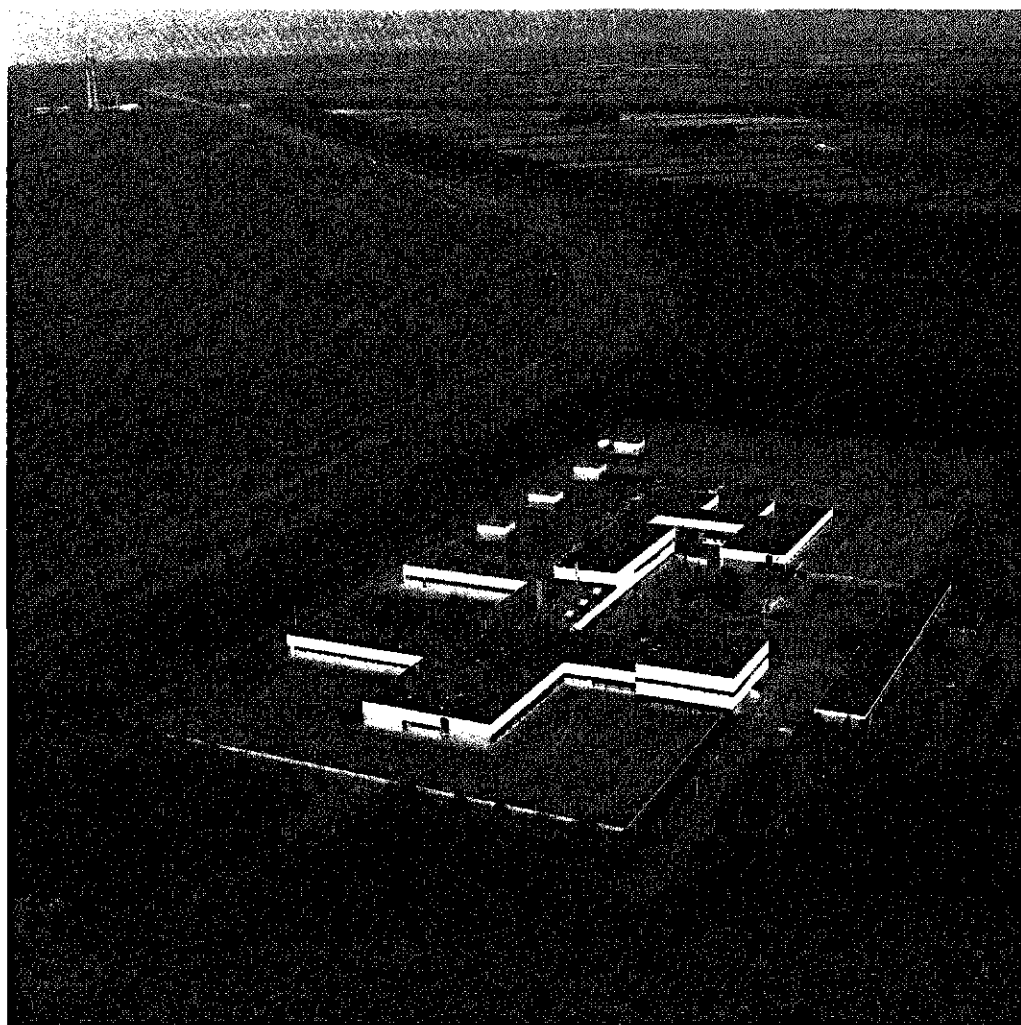
dubbelmutanten gaven wel nog enige dagen koorts en groeivertraging, maar vertoonden geen neurologische symptomen. Ten opzichte van niet-gevaccineerde biggen was replicatie van het virulente virus sterk verminderd in biggen die gevaccineerd waren met de gp50 mutant en de gp63 mutant. Virus replicatie was minder sterk verminderd in dieren die gevaccineerd waren met de gp50+gp63 dubbelmutant.

Conclusies

De hier beschreven experimenten tonen aan dat ADV gp50 mutanten geschikt zijn voor de ontwikkeling van een veilig niet-spreidend (carrier) vaccin. De virulentie van de mutanten moet voldoende worden verzwakt terwijl de immunogeniciteit optimaal moet zijn. Methoden om dit te bereiken kunnen onder andere zijn: de introductie van extra mutaties, het gebruik van geschikte adjuvantia, aanpassing van de dosering, en het bepalen van de meest geschikte applicatie route.

Het feit dat gp50 mutanten zich niet kunnen verspreiden van dier tot dier biedt eveneens interessante toepassingsmogelijkheden voor deze mutanten als levende virale vector. Het vreemde gen wordt daarbij geïnserteerd op de plaats van het oorspronkelijke gp50 gen. Een belangrijk voordeel van dit ontwerp is dat bij overdracht van het vreemde gen door homologe recombinatie met

De hoog beveiligde Vestiging Virologie van het CDI-DLO aan de Houtribweg Lelystad is het enige laboratorium in Nederland waar op een veilige wijze met zeer besmettelijke virussen gewerkt kan worden.



Varkenspest en vesiculaire varkensziekte: oude bekenden terug in Nederland

C. Terpstra¹⁾, A. Dekker¹⁾, G. Wensvoort¹⁾

Eind april 1992 werd de Nederlandse varkenshouderij opgeschrikt door een geval van varkenspest te Pijnacker (Zuid-Holland), kort daarop gevolgd door twee uitbraken rond Nieuwerbrug. Nog voordat de maatregelen tegen deze ziekte konden worden opgeheven, werd in de buurt van Ede vesiculaire varkensziekte (swine vesicular disease-SVD) gediagnostiseerd, een uitbraak die medewerkers van diverse instanties, waaronder het CDI-DLO, tot eind november achtervolgde.

Varkenspest

Rondom de infectiehaarden werden beschermingsgebieden ingesteld van ongeveer 100 km² (Pijnacker) en 70 km² (Nieuwerbrug), en een toezichtsgebied ($\pm$ 2500 km²), dat globaal werd begrensd door de Nieuwe Waterweg, Lek, A2, N201, A4, Kromme Rijn en Noordzee (zie kaartje). In het beschermingsgebied rond Pijnacker lagen 76 bedrijven met circa 22.000 varkens, in het gebied rond Nieuwerbrug 128 bedrijven met circa 26.000 varkens en in het toezichtsgebied 1460 bedrijven met ongeveer 340.000 dieren. In de beschermingsgebieden was een algeheel vervoersverbod voor vee van kracht, terwijl in het toezichtsgebied het vervoer van varkens was verboden.

Diagnostisch onderzoek

Overeenkomstig de EG-regelgeving werden de varkensbedrijven in een straal van 10 km rond de infectiehaarden en daarbuiten alle bedrijven met directe of indirecte contacten klinisch geïnspecteerd. Omdat het ziektebeeld vaag en atypisch was werd van alle gestorven varkens in de twee beschermingsgebieden volledig sectiemateriaal (tonsil, milt, nier en ileum) en van kadavers in het toezichtsgebied steekproefsgewijs de tonsillen onderzocht met de immunofluorescentie test (IFT). Tevens werd voor het opsporen van besmette bedrijven in de ingesloten gebieden

bloed getapt voor serologisch onderzoek. Daarbij werden tussen 20 mei en 12 juni in de beschermingsgebieden alle bedrijven bemonsterd en in de 10 km zônes van het toezichtsgebied 30% van de fokbedrijven en 10% van de mestbedrijven.

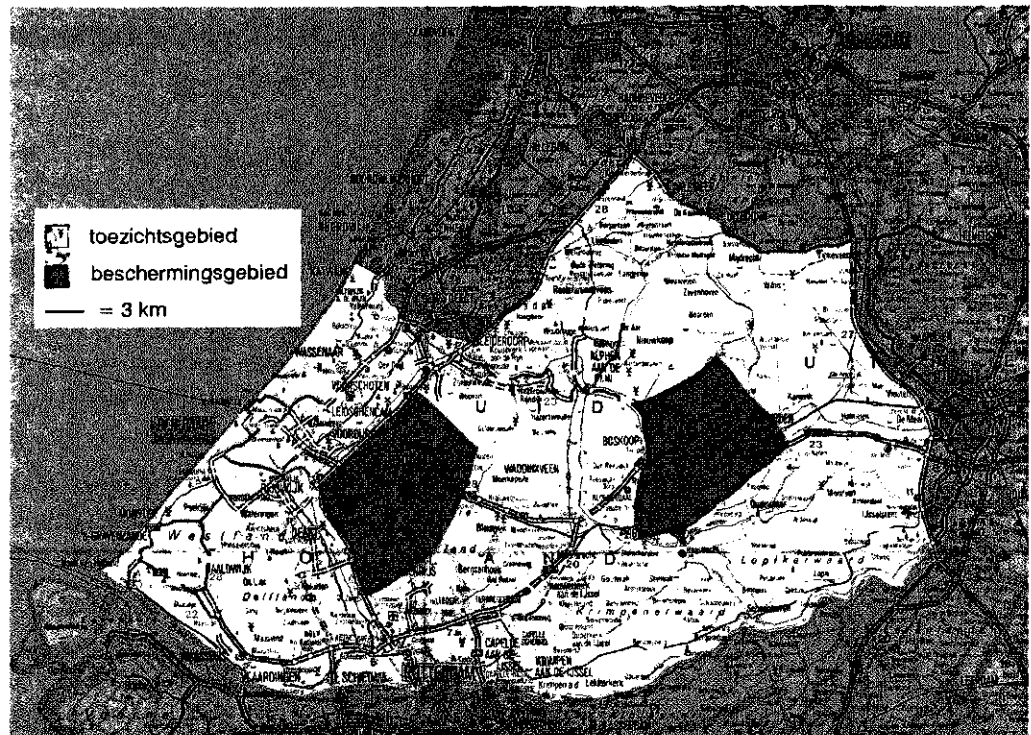
Voor het serologisch onderzoek werd de complex-trapping-blocking (CTB)-ELISA ingezet als screening test. Als bevestigingstest voor CTB-ELISA positieve monsters werd de "neutralizing peroxidase linked assay" (NPLA) gebruikt. Doordat alle veldactiviteiten nagenoeg gelijktijdig werden uitgevoerd kon de toevloed van monsters op DSU, en het onderzoek op het varkenspestlaboratorium alleen met grote inzet van alle betrokkenen worden verwerkt. In de 2 1/2 maanden dat de epizootie heeft geduurd werden orgaanmonsters van 2600 varkens en ruim 32000 sera onderzocht.

Besmette bedrijven

Het eerste geval in Pijnacker betrof een bedrijf met 19 mestzeugen en 28 mestvarkens dat in eerste instantie werd verdacht van de ziekte van Aujeszky. Als gevolg van een onjuiste bemonstering - bloedafname van de meest zieke dieren - was slechts 1 van de 6 sera positief in de CTB-ELISA (Tabel 1). Zeven zieke varkens die daarna voor onderzoek werden overgenomen, bleken alle positief in de IFT. Bovendien reageerde de helft van de nog aanwezige dieren positief in de CTB-ELISA, hetgeen erop

¹⁾ CDI-DLO Afdeling Zoogdier Virologie

Varkenspestbestrijding
1992



wees dat het varkenspestvirus vanaf begin april op het bedrijf moet zijn geweest. Een nabijgelegen fokbedrijfje van een familielid bleek eveneens besmet.

Een tweede en derde geval werden op respectievelijk 4 en 5 mei gediagnosticeerd op twee buurbedrijven te Nieuwerbrug. Van de twee lijkt bedrijf 92-3 het eerst te zijn besmet omdat hier, in tegenstelling tot bedrijf 92-2, seropositieve dieren werden gevonden. Enige voorzichtigheid is hierbij op zijn plaats omdat de conclusie gebaseerd is op een beperkt aantal monsters van dieren die voor diagnostisch onderzoek werden geselecteerd. Helaas werden de varkens geruimd voordat een volledige monsternamen ten behoeve van epidemiologisch onderzoek had plaatsgevonden.

De resultaten van het buurt- en regio-onderzoek waren de eerste 5 weken teleurstellend. Noch de klinische inspecties, noch het IFT-onderzoek op sectiemateriaal leverden de ontbrekende schakel(s) op in de verspreidingsketen van het virus. Aanvankelijk kon hetzelfde worden opgemerkt voor het serologisch

gebiedsonderzoek totdat op 9 juni op een bedrijf twee positieve sera werden gevonden. Bij nader onderzoek bleken bijna alle zeugen serologisch positief (Tabel 1). Het betrof een mestbedrijf van zogenaamde 'natte' zeugen, gelegen op korte afstand van de nrs. 92-2 en 92-3.

De opsporing van bedrijf 92-4 (zie epizootiologie) heeft geresulteerd in een gewijzigde strategie van bloedtappen: in het beschermingsgebied werden van elk bedrijf de eerste 20 dieren allemaal bemonsterd en 25% van de overige varkens >10 weken. In de rest van de 10 km zone rond Nieuwerbrug werd 20% van de zeugen en 10% van de oudere mestvarkens bloedgeapt, waarbij minstens één dier per hok werd genomen. De varkens waarvan bloed werd genomen werden tevens getemperatuur en geblikt.

Met deze aanpak werden nog vier positieve bedrijven opgespoord. Nrs. 5 en 6 waren wederom buurbedrijven van nrs. 2, 3 en 4. Op beide bedrijven kon virus worden geïsoleerd, ondanks een negatieve serologie in de eerste ronde (Tabel 1). In dit verband moet worden opgemerkt dat de immunrespons tegen varkenspestvirus 2-3 weken na infectie

op gang komt. Bovendien zijn gerekend vanaf het eerst besmette varken 1-2 cycli van virusvermeerdering en verspreiding nodig om door middel van een systematisch uitgevoerde bemonstering alle besmette bedrijven op te sporen. Na het instellen van een vervoersverbod moet daarom tenminste 5 weken worden gewacht met het uitvoeren van gebiedsserologie. De bevindingen van de bedrijven 5 en 6 hebben aangetoond dat de start van het bloedonderzoek op 20 mei te vroeg is geweest. De positieve bedrijven 7 en 8 waren eveneens burens met een gemeenschappelijke verzorger.

Eigenschappen van de virusstam

Op de besmette bedrijven werden geen of niet specifieke symptomen waargenomen: enkele trage dieren, koorts en geringe sterfte. Dit verklaart dat de bedrijven 5 en 6 ondanks geregelde klinische inspecties niet zijn opgemerkt. Het sectiebeeld was eveneens atypisch. Er zijn twee proefinfecties uitgevoerd met SPF varkens. Bij de eerste proef werden vier varkens intranasaal besmet met orgaansuspensies van 92-1. Hoewel de varkens vanaf 3 dagen na besmetting een leucopenie hadden en vanaf 7 dagen een viraemie werden de eerste symptomen pas na 11 dagen zichtbaar, gelijk met het begin van de thrombocytopenie. Vervolgens ontwikkelde zich een typisch subacuut ziektebeeld.

Het tweede experiment betrof een contactinfectie van 1 donor en 11 recipiënten. Alle contacten werden besmet en verschillende vormen van varkenspest werden waargenomen: acuut, subacuut, chronisch en subklinisch. Twee varkens ontwikkelden vanaf 4 weken na het contact een blijvende en drie anderen een voorbijgaande immuunrespons. Deze drie waren bij sectie op 6 en 8 weken nog viraemisch en scheidden het virus uit. De virulentie van de stam kan derhalve als zwak tot matig worden gekarakteriseerd. Typering van de isolaten met monoclonale antilichamen heeft uitgewezen dat de virusstam afwijkt van stammen die tussen 1970 en 1990 in West-Europa zijn geïsoleerd. De stam verschilt eveneens met 1992-isolaten van bedrijfsvarkens en wilde zwijnen uit Duitsland en een 1992-isolaat uit Polen.

Epizootiologie

Analyse van de 1982-'85 epizootie heeft geleerd dat de virusoverdracht via de mens in 93% van de 223 uitbraken op fok- en fokmestbedrijven en 51% van de 218 uitbraken op mestbedrijven de meest waarschijnlijke oorzaak van de besmetting is geweest (Terpstra, Vet. Quart. 1987, 9, 50-60S).

Tabel 1. Varkenspest-positieve bedrijven in 1992

Bedrijf nr.	Plaats	Bedrijf type	Aantal varkens	Datum onderz.	Positief / totaal IFT	serologie
92-1A	Pijnacker	M*	47	27.04 29.04	7/7	1/6 21/43
92-1B	Pijnacker	F*	9	30.04		1/9
92-2	Nieuwerbrug	M	326	04.05	4/4	0/16
92-3	Nieuwerbrug	F/M	348	05.05	4/5	7/33
92-4	Nieuwerbrug	M	17	09.06 11.06 12.06	0/17	2/3 15/16 0/1
92-5	Nieuwerbrug	M	87	09.06 16.06 18.06	4/11	0/7 1/21 32/37
92-6	Nieuwerbrug	F/M	299	09.06 16.06 17.06	7/10	0/24 4/80 18/54
92-7	Bodegraven	M	94	25.06 29.06 01.07	0/10	1/100 8/40 18/82
92-8	Bodegraven	M	108	01.07	0/6	2/108

M* = mestbedrijf
F* = fokbedrijf

In de 1992 epizootie komt de rol van de mens als vector zo mogelijk nog duidelijker naar voren. Opmerkelijk bij deze epizootie is dat de verspreiding beperkt is tot drie klusters van buurtbedrijven. Cluster I omvat de bedrijven 1A en 1B, cluster II de bedrijven 3 t/m 6 en cluster III de nrs. 7 en 8. Met uitzondering van bedrijf 1A, alwaar de dierennummers opzettelijk waren verwijderd, konden op basis van aanvoer en I+R gegevens, diercontacten worden uitgesloten. De verspreiding binnen de klusters is steeds via persoonscontacten tot stand gekomen, waarbij moet worden opgemerkt dat de bedrijfsvoorzieningen voor hygiëne zoals ontsmettingsbak, schone kleding en schoeisel veelal ontbraken of waar aanwezig werden de gebruiksvoorschriften niet of slecht nageleefd. De verspreiding van cluster II naar III is vrijwel zeker veroorzaakt door de eigenaar van bedrijf 3, die onmiddellijk voorafgaande aan het vervoersverbod een aantal slachtrijpe varkens uit de hokken van bedrijf nr. 7 heeft gehaald. In deze hokken werden de seropositieve varkens aangetroffen. Opmerkelijk is verder dat de zieke en seropositieve varkens op bedrijf 6 in de hokken nabij de stalingang lagen.

Nasporing van de Algemene Inspectie Dienst bracht aan het licht dat in de periode van 12-28 april drie dode zeugen van bedrijf nr. 4 zijn afgevoerd naar de destructor te Son. Gezien de leeftijd van de varkens en de relatief grote sterfte in een korte periode is het vrijwel zeker dat de dieren aan varkenspest zijn gestorven. Omdat oudere varkens minder gevoelig zijn voor de ziekte en het op 12 april afgevoerde dier niet als eerste behoeft te zijn besmet, kan de insleep van het virus op bedrijf 4 worden geantidateerd tot een tijdstip vóór 15 maart, dus eerder dan bedrijf 1A. Aangezien twee afzonderlijke introducties van een virus met eenzelfde afwijkend monoclonaal patroon niet aannemelijk zijn, moet de ziekte van bedrijf 4 (Nieuwerbrug) naar bedrijf 1A (Pijnacker) zijn versleept. De eigenaars van beide bedrijven handelden in oude zeugen en

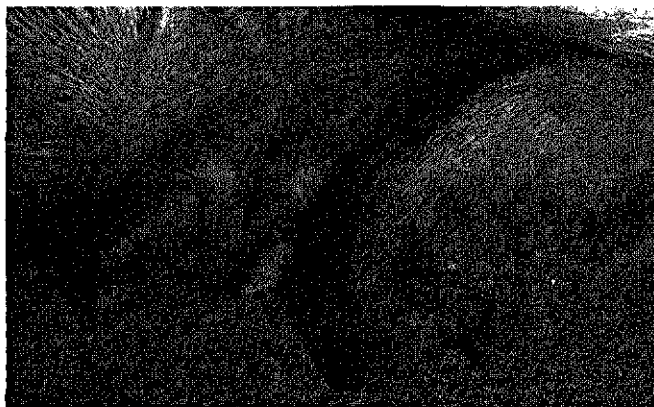
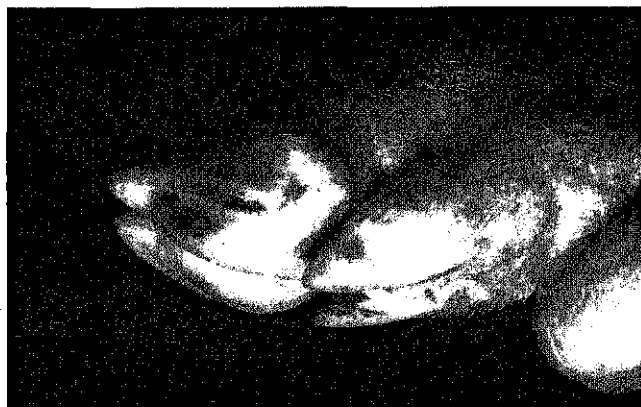
het ligt dan ook voor de hand dat het virus via dit circuit Nederland is binnengebracht. Het afdammen van deze dunne, doch risicovolle stroom is van groot belang voor de Nederlandse varkenshouderij.

Vesiculaire varkensziekte

Deze op mond- en klauwzeer gelijkende varkensziekte wordt gekenmerkt door de ontwikkeling van blaasjes aan de kroonrand van de klauwen en bijklauwtjes en in mindere mate op de neus, lippen, tong, uier en tepels. (Figuren 1-4). Hoewel vesiculaire varkensziekte (swine vesicular disease; SVD) zich snel kan verspreiden onder varkens in één hok, verloopt de ziekte op het bedrijf veel minder explosief dan mond- en klauwzeer. In veel gevallen is het ziektebeeld onduidelijk of verloopt de besmetting subklinisch, reden waarom voor het opsporen van het virus gebruik wordt gemaakt van serologisch onderzoek. SVD-virus is één van de meest resistente dierpathogene virussen. Het virus kan gedurende 3 weken met de mest worden uitgescheiden en blijft bij een gemiddelde staltemperatuur daarin 5 maanden overleven. Veel van de gebruikelijke desinfectiemiddelen zijn niet of onvoldoende werkzaam. Uit naden en kieren heeft men 11 weken na ontsmetten en leegstand van een bedrijf nog virus kunnen isoleren.

Diagnostiek

Voor het aantonen van SVD-antigeen in blaarwand materiaal of blaarinhoud is gebruik gemaakt van een "indirect double antibody sandwich" (IDAS)-ELISA. Als het materiaal voldoende virusantigeen bevat kan de diagnose SVD 4 uur na ontvangst van het monster worden gesteld. Bovendien is de test zo ingericht dat in geval van mond- en klauwzeer ook een diagnose kan worden gesteld. Bij een negatieve IDAS-ELISA of bij aanbod van onvoldoende materiaal of van mestmonsters, werd een virusisolatie op IBRS₂-celcultures ingezet. Indien de celcultures een cytopathologisch



*Figuur 1 (linksboven).
Contactinfectie na 3 dagen.
Roodheid en blaarvorming
aan de kroonrand met
uitbreiding naar de klauwbal.
Figuur 2 (rechtsboven).
Vier dagen na besmetting.
Rechts achter op de foto:
erosie ter plaatse van
doorgebroken blaar,
blaarvorming aan kroonrand
van bijklauwtje.
Links achter op de foto:
verkleuring van het
ondermijnde hoorn.
Figuur 3 (linksonder).
Praktijkgeval. Uitgebreid
epitheeldefect na
doorbreken van een blaar
op de neus.
Figuur 4 (rechtsonder).
Blaartjes op de uier en
tepels van een zeug.*

effect of degeneratie vertoonden, dan werd de cultuurvloeistof onderzocht met de IDAS-ELISA. In totaal werden 344 weefsel en mestmonsters onderzocht op aanwezigheid van virus(antigeen).

Voor het screenen van sera op antilichamen is gebruik gemaakt van de "liquid phase blocking"-ELISA (LBE). Afhankelijk van het aantal sera dat wordt ingezet kan de test na 6-9 uur worden afgelezen. Sera die een dubieuze of positieve uitslag gaven, werden ter bevestiging met de neutralisatietest onderzocht. Bij het bloedonderzoek hebben dieren die als éénling op een bedrijf een positieve uitslag in zowel de LBE als neutralisatietest gaven problemen opgeleverd. Een tweede en soms derde onderzoek op het bedrijf gaven geen aanwijzing voor een actieve besmetting. Op een totaal van 67999 onderzochte sera afkomstig van niet besmet verklaarde bedrijven werden 127 (0,18%) van deze zogenaamde "single reactors" gevonden (Tabel 2). De specificiteit van het onderzoek op basis

van de beide testen komt daarmee op 99,8%. Aan de hand van het vergelijkend onderzoek van alle sera van bedrijf 92-6, komen de sensitiviteit en specificiteit van de LBE ten opzichte van de neutralisatietest uit op respectievelijk 96,6 en 96,8%. De kans om een positief monster te missen was derhalve slechts 3,4%.

Verloop epizootie

Het eerste geval werd begin juli gediagnostiseerd op een vermeerderingsbedrijf te Ede. Ondanks dat de ziekte al 2-3 weken aanwezig was, waren slechts 10% van de zeugen en enkele tomen biggen aangetast. Sterfte was niet opgetreden. Dezelfde maand werden nog twee besmette bedrijven gevonden op een afstand van 20 en 300 meter van het eerste bedrijf (Tabel 2). Gezien het aantal seropositieve dieren is bedrijf 92-3 vermoedelijk in dezelfde periode besmet als 92-1. Uit een steekproef van twee bloedmonsters per hok op het mestbedrijf 92-3 bleek dat de

Tabel 2. *Diagnostiek vesiculaire varkensziekte in 1992.*

Bedrijf (datum)	Aantal bedrijf type	Onderzoek materiaal	IDAS-ELISA pos./totaal	Virusisolatie pos./totaal	Serologie pos./totaal
92-1 (3/7/92)	593 F*	weefsel	3/3	3/3	2/11
92-2 (14/7/92)	500 F	weefsel	1/3	3/3	7/124
92-3 (30/7/92)	457 M*	weefsel	0/2	2/2	26/76
92-4 (29/9/92)	1451 F/M	mest		0/9	137/272
92-5 (29/9/92)	9 M	mest		2/15	8/9
92-6 (27/10/92)	363 mest	weefsel		1/4 5/6	88/363
92-7 (29/10/92)	geen M	sera mest		1/3	1/2
		mest van veewagens		2/32	
overigen (6/7-21/8/92)	weefsel mest sera			0/13 0/23	0/376
overigen (8/9-27/11/92)	mest+weefsel sera			0/244	127/67999

*F = fokbedrijf; M = mestbedrijf

seropositieve varkens in 12 van de 24 hokken binnen één afdeling zaten. Op bedrijf 92-2 daarentegen was sprake van een beginnende infectie, die vrijwel zeker via persoonscontacten van 92-1 afkomstig was.

Omdat verdere tracerings zonder resultaat bleef - zelfs de biggen afgevoerd van bedrijven 1 en 2 in de maand voorafgaand aan de diagnose bleken negatief - werden de ingestelde vervoersverboden medio augustus opgeheven. Een serologisch buurt-onderzoek is in juli/augustus niet uitgevoerd, waardoor bedrijf 92-4 werd gemist.

Begin september werd evenwel in Italië SVD vastgesteld in een transport slachtvarkens uit Nederland. De 205 dieren waren in Bunnik geladen en afkomstig van 33 bedrijven op de Veluwe.

Opnieuw werd een 3 km zone rond Ede ingesteld en een toezichtsgebied dat ruwweg werd begrensd door water- en autowegen tussen de knooppunten Utrecht, Arnhem, Apeldoorn, Harderwijk en Amersfoort. Hierin lagen bijna 36000 bedrijven met ongeveer 1,2 miljoen varkens.

Naderhand zijn door Italië nog drie en door België één SVD-positief transport gemeld, waarvan de besmettingsbron in Nederland zou liggen. Behalve op herkomst- en contactbedrijven werden op alle fokbedrijven en 1/3 van het aantal mestbedrijven in het 10 km gebied rond Ede, en later ook op alle bedrijven in het 3 km gebied rond Putten, bloedmonsters genomen van gemiddeld 50 varkens per bedrijf. Daarnaast werden op daarvoor aangewezen abattoirs 5% van de mestvarkens en alle slachtzeugen uit het ingesloten gebied bemonsterd.

Evenals bij varkenspest hebben de klinische inspecties van bedrijven en van slachtdieren niet tot positieve resultaten geleid. Het serologisch buurtonderzoek daarentegen leverde eind september een besmet fokbedrijf (92-4) en een besmet overslagbedrijf (92-5) op. Beide lagen binnen een afstand van 500 m van de juli uitbraken. De nog aanwezige varkens op het overslag bedrijf waren afkomstig van 92-4. Het overslag bedrijf speelde een belangrijke rol bij het verzamelen van varkens bestemd voor export. Op dit bedrijf kon tevens virus worden geïsoleerd uit monsters ingedroogde mest. De positieve gevallen 92-6 en 92-7 zijn opgespoord via slachthuisbemonstering en zijn te beschouwen als toevalstreffers. Op beide bedrijven werd SVD-virus uit de mest geïsoleerd en op bedrijf 92-6 ook uit huidlesies. Bedrijf 92-7 was leeg op het moment dat de diagnose werd gesteld. Op bedrijf 92-6 kon een volledig serologisch onderzoek worden verricht. Hierbij bleek dat 58% van de oudere mestvarkens seropositief was en dat de infec-

tie zich naar alle drie afdelingen had verspreid.

Conclusies

Uit het verloop van de epizootie kunnen enkele algemene conclusies worden getrokken:

Virustransmissie via personen en vee-wagens heeft een grote rol gespeeld bij de verspreiding van de ziekte tussen bedrijven. Alleen 92-5 is besmet door transport van varkens.

Op mestbedrijven is de verspreiding van het virus steeds beperkt tot een aantal hokken binnen één afdeling. Op bedrijf 92-6, het enige met een volledige serologie, waren in 12 van de 15 besmette

hokken alle varkens seropositief.

Binnen fokbedrijven werd een duidelijk grotere verspreiding van de ziekte waargenomen dan op mestbedrijven, waarschijnlijk als gevolg van het grote aantal verplaatsingen van zeugen tijdens de dracht.

Serologisch onderzoek van buurt- en contactbedrijven is het meest waardevolle hulpmiddel voor het opsporen van positieve bedrijven.

Aan het onderzoek en de bestrijding van varkenspest en vesiculaire varkensziekte hebben meegewerkt:

A. den Besten, M. Bloemraad, E.A. de Boer, L. van Buiten, A. Dekker, H. Gaasenbeek, F. van Hemert, E.P. de Kluyver, C. Kragten, P.L.J.M. Moonen, C. Terpstra, G. Wensvoort, de medewerkers van de Dispatching Service Unit (DSU) en van de afdeling Proefdiervoorziening en Biotechniek (PVB).



Klinische verschijnselen (oogen neusuitvloeiing) na experimentele infectie met BHV1.

Marker vaccins en diagnostische test bieden perspectieven voor een effectieve bestrijding van Infectieuze bovine rhinotracheïtis

J.T. van Oirschot¹, F.A.C. van Engelenburg¹, A.L.J. Gielkens², M.J. Kaashoek¹, J. Madic¹, M.A. Maris-Veldhuis¹, A. Moerman³, H.A. Paal¹, S. Quak¹, F.A.M. Rijsewijk¹ en K. Weerdmeester¹

Naar schatting worden in Nederland jaarlijks zo'n 900.000 runderen geënt tegen infectieuze bovine rhinotracheïtis (IBR; koeiegriep), een infectie veroorzaakt door het bovine herpesvirus type 1 (BHV1). Een nadeel van de huidige vaccins is echter, dat zij een antilichaamrespons opwekken die niet te onderscheiden is van de antilichaamrespons na infectie met veldvirus. Dientengevolge kan men op een gevaccineerd bedrijf de geïnfecteerde runderen, die drager van het virus zijn, niet meer via bloedonderzoek opsporen om ze daarna eventueel te verwijderen. De uitroeiing van IBR (een streven van de Europese Gemeenschap in het kader van de harmonisatie van de handel in vee en vlees) wordt daardoor zeer bemoeilijkt. Een drie jaar durend onderzoek heeft geleid tot de ontwikkeling van BHV1 marker vaccins en bijbehorende serologische test waarmee het wél mogelijk is besmette runderen op gevaccineerde bedrijven te identificeren. Dit opent perspectieven voor uitroeiing van BHV1 in landen met een hoge prevalentie van IBR.

Het glycoproteïne gE

Het BHV1 behoort tot de subfamilie der alphaherpesvirinae, waartoe ook het Aujeszky virus behoort.

Alfaherpesvirussen bezitten een membraan die bezet is met zeven tot negen verschillende transmembraan glycoproteïnen, waaronder het glycoproteïne E (gE). Deze glycoproteïnen spelen een rol bij het contact tussen het virus en de gastheer. Er zijn aanwijzingen dat gE essentieel is voor verspreiding van de alphaherpesvirussen door de hersenen. Omdat de glycoproteïnen vaak hoge antilichaamtiteren opwekken zijn ze potentieel geschikt om als serologische marker voor een marker vaccin te dienen.

Voor de ontwikkeling van een BHV1 marker vaccin hebben wij het glycoproteïne E (gE) als kandidaat marker gekozen omdat het ADV glycoproteïne gE - ook wel gI genoemd - bij het marker vaccin ter bestrijding van de ziekte van Aujeszky zeer geschikt bleek te zijn. Het

gE van BHV1 was echter nog niet eerder aangetoond, en daarom diende het gen dat codeert voor gE in het BHV1 genoom eerst te worden geïdentificeerd. Hiertoe zijn delen van het BHV1 genoom in prokaryote vectoren gecloneerd en geanalyseerd. Vervolgens is de plaats van het BHV1 gE gen vastgesteld en is de nucleïnezuurvolgorde bepaald. Het BHV1 gE gen blijkt te coderen voor een transmembraan glycoproteïne van 575 aminozuren, dat duidelijk overeenkomsten vertoont met de gE eiwitten van andere alphaherpesvirussen.

Ontwikkeling marker vaccins

Een veldvirus is een groot aantal malen gepasseerd over celculturen, waarbij virusdeeltjes werden geselecteerd die kleine plaques induceerden.

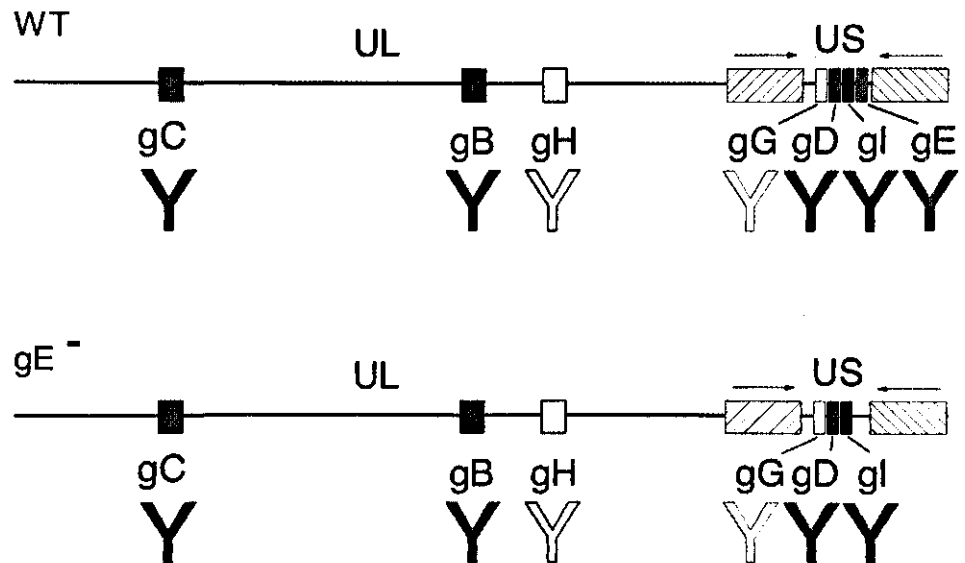
Moleculair-biologisch onderzoek van zo'n kleine-plaque variant toonde aan dat het gen dat codeert voor gE ontbrak (Figuur 1). Dit impliceert dat het gE niet nodig is voor de vermenigvuldiging van het virus

1) CDI-DLO Afdeling Open Virologie

2) CDI-DLO Afdeling Moleculaire Biologie

3) CDI-DLO Afdeling Bedrijfsdiergeneeskunde, Pathologie en Epidemiologie

Figuur 1. Principe van een markervaccin. Bovine herpes virus type 1 (BHV1) codeert voor een aantal glycoproteïnen, zoals gB, gC, gD, gE, gG, gH en gI. Runderen maken antilichamen tegen al deze glyco-proteïnen (aangegeven met het Y symbool). Het marker vaccin gE-negatief mist het glycoproteïne E-gen. Runderen, gevaccineerd met dit gE-negatief vaccin, maken geen antilichamen tegen glycoproteïne E. Het CDI-DLO heeft een test ontwikkeld om antilichamen tegen glycoproteïne E aan te tonen en zo BHV1 geïnfecteerde dieren onder de gevaccineerde dieren op te sporen.



in celculturen. Uitgaande van deze gE-negatieve mutant is een zaaivirus batch gemaakt, die als uitgangsmateriaal diende voor het ontwikkelen van een geattenuëerd (levend) en een (geïnactiverd) dood marker vaccin.

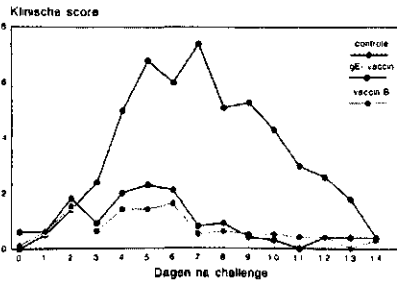
Werkzaamheid

Beide BHV1 marker vaccins, levend en dood, zijn getest op werkzaamheid bij kalveren in een vaccinatie-challenge proef in het laboratorium. De werkzaamheid van het levende marker vaccin werd vergeleken met dat van een commercieel levend vaccin. Daartoe werden zeven weken oude SPF kalveren éénmalig intranasaal gevaccineerd met een gelijke dosis van het marker vaccin of van het commerciële vaccin. Vijf weken na de vaccinatie werden de dieren intranasaal gechallengeerd met de virulente Iowa stam. Ook een groep ongevaccineerde controle kalveren werd gechallengeerd. Na challenge vertoonden de ongevaccineerde kalveren de bekende IBR verschijnselen, zoals koorts, neusuitvloeiing, verlies van eetlust, lusteloosheid en laesies van het neusslijmvlies. Deze kalveren hadden een significant hogere klinische score

(een cijfermatige weergave van de mate van ziek zijn) dan de gevaccineerde groepen (Figuur 2). De gevaccineerde kalveren vertoonden slechts geringe neusuitvloeiing en kleine laesies van het neusslijmvlies die snel verdwenen. Het aantal dagen dat de gevaccineerde kalveren challenge virus uitscheidde werd met ongeveer de helft verminderd ten opzichte van dat van de ongevaccineerde kalveren. De virustiters in het neusvocht van de met marker vaccin geënte kalveren waren doorgaans een 100-voud lager dan die van de ongevaccineerde kalveren. Zes weken na challenge werden de dieren met corticosteroïden behandeld om eventueel latent aanwezig virus te reacteren. In de ongevaccineerde groep werd het challenge virus door vijf kalveren uitgescheiden gedurende één tot vijf dagen; in beide gevaccineerde groepen daarentegen door slechts één kalf op één dag. Vaccinatie had dus tot gevolg dat er minder challenge virus werd gereactiveerd.

Voor het testen van het dode gE-negatieve marker vaccin werden vier maanden oude BHV1-seronegatieve kalveren gebruikt. Ze werden tweemaal subcutaan gevaccineerd met vier weken

Figuur 2. De gemiddelde klinische score na challenge van de kalveren in de ongevaccineerde controle groep, in de groep gevaccineerd met het levende gE-negatieve vaccin en in de groep gevaccineerd met het levende commerciële vaccin (vaccin B). Elke groep bestond uit acht kalveren.



tussentijd. De challenge vond acht weken na de eerste vaccinatie plaats. Vergeleken met ongevaccineerde kalveren gaf vaccinatie een vrijwel volledige bescherming tegen de challenge infectie. De gemiddelde challenge virusuitscheiding van de gevaccineerde groep was 10.000 tot 100.000 keer lager dan in de ongevaccineerde controle groep (Figuur 3). Uit bovenstaande experimenten kunnen we concluderen dat zowel het levende als het dode gE-negatieve vaccin een vrijwel volledige klinische bescherming geeft tegen een challenge infectie en dat beide vaccins de uitscheiding van challenge virus zeer aanzienlijk reduceren.

Veiligheid

Na intranasale toediening van het levende gE-negatieve vaccin werd slechts een geringe neusuitvloeiing geconstateerd. Beide levende vaccins werden tot hoge titers gedurende acht tot negen dagen uitgescheiden (Figuur 4). Op grond van deze curves mogen we verwachten dat beide vaccins spreiden. Na corticosteroïden toediening konden

we het gE-negatieve vaccinvirus bij geen enkel kalf in het neusvocht aantonen, terwijl het commerciële vaccinvirus bij vier van de acht kalveren werd gereactiveerd. Het marker vaccin lijkt dus niet of moeilijk te worden gereactiveerd, wat een beduidend voordeel is ten opzichte van de huidige vaccins. Van een aantal BHV1 vaccins is namelijk bekend dat ze gemakkelijk kunnen worden gereactiveerd. Of het marker vaccin abortus induceert is momenteel in onderzoek. Ook wordt het gE-negatieve vaccinvirus een aantal keren in kalveren gepasseerd om na te gaan of de avirulentie van het virus stabiel is. Vaccinatie met dood vaccin had geen enkel nadelig effect. Beide gE-negatieve marker vaccins lijken dus, voor zover onderzocht, vrijwel onschadelijk te zijn.

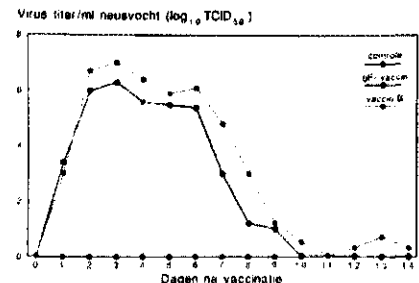
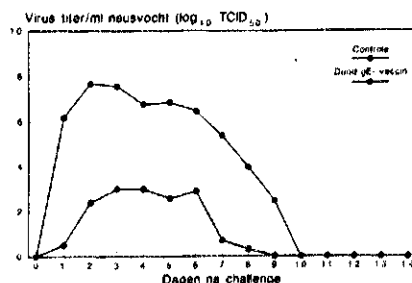
De gE-ELISA

In ons laboratorium is een groot aantal monoclonale antilichamen (MAbs) ontwikkeld tegen BHV1. De nadere karakterisering van deze MAbs is vooral uitgevoerd met zowel prokaryote als eukaryote expressie producten van het BHV1 gE eiwit. Met gebruik van deze recombinant gE eiwit was snel vast te stellen of MAbs tegen gE gericht waren. Twee van de MAbs die gericht zijn tegen twee verschillende epitopen op gE, zijn geselecteerd voor het opzetten van een test om antilichamen tegen gE aan te tonen. Het principe van de test komt overeen met dat van de Aujeszky gI-ELISA zoals reeds beschreven is, o.a. in het CDI jaarverslag van

Figuur 3. (links) De gemiddelde virusuitscheiding na challenge van zes kalveren in de ongevaccineerde groep en in de groep gevaccineerd met dood gE-negatief vaccin.

Figuur 4. (rechts). De gemiddelde vaccinvirusuitscheiding na vaccinatie van acht kalveren gevaccineerd met het gE-negatieve levende vaccin en met het commerciële levende vaccin (vaccin B).

TCID₅₀ = tissue culture infective dose 50%.



1986. Na experimentele intranasale infectie waren de eerste gE-antilichamen al na elf dagen in het bloed aantoonbaar (Figuur 5), en ze bleken gedurende tenminste 2,5 jaar op een hoog niveau te persisteren. De runderen die met het dode gE-negatieve vaccin waren gevaccineerd, en dus na challenge veel minder virus uitscheiden dan de ongevaccineerde kalveren (Figuur 3), vormden na challenge gE-antilichamen, die in beide groepen voor het eerst werden aangetoond op dag 14 na challenge (Figuur 6). Dit suggereert dat een beperkte vermenigvuldiging van BHV1 voldoende is om gE-antilichamen op te wekken.

Perspectieven

Een enting met gE-negatieve vaccins geeft bij een gevaccineerd rund, indien dit met BHV1 besmet wordt, een aanzienlijke vermindering van veldvirus-uitscheiding. Naar verwachting zal dit de viruscirculatie op een bedrijf terugdringen en dientengevolge het aantal geïnfecteerde runderen. Met behulp van de gE-ELISA kan men dit verloop, indien

gewenst, op de voet volgen. Als het economisch verantwoord is kan men de laatste gE-seropositieve dragers versneld opruimen.

Veldproef

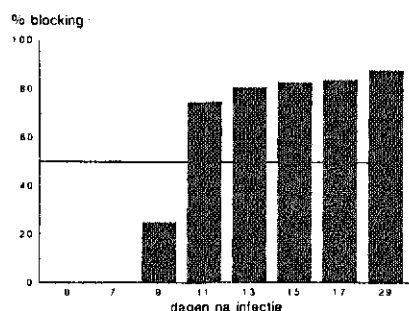
Om na te gaan of toepassing van een intensief ent-schema inderdaad het beoogde effect heeft, ligt het in de bedoeling op korte termijn een veldproef uit te voeren. Hiervoor zullen waarschijnlijk een honderdtal melkvee-bedrijven worden uitgezocht, waarvan de helft wel en de helft niet wordt gevaccineerd. Aan het begin van de proef worden de runderen tweemaal met dood vaccin geënt met een interval van een maand en een half jaar later voor de derde keer. Op vleesveebedrijven zal het levende marker vaccin worden ingezet. Aan het begin van de proef en na een jaar wordt bij alle runderen bloed afgenomen en wordt het aantal gE-seropositieve runderen vastgesteld. Het verschil in toe- of afname van gE-seropositieve runderen tussen gevaccineerde en niet-gevaccineerde bedrijven is dan een maat voor de werkzaamheid van het vaccin onder praktijkomstandigheden.

Tot slot

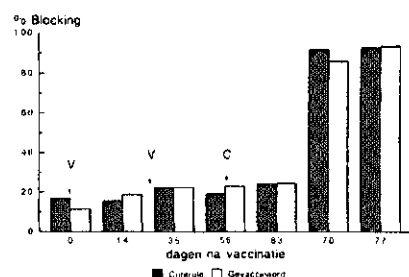
Inmiddels is ook een recombinant BHV1 geconstrueerd waaruit het gE gen is gedeleteerd. De eerste resultaten van de dierproeven laten zien dat deze genetisch gemodificeerde gE deletiemutant vrijwel avirulent is voor jonge kalveren en een goede immuniteit induceert tegen een challenge infectie. Op korte termijn zal de virulentie en immunogeniciteit van deze gE deletiemutant in kalveren worden vergeleken met die van andere genetisch gemodificeerde BHV1 deletiemutanten.

Wij danken de vele medewerkers van de afdeling Proefdiervoorziening en Biotechniek die een belangrijke bijdrage aan dit onderzoek hebben geleverd. Dit onderzoek werd in samenwerking uitgevoerd met Bayer AG, Leverkusen, Duitsland.

Figuur 5. De gemiddelde gE-antilichaamrespons van drie kalveren na experimentele intranasale BHV1 infectie. Een blockingspercentage groter dan 50 wordt als positief beschouwd. Elf dagen na infectie vertonen alle drie runderen antilichamen tegen gE.



Figuur 6. De gemiddelde gE-antilichaamrespons van zes kalveren na vaccinatie met een dood gE-negatief marker vaccin (op dag 0 en dag 28) en na challenge infectie (op dag 56). Een blockingspercentage groter dan 50 wordt als positief beschouwd. Na vaccinatie blijven de runderen negatief. Veertien dagen na challenge zijn zowel bij gevaccineerde als bij ongevaccineerde kalveren antilichamen aantoonbaar.



Kwaliteitsborging van laboratorium diagnostiek door middel van inter-laboratorium onderzoek

J.A. Kramps¹⁾, S. Quak¹⁾, G.H.M. Counotte²⁾, J. Moedt¹⁾, T. Pover¹⁾, J. Hoek-Warnaar¹⁾, G. Wijbenga¹⁾ en J.T. van Oirschot¹⁾

Bij het uittesten van een nieuw ontwikkelde laboratoriumtest dienen parameters vastgelegd te worden die inzicht geven in de betrouwbaarheid van de analyse-resultaten die met de betreffende test worden verkregen. Parameters die ondermeer van belang zijn, zijn nauwkeurigheid (mate waarin het testresultaat de ware waarde benadert), aantoonbaarheidsgrens, sensitiviteit (percentage geïnfecteerde dieren met een positieve test) en specificiteit (percentage niet-geïnfecteerde dieren met een negatieve test). Als een nieuwe test gevalideerd is en geschikt blijkt voor het gestelde doel zal praktische toepassing plaats kunnen vinden. Om na te kunnen gaan of de betrouwbaarheid van analyseresultaten op korte en lange termijn niet verandert (kwaliteitsborging op termijn), dienen z.g. ringonderzoeken georganiseerd te worden.

Ringonderzoek volgens norm ISO 5725

Ten behoeve van de kwaliteitsbewaking van de virologische immuundiagnostiek werd in 1992 een aanvang gemaakt met ringonderzoeken, opgezet volgens richtlijnen beschreven in norm ISO 5725 (1). Door middel van dit type inter-laboratoriumonderzoek bepaalt men de herhaalbaarheid en reproduceerbaarheid van een laboratoriumbepaling. Deze grootheden zijn een maat voor de nauwkeurigheid van de bepaling. De herhaalbaarheid (r) wordt gedefinieerd als de waarde waar beneden het absolute verschil tussen duplo bepalingen ligt met een waarschijnlijkheid van 95% (in formule:

$|\text{result.1} - \text{result.2}| < r$). De duplo bepalingen dienen hierbij onder dezelfde omstandigheden (laboratorium, tijd, personeel, reagentia en instrumenten) te worden uitgevoerd.

Voor de reproduceerbaarheid (R) geldt dezelfde definitie (in formule: $|\text{result.1} - \text{result.2}| < R$). Nu dienen de duplo bepalingen echter uitgevoerd te worden in verschillende laboratoria, door verschillende personen en gebruik makend van verschillend instrumentarium.

De herhaalbaarheid geeft dus informatie over het maximale verschil tussen duplo bepalingen wanneer de testomstandigheden zoveel mogelijk constant worden gehouden: dit levert informatie op over toevallige fouten. De reproduceerbaarheid daarentegen geeft een indruk over het maximale verschil dat kan bestaan tussen analyseresultaten van hetzelfde testmonster wanneer de test door verschillende laboratoria wordt verricht: verschillen zijn het gevolg van zowel toevallige fouten alsook van systematische fouten.

In 1992 werden zes laboratorium bepalingen opgenomen in ringonderzoeken volgens norm ISO 5725: vijf enzym-immunobepalingen (ELISA's) voor de detectie van virus-specifieke antilichamen (Aujeszky-gl virusantigeen, bovine virus diarrhoea virus, bovine leukose virus, bovine herpesvirus 1 en bovine respiratoir syncytiaal virus) en één immunodiffusie test voor de detectie van antilichamen gericht tegen bovine leukose virus.

De ringonderzoeken vonden, voor elke bepaling, eenmaal per kwartaal plaats en werden uitgevoerd op drie antilichaam titerniveaus volgens de z.g. "split-level" methode. Alle deelnemende laboratoria

1) CDI-DLO Open Afdeling Virologie

2) Stichting Gezondheidszorg voor Dieren

ontvingen onder code zes gevriesdroogde serummonsters: per titerniveau ('laag', 'medium' en 'hoog') twee monsters ('serum 1' en 'serum 2'). Deze twee serummonsters bevatten vrijwel dezelfde specifieke antilichaamconcentratie. Er werd gevraagd alle monsters te testen in een verdunningsreeks en de resultaten als titers weer te geven.

De behaalde resultaten werden vervolgens statistisch bewerkt door middel van berekeningen zoals beschreven in norm ISO 5725. In het kort komt het erop neer dat per titerniveau de herhaalbaarheid wordt berekend uit het verschil dat elk laboratorium heeft gevonden tussen 'serum 1' en 'serum 2'.

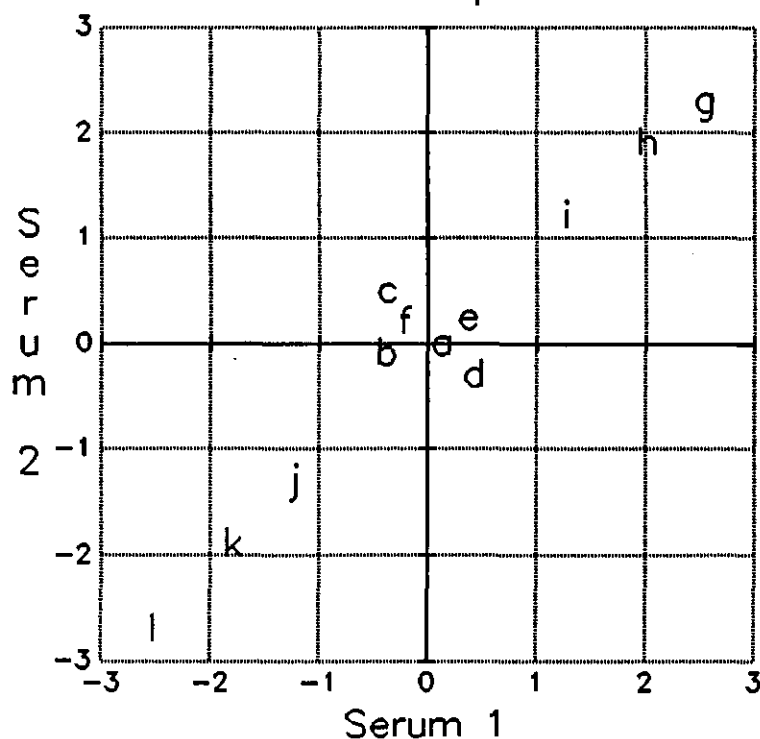
Bij de presentatie van de resultaten van elk ringonderzoek worden alle individuele testuitslagen gepresenteerd in een XY-diagram. Hiertoe wordt per testmonster het gemiddelde resultaat en de bijbehorende standaarddeviatie (S.D.) over alle deelnemers berekend. De afwijking van elke testresultaat ten opzichte van het gemiddelde resultaat wordt vervolgens uitgedrukt in aantal S.D.'s: de zogenaamde z-score. In het XY-diagram wordt van elk laboratorium de z-score van 'serum 1' weergegeven op de x-as en die van 'serum 2' op de y-as. Figuur 1 toont een theoretisch voorbeeld van zo'n XY-diagram ('Youden-plot')(2). In deze figuur staan de resultaten van 12 deelnemers (a t/m l) weergegeven. Wanneer er sprake is van uitsluitend toevallige fouten, dan zullen de testresultaten willekeurig binnen een zekere straal rond het middelpunt van het diagram strooien. In de figuur is dit het geval met de resultaten van deelnemers a t/m f.

Is er sprake is van een systematische fout, dan zullen de analyseresultaten van een laboratorium alle hoger of alle lager uitkomen dan het gemiddelde resultaat. De resultaten liggen dan langs de diagonaal welke in de figuur loopt van linksonder naar rechtsboven. De figuur laat zien dat de resultaten van de deelnemers g t/m l een systematische fout ten opzichte van het gemiddelde resultaat bevatten.

Indien een testresultaat meer dan twee standaarddeviaties afwijkt van het gemiddelde resultaat (z-score < -2 S.D. of z-score > 2 S.D.), spreekt men van een significante afwijking: de resultaten van deelnemers g en l vertonen in het gegeven voorbeeld een significante systematische afwijking.

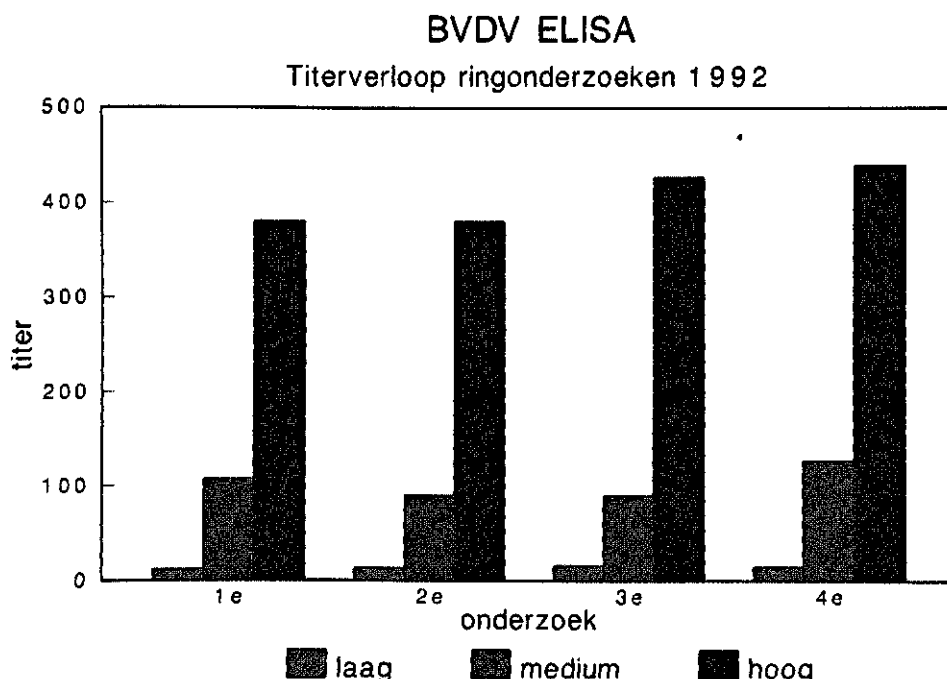
Aan de hand van een 'Youden-plot' krijgt men dus direct een indruk over de mate waarin de resultaten van de verschillende deelnemers met elkaar overeenstemmen. Systematische fouten die met een test worden gemaakt resulteren in een slechte reproduceerbaarheid die aanzienlijk groter is dan de herhaalbaarheid.

"Youden-plot"



Figuur 1. XY-diagram waarin de afwijking van de testresultaten van deelnemers (a t/m l) ten opzichte van het gemiddelde testresultaat is weergegeven, uitgedrukt in aantal standaarddeviaties.

De reproduceerbaarheid wordt vastgesteld aan de hand van de gemiddelde waarden van 'serum 1' en van 'serum 2' berekend over alle deelnemende laboratoria.



Figuur 2. Gemiddelde titers per ringonderzoek

Hoewel met behulp van ringonderzoek eventuele toevallige en systematische fouten worden gesignaleerd, kan geen enkele uitspraak gedaan worden over de oorzaak van deze fouten.

Het is belangrijk zich te realiseren dat het resultaat van een ringonderzoek slechts informatie geeft over de situatie op een bepaald moment. Gegevens over de herhaalbaarheid en reproduceerbaarheid van een test dienen daarom gebaseerd te zijn op resultaten van meerdere ringonderzoeken. Als voorbeeld worden hieronder gegevens gepresenteerd betreffende een immunoassay voor de detectie in runderserum van antilichamen gericht tegen bovine virus diarrhoe virus (BVDV). De gegevens zijn gebaseerd op een viertal ringonderzoeken waaraan door 6 laboratoria werd deelgenomen.

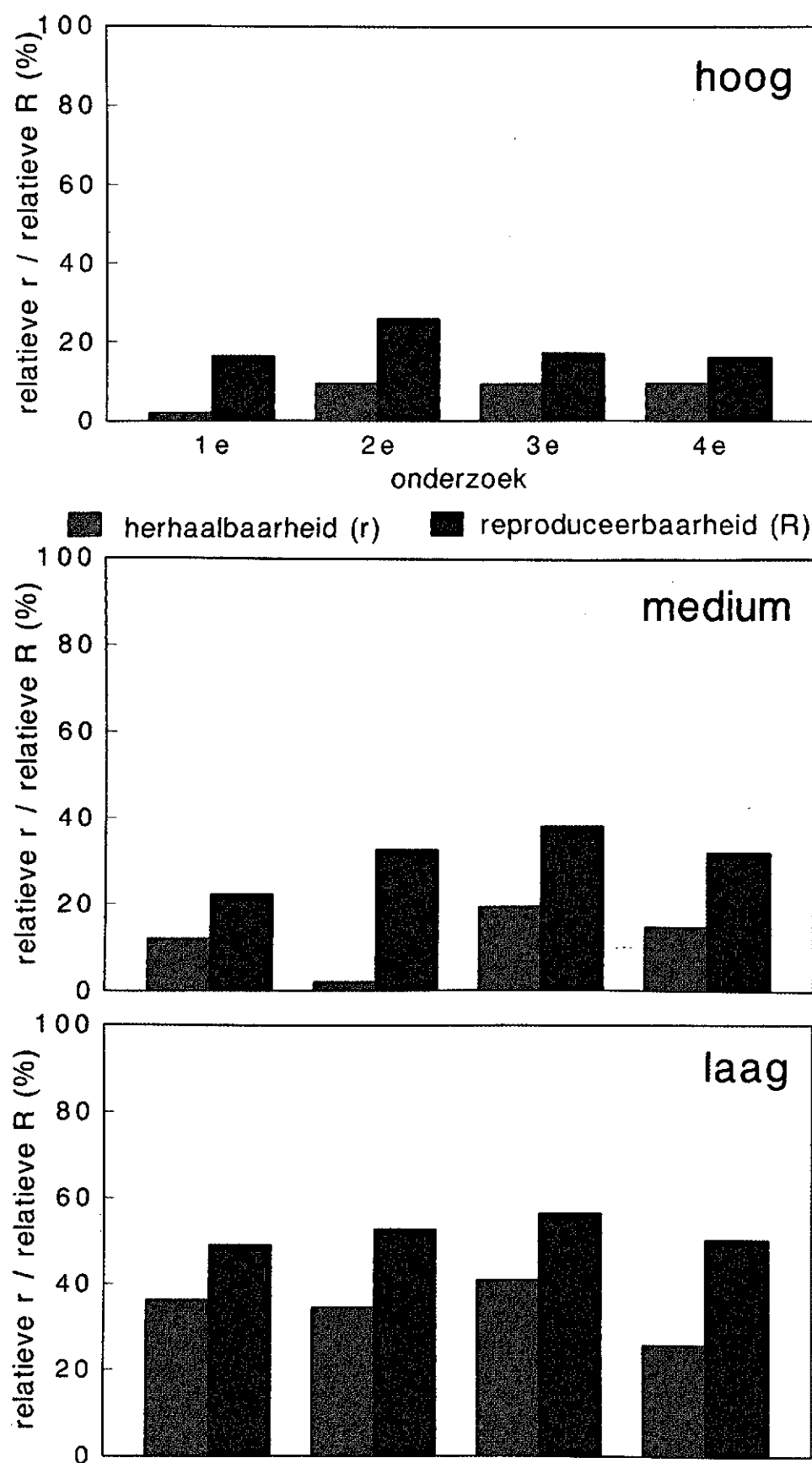
In figuur 2 zijn per ringonderzoek de gemiddelde titers van de 'lage', 'medium' en 'hoge' serummonsters weergegeven. Uit deze figuur blijkt dat bij alle 4 onderzoeken, verricht in 1992, telkens vrijwel dezelfde titers werden gevonden. Omdat de titer niveaus per ringonderzoek telkens hetzelfde zijn en de bepalingen van de titers berusten op

het verdunningsniveau waarop nog een positief testsignaal wordt verkregen, kan op grond van getoonde resultaten worden geconcludeerd dat de aantoonbaarheidsgrens van de bepaling gedurende het jaar constant is gebleven.

Figuur 3 toont per titer niveau en per ringonderzoek de relatieve herhaalbaarheid (r) en de relatieve reproduceerbaarheid (R), berekend volgens norm ISO 5725. De figuur laat zien dat voor elk titer niveau beide grootheden tussen de onderzoeken niet, of slechts in geringe mate, veranderen. Met andere woorden de test is gedurende het jaar met een constante nauwkeurigheid uitgevoerd.

Uit berekening van de zogenaamde F-waarde, een statistische grootheid welke evenredig is met de verhouding R/r , kan tevens geconcludeerd worden dat er geen sprake is van significante systematische fouten.

Resumerend kan voor de betreffende BVDV-ELISA worden geconcludeerd dat de nauwkeurigheid in 1992 werd vastgesteld op drie titer niveaus door middel van een viertal 'split-level' experimenten (ISO 5725) waarbij 6 laboratoria waren betrokken:



Figuur 3. Herhaalbaarheid en reproduceerbaarheid per ringonderzoek

- niveau 1: gemiddelde titer = 13
relatieve herhaalbaarheid = 34%
relatieve reproduceerbaarheid = 52%
- niveau 2: gemiddelde titer = 102
relatieve herhaalbaarheid = 12%
relatieve reproduceerbaarheid = 31%
- niveau 3: gemiddelde titer = 406
relatieve herhaalbaarheid = 7%
relatieve reproduceerbaarheid = 19%

Conclusie

Organisatie van ringonderzoeken zoals hierboven beschreven geeft inzicht in de betrouwbaarheid van een test en draagt bij aan de kwaliteitsbeheersing van de laboratoriumdiagnostiek. Tevens worden we in staat gesteld statistische berekeningen uit te voeren waardoor parameters, die informatie geven over de betrouwbaarheid (herhaalbaarheid en reproduceerbaarheid), op een juiste manier kunnen worden vastgelegd

De ringonderzoeken ten behoeve van de virologische immundiagnostiek worden georganiseerd in samenwerking met de disciplinaire laboratoriumwerkgroep "Immuundiagnostiek en Virologie" van de Stichting Gezondheidszorg voor Dieren. Aan de organisatie wordt tevens meegewerkt door medewerkers van de afdeling Productie, Mediabereiding en Centrale Spoel en Sterilisatie. De afdeling Controle en Standaardisatie, de Open Afdeling Virologie en de Regionale Gezondheidsdiensten voor Dieren nemen deel aan de ringonderzoeken.

(1) International Standard ISO 5725.

Precision of test methods : Determination of repeatability and reproducibility for a standard test method by inter-laboratory tests.

(2) W.J. Youden and E.H. Steiner, Statistical Manual of the Association of Official Analytical Chemists, 1975, ISBN 0-935584-15-3.



Dispatching Service Unit (DSU). De Afdeling waar centraal al het onderzoeksmateriaal op het CDI-DLO binnen komt.



Salmonella enteritidis infecties bij pluimvee; ontwikkeling van een enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) voor het opsporen van geïnfecteerde koppels

F.G. van Zijderveld¹⁾, J. Anakotta²⁾, R.A.M. Brouwers¹⁾, A.M. van Zijderveld-van Bemmel¹⁾

Tot 1988 werd in Nederland ongeveer de helft van het aantal zogenaamde 'overige salmonellosen' bij de mens veroorzaakt door S. typhimurium. Als bronnen van infectie fungeren voedingsmiddelen van dierlijke oorsprong, met name afkomstig van het varken en pluimvee. Vanaf 1988 kwam er een duidelijke verandering in dit patroon. Internationaal en iets later ook in Nederland werd een enorme stijging van het aantal S. enteritidis-infecties bij de mens vastgesteld, vooral door de faagtypen 1 en 2 (faagtypen 4 en 8 volgens het Engelse faagtyperingssysteem). Eieren, ei producten en pluimveevlees zijn de bron van deze infecties. Het totaal aantal humane Salmonella-infecties per jaar is echter niet toegenomen. Sinds 1989 nemen S. enteritidis en S. typhimurium in Nederland elk circa 25-35% van alle humane Salmonella-infecties voor hun rekening. In ander landen is S. enteritidis al enige tijd het meest prominente serotype.

Landelijke bestrijding

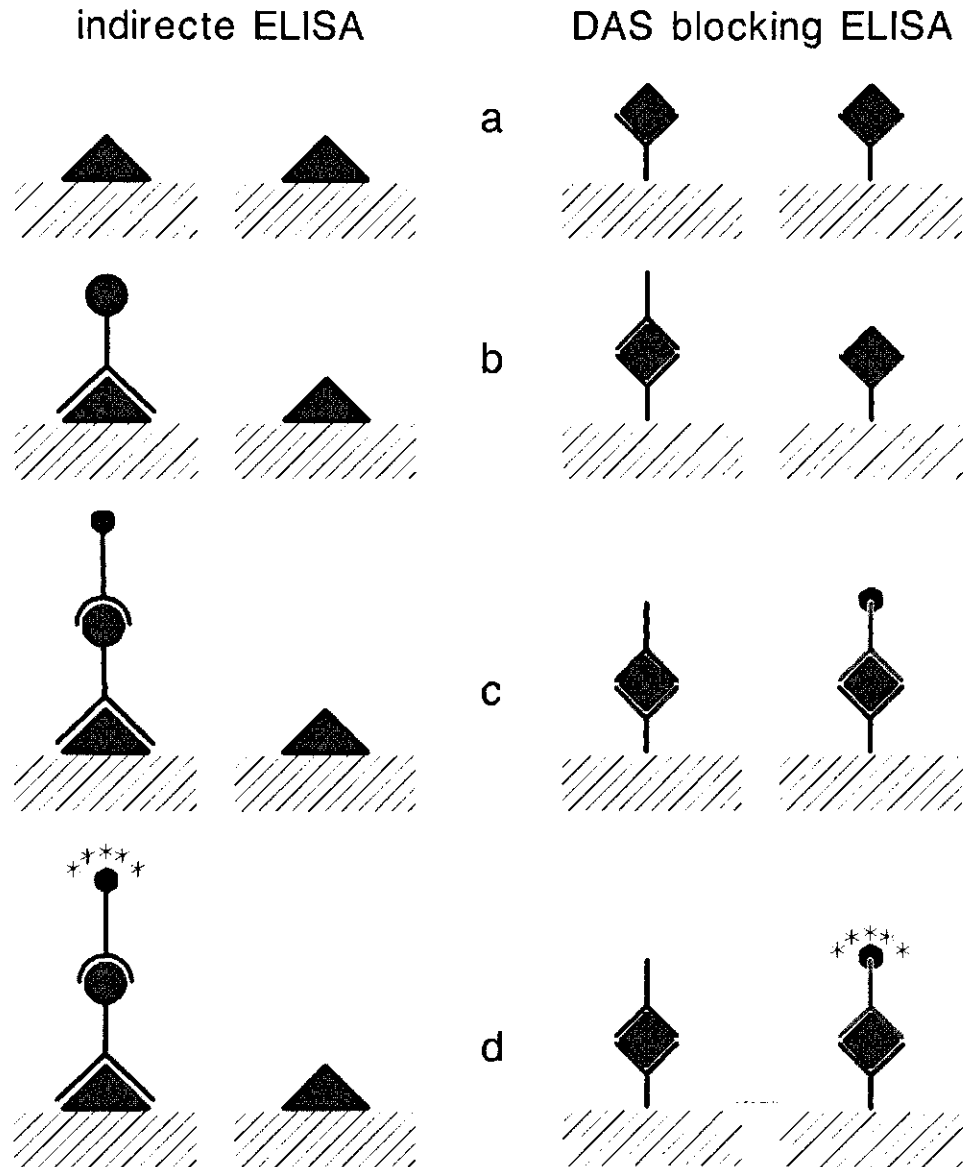
Al in een vroeg stadium werd onderzoek geïnitieerd naar het voorkomen van *S. enteritidis* bij Nederlands pluimvee in de eindsector. Een inventarisatie door middel van steekproeven, vooral uitgevoerd door het Rijksinstituut voor de Volksgezondheid en Milieuhygiëne (RIVM), toonde aan dat in 1989 en 1990 respectievelijk 17,6% en 7,4% van de Nederlandse legpluimveekoppels besmet was met *S. enteritidis*; voor de slachtsector waren deze getallen respectievelijk 8,3% en 7,5%. Dit resultaat was aanleiding te starten met een landelijke bestrijding van *S. enteritidis*-infecties bij pluimvee; in september van 1989 trad het besluit onderzoek *Salmonella enteritidis* 1989 van het Produktschap voor Pluimvee en Eieren in werking, dat de basis vormt voor het nationale *S. enteritidis* bewakings- en bestrijdingsprogramma. Naast horizontale transmissie speelt ook een verticale trans-

missie via het ei een rol in de epidemiologie van *S. enteritidis*-infecties bij pluimvee. Het voer speelt nauwelijks of geen rol in de epidemiologie. Via de zogenaamde 'top-down-benadering' tracht men met het landelijk bestrijdingsprogramma door middel van het opsporen en elimineren van *S. enteritidis*-geïnfecteerde reproductiekoppels (fok- en vermeerderingsdieren van zowel de leg- als de slachtsector) *S. enteritidis* uit de Nederlandse pluimveestapel te verwijderen. Bovendien zijn richtlijnen van kracht voor importmateriaal en broederijen.

De uitvoering van het bestrijdingsprogramma is opgedragen aan de Gezondheidsdienst voor Pluimvee te Doorn. Het opsporen van *S. enteritidis*-geïnfecteerde koppels gebeurde aanvankelijk via periodiek bacteriologisch onderzoek van fecesmonsters. Een dergelijk onderzoek als screeningstechniek is bewerkelijk, tijdrovend en kostbaar.

1) CDI-DLO Afdeling Bacteriologie
2) CDI-DLO Afdeling Immunologie

Figuur 1. Principe van de indirecte ELISA (links) en de DAS blocking ELISA (rechts)



Indirecte ELISA: gezuiverd antigeen wordt gecoat op microtiter platen (a), vervolgens wordt het te onderzoeken serum toegediend (b); indien antilichamen tegen het antigeen aanwezig zijn, binden deze aan het antigeen. De gebonden antilichamen worden vervolgens gedetecteerd met een conjugaat, bestaande uit de met peroxidase gelabelde immunoglobulinen-fractie van een antiserum of monoclonale antilichamen gericht tegen immunoglobulinen van de diersoort waarvan het te onderzoeken serum afkomstig is (c); de binding van het conjugaat wordt vervolgens zichtbaar gemaakt met substraat en een chromogeen, dat bij omzetting van het substraat van kleur verandert (d). Een positieve reactie uit zich dus in de vorm van een gekleurde well in het plaatje. Voor elk te onderzoeken diersoort is in principe een apart conjugaat nodig.

DAS blocking ELISA: een ruw antigeenpreparaat wordt toegevoegd aan microtiter platen gecoat met (monoclonale) antilichamen tegen het specifieke antigeen; bij deze stap wordt dit specifieke antigeen gebonden aan de antilichamen (a). Vervolgens wordt het te onderzoeken serum toegediend; indien antilichamen tegen het antigeen aanwezig zijn, binden deze aan het antigeen (b). Vervolgens wordt het conjugaat toegevoegd, dat bestaat uit met peroxidase gelabelde monoclonale antilichamen gericht tegen het antigeen. Indien geen antilichamen tegen het antigeen aanwezig waren in het te onderzoeken monster, kan dit conjugaat binden aan het antigeen (c). Deze binding van het conjugaat wordt vervolgens zichtbaar gemaakt met substraat en een chromogeen, dat bij omzetting van het substraat van kleur verandert (d). Een positieve reactie uit zich dus in de vorm van een kleurloze well in het plaatje. Voor elke te onderzoeken diersoort kan hetzelfde conjugaat worden gebruikt.

Bovendien geeft het slechts een momentopname en bestaat de kans dat, indien niet voldoende monsters worden onderzocht of tevens andere *Salmonella*-typen in het koppel aanwezig zijn, vals negatieve resultaten worden verkregen; een uitbreiding van het aantal te onderzoeken monsters tot een statistisch verantwoord aantal leidt snel tot capaciteitsproblemen.

Vanwege deze redenen bestond bij de Gezondheidsdienst voor Pluimvee een grote behoefte aan een betrouwbare serologische methode, die het bacteriologisch onderzoek als screenings-techniek kon vervangen. Serologie door middel van een bloedagglutinatietest met *S. pullorum*-antigeen bleek te weinig gevoelig. Vanwege zijn snelheid en potentieel grote capaciteit bestond een voorkeur voor een enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Op het CDI-DLO zijn een aantal ELISAs ontwikkeld die na toetsing op sera en eieren van experimenteel geïnfecteerde dieren, vervolgens in samenwerking met de Gezondheidsdienst voor Pluimvee zijn geëvalueerd in de praktijk.

Ontwikkeling van een ELISA

Aangezien het O-antigeen (LPS) en het H-antigeen (flagellen) de basis vormen voor de serotypering van salmonellae, liggen deze antigenen het meest voor de hand om te gebruiken in een ELISA. *S. enteritidis* behoort tot *Salmonella* groep D volgens het Kauffmann-White-schema met als O-antigene factoren 1, 9, en 12 en H-antigeen gm. De antigene formule voor *S. typhimurium* is O 1,4,[5],12;H;1,2 (groep B).

In eerste instantie werd besloten een viertal ELISAs te ontwikkelen, te weten twee indirecte ELISAs, op basis van LPS en flagelline van *S. enteritidis* als antigeen, en twee double-antibody sandwich-blocking ELISAs (DAS-blocking ELISA) op basis van monoclonale antilichamen (MAbs) tegen LPS en flagelline. Het principe van beide typen ELISAs is weergegeven in Figuur 1. Uit literatuurgegevens en op theoretische

gronden kon worden verwacht dat de indirecte ELISAs niet specifiek genoeg zouden zijn, vanwege kruisreacties met andere salmonellae.

Fusies ter verkrijging van MAbs tegen *S. enteritidis* LPS en flagelline resulteerden in 23 MAbs tegen flagelline en 16 MAbs tegen LPS. Met behulp van MAbs tegen epitopen van het flagelline, die blijkbaar alleen voorkomen bij *S. enteritidis* en met behulp van MAbs tegen het O9-antigeen werden beide DAS-blocking ELISAs opgezet.

Toetsing van de ELISAs met behulp van sera en eieren van experimenteel geïnfecteerde dieren

Vier groepen SPF-ééndagskuikens en vier groepen 26 weken oude SPF-leghennen werden experimenteel, oraal geïnfecteerd met respectievelijk *S. enteritidis* faagtype 1, *S. enteritidis* faagtype 2, *S. typhimurium* en *S. panama* (groep D, O 1,9,12;H:1,5). Niet-geïnfecteerde dieren fungeerden als controles.

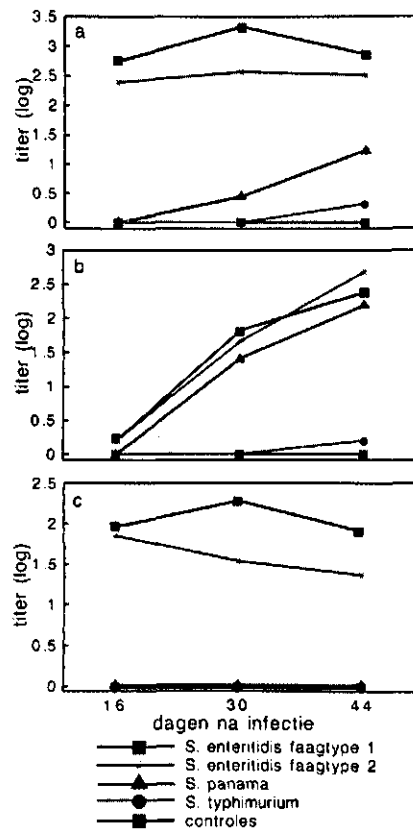
Sera van ééndagskuikens werden verzameld op 16, 30 en 44 dagen na infectie; sera van de leghennen op 7, 14, 28 en 39 dagen na infectie; eieren werden dagelijks verzameld gedurende het gehele experiment.

De resultaten van de verschillende ELISAs met sera van ééndagskuikens (Figuur 2) kunnen als volgt worden samengevat:

de DAS-blocking ELISA op basis van MAbs tegen het flagelline (GM-DAS blocking ELISA) gaf de beste resultaten; alle serummonsters van kuikens geïnfecteerd met S. enteritidis hadden hoge titers, terwijl alle sera van de andere groepen negatief werden bevonden;

de indirecte ELISA met LPS differentieerde niet tussen S. enteritidis en S. panama-geïnfecteerde dieren (beide groep D). Zestien dagen na infectie werden alle monsters nog negatief bevonden; het zeer jonge dier heeft een duidelijk vertraagde respons ten opzichte

Figuur 2. Gemiddelde serumtiters per groep experimenteel geïnfecteerde ééndagskuikens in de indirecte ELISA met *S. enteritidis* flagelline (a), de indirecte ELISA met *S. enteritidis* LPS (b) en de GM-DAS blocking ELISA (c).



van LPS in vergelijking met die tegen eiwitantigenen, zoals flagelline;

tot op zekere hoogte zou een indirecte ELISA op basis van flagelline gebruikt kunnen worden bij zeer jonge dieren.

De resultaten van de verschillende ELISAs met sera van experimenteel geïnfecteerde leghennen staan weergegeven in Figuur 3 en zijn als volgt samen te vatten:

de indirecte ELISA en de DAS-blocking ELISA op basis van LPS differentiëren niet tussen *S. enteritidis*, *S. typhimurium* en *S. panama*-geïnfecteerde dieren;

bij sera van volwassen dieren treden veel kruisreacties op in de indirecte ELISA op basis van flagelline, waardoor deze niet bruikbaar is voor sera van oudere dieren;

de GM-DAS blocking ELISA gaf uitstekende resultaten; alle serummonsters van hennen geïnfecteerd met *S. enteritidis* hadden hoge titers, terwijl alle sera van de andere groepen negatief werden bevonden.

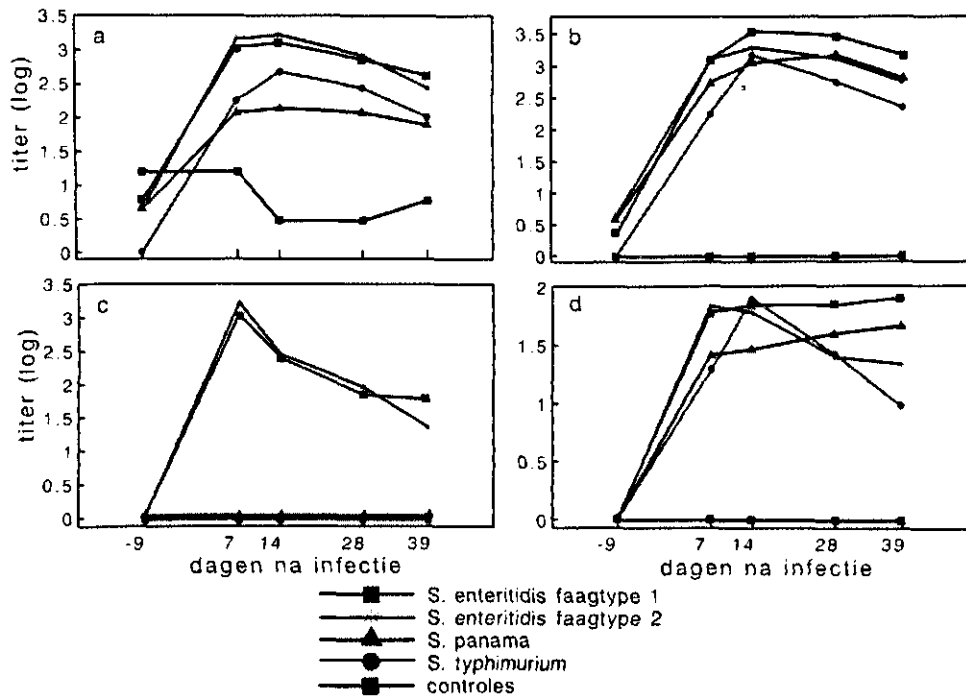
Uit de resultaten van de ELISAs met de sera van dieren van beide leeftijdsgroepen blijkt dat alleen de GM-DAS blocking ELISA specifiek *S. enteritidis*-geïnfecteerde dieren aantoonde. Aangezien een titerbepaling te bewerkelijk en te kostbaar is voor toepassing in de praktijk, werd op grond van de gegevens van experimenteel geïnfecteerde dieren besloten één verdunning (1:5) te testen; bij deze verdunning hadden alle sera van *S. enteritidis*-geïnfecteerde dieren een optische dichtheid van ≤ 0.6 bij 450nm, terwijl sera van alle andere dieren negatief scoorden (O.D. ca. 1.0-1.2); de GM-DAS blocking ELISA had dus een specificiteit en een gevoeligheid van beide 100%.

Uitstekende resultaten werden ook verkregen met eidooier getest in een verdunning van 1:5; vanaf 9-12 dagen na infectie werden vrijwel alle eieren van *S. enteritidis*-geïnfecteerde dieren positief bevonden, terwijl alle eieren van de overige groepen negatief scoorden. Op basis van deze resultaten werd besloten de GM-DAS blocking ELISA te gebruiken voor praktijksera en de resultaten te vergelijken met die van het conventionele bacteriologische onderzoek. Bovendien werden de sera ook getest in de indirecte ELISAs met flagelline en LPS.

Toetsing van de ELISAs met behulp van praktijksera

De GM-DAS blocking ELISA werd toegepast op ca. 6800 gepoolde serummonsters (elk van 6 kippen) afkomstig van ca. 1400 koppels. Gelijktijdig werd door de Gezondheidsdienst voor Pluimvee bacteriologisch onderzoek uitgevoerd. De ELISA bleek in staat om alle *S. enteritidis*-geïnfecteerde koppels aan te tonen; vals-positieve bevindingen

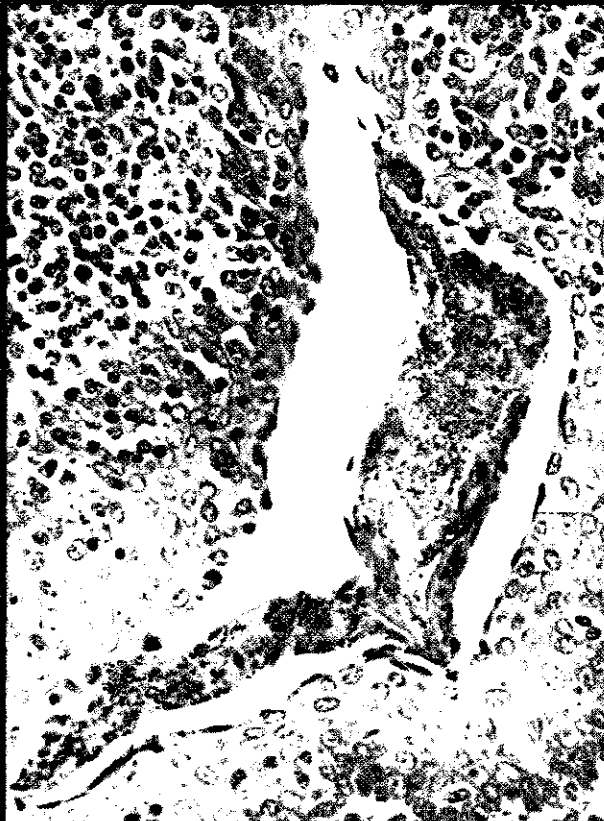
Figuur 3. Gemiddelde serumtiters per groep experimenteel geïnfecteerde leghennen in de ELISA met *S. enteritidis* flagelline (a), de indirecte ELISA met *S. enteritidis* LPS (b), de GM-DAS blocking ELISA (c) en de LPS-DAS blocking ELISA (d).



kwamen vrijwel niet voor. Met de beide indirecte ELISAs werden veel vals-positieve bevindingen verkregen. Ook een vervolgonderzoek, waarbij de GM-DAS blocking ELISA werd uitgevoerd op zowel het CDI-DLO als de Gezondheidsdienst voor Pluimvee gaf zeer goede resultaten te zien. Dit was voor de Gezondheidsdienst voor Pluimvee aanleiding om met ingang van 1 april 1992 het bacteriologisch onderzoek als screeningstechniek te vervangen door de GM-DAS blocking ELISA. Positieve bevindingen met deze test worden geverifieerd door uitgebreid bacteriologisch onderzoek van feces-monsters.

Aan dit onderzoek werkten verder mee: medewerkers van de afdeling Proefdiervoorziening en Biotechniek (PVB) H.P.A. Dorsman, J.W. Meyer, G. Visscher, J.A. van der Voort en A.M.L. van Zoelen en medewerkers van de Gezondheidsdienst voor Pluimvee, E. Goren, W.A. de Jong, D.R. Mekkes, W.J.M. Landman en T.S. de Vries.

***STREPTOCOCCUS SUI*S TYPE 2 INFECTIONS IN PIGS**
IDENTIFICATION OF PHENOTYPES ASSOCIATED WITH
VIRULENCE



URI VECHT

Streptococcus suis type 2 infecties bij varkens De identificatie van phenotypes en de relatie met virulentie

U. Vecht¹⁾

Proefschrift Universiteit Utrecht, 9 januari 1992

Medeauteurs c.q. projectmedewerkers waren: J. Anakotta²⁾, J.P. Arends³⁾, J.E. van Dijk⁴⁾, A.L.J. Gielkens⁵⁾, J. Haagsma¹⁾, M.L. Jellema¹⁾, L.A.M.G. van Leengoed⁴⁾, E.J. van der Molen¹⁴⁾, F.H. Reek⁵⁾, H.E. Smith⁵⁾, M.A. Smits⁵⁾, E.R.M. Verheijen¹⁾, H.J. Wisselink¹⁾

Streptococcus suis type 2 is een belangrijke verwekker van hersenvlies-ontsteking, gewrichtsontsteking en sterfte bij biggen rond de speenleeftijd. Deze infectieziekte is een probleem in Nederland en in vele andere landen met een intensieve varkenshouderij.

Doel van het S. suis onderzoek is de ontwikkeling van methodieken om de ziekte in het veld te bestrijden. Hierbij wordt gewerkt aan technieken om dragers van virulente stammen te identificeren, om zo te kunnen voorkomen dat de pathogenen door deze dieren op gevoelige jonge biggen overgebracht worden. Dit betekent een nieuwe benadering van bestrijding op basis van diagnostiek.

Taxonomie

De diagnose van de infectie wordt gecompliceerd door het feit dat *S. suis* voor een aantal kenmerken variabel is. Zo blijkt het biochemisch profiel meer variatie te vertonen dan oorspronkelijk werd verondersteld. Tevens werden in de laatste jaren nieuwe serotypen geïdentificeerd op basis van kapsel polysacchariden, hetgeen het totale aantal nu op 22 serotypes brengt (inmiddels 28). De betekenis van de meeste types als ziekteverwekker echter, is nog onduidelijk. Bovendien blijkt dat binnen het serotype 2 stammen voorkomen die onderling verschillen in virulentie voor varkens.

Meer dan 50% van de streptococci die in 1983 geïsoleerd waren uit gestorven

of afgemaakte varkens en voor diagnostisch onderzoek waren aangeboden aan diverse Gezondheidsdiensten voor Dieren, werd als *S. suis* geïdentificeerd. Behalve met meningitis, endocarditis en polyserositis konden *S. suis* infecties vaak ook in verband worden gebracht met bronchopneumonie. Omdat de biochemische profielen van *S. suis* en *S. subacidus* sterk overeenkwamen, werd voorgesteld om in plaats van de oude benaming *S. subacidus* de naam *S. suis* te gebruiken voor alle stammen met dit profiel, onafhankelijk van de eventuele serologische typering. Drie serologische technieken om *S. suis* te typeren werden vergeleken; van deze werden de gel-precipitatie techniek met Fullers extract en de voorwerpglas agglutinatie test als betrouwbare methodes aanbevolen.

1) CDI-DLO, Afdeling Bacteriologie

2) CDI-DLO, Afdeling Immunologie

3) Academisch Medisch Centrum, Amsterdam

4) CDI-DLO, Afdeling Bedrijfsdiergeneeskunde, Pathologie en Epidemiologie

5) CDI-DLO, Afdeling Moleculaire Biologie

Bedrijfsonderzoek

Omdat vanaf 1983 het aantal problemen veroorzaakt door *S. suis* type 2 op Nederlandse varkensbedrijven toenam, werd een veldstudie verricht. Hele tonsillen van slachtvarkens werden met behulp van een electief-selectief medium bacteriologisch onderzocht op het voorkomen van *S. suis* type 2. Percentages dragers op een probleembedrijf (45%) bleken niet significant te verschillen van het percentage dragers afkomstig van een normaal bedrijf (38%). Uit een longitudinaal onderzoek verricht op een probleembedrijf bleek, dat wanneer tonsilbiopten van jonge biggen gebruikt werden om het percentage dragers te meten dit minder vaak positief scoorde dan wanneer hele tonsillen van dezelfde dieren op slachtleefijd onderzocht werden. Daarnaast was tonsilbioptonderzoek verricht op 9-weken-oude biggen afkomstig van probleembedrijven, slechts in 27% van de gevallen positief. Dit percentage was zelfs lager dan dat van sommige bedrijven zonder problemen.

Virulentieverschillen binnen het species *S. suis* type 2 kunnen hieraan ten grondslag liggen.

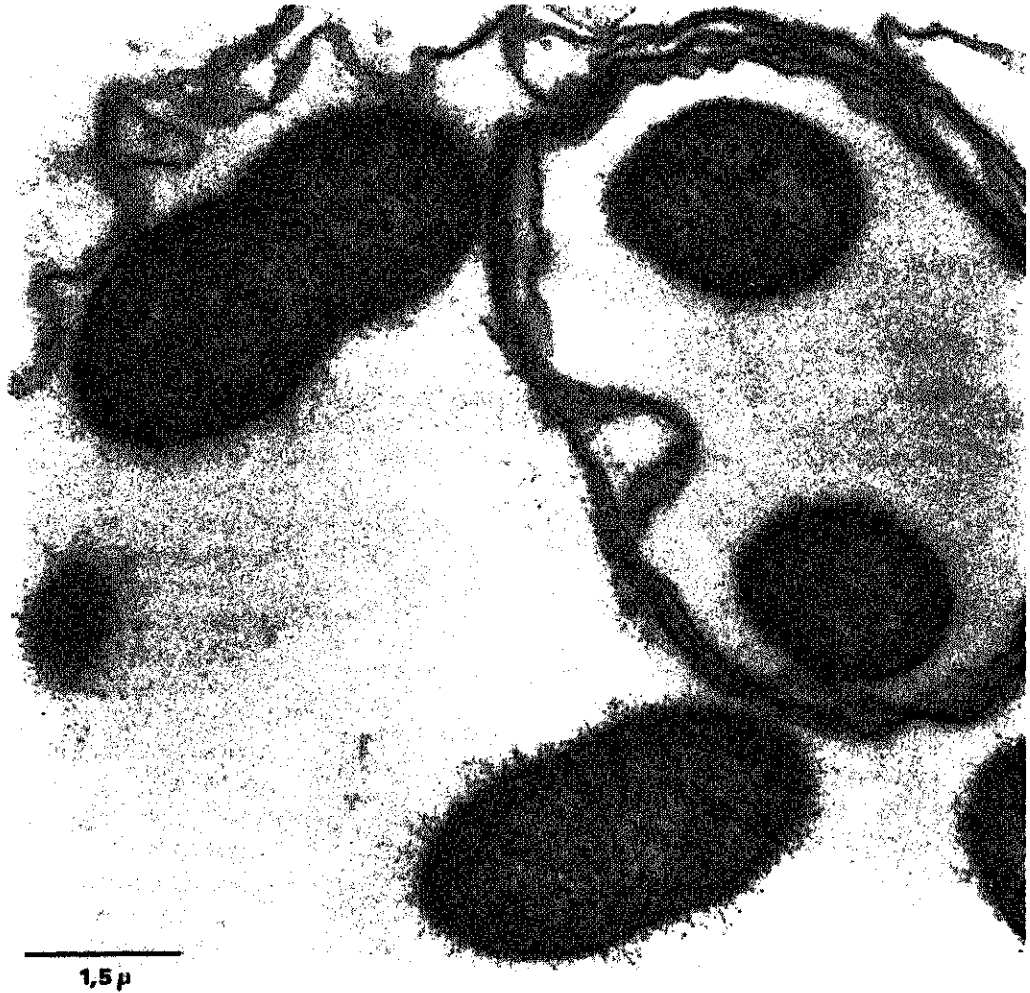
Virulentieverschillen

Om bacteriën *in vitro* naar virulentie te onderscheiden is het noodzakelijk virulentiefactoren of met virulentie gecorreleerde kenmerken te kennen. Om deze te identificeren werd met behulp van gel elektroferese en immunoblots het eiwitprofiel van diverse celfracties van 180 *S. suis* type 2 stammen, geïsoleerd uit een drietal bronnen, onderling vergeleken. De isolaten waren afkomstig uit organen van zieke varkens, uit tonsillen van normale slachtvarkens en uit humaan patiëntenmateriaal. De meeste isolaten (77%) uit zieke varkens bezaten twee eiwitten, die juist afwezig waren in de meeste isolaten (86%) uit de normale slachtvarkens. Eén van deze eiwitten was een eiwit met een molecuul-

gewicht van 136 kilodalton (kDa), dat MRP ('muramidase-released protein') werd genoemd. Dit eiwit werd waargenomen in het protoplasten supernatant en het cultuur supernatant. Een ander eiwit met een molecuulgewicht van 110 kDa werd enkel aangetroffen in het supernatant van gegroeide culturen en werd daarom EF ('Extracellular Factor') genoemd. Op basis van de aanwezigheid of afwezigheid van deze twee eiwitten in het cultuur supernatant konden drie phenotypes van *S. suis* type 2 worden onderscheiden, namelijk MRP^+EF^+ , MRP^+EF^- en MRP^-EF^- . De stammen geïsoleerd uit humane patiënten bleken meestal MRP^+EF^- (74%). Monoclonale antistoffen gericht tegen het 110-kDa EF herkenden in cultuur supernatant van alle stammen met het MRP^+EF^- phenotype eiwitten, die verwant waren aan EF, maar een hoger en variabel molecuulgewicht vertoonden. Vandaar dat het aanbeveling verdient het phenotype van dergelijke stammen voortaan als MRP^+EF^* te benoemen.

DAS-ELISAs

Teneinde het phenotype van *S. suis* type 2 stammen snel te kunnen bepalen werden twee 'double antibody-sandwich (DAS) enzyme-linked immunosorbent assays' (ELISAs) ontwikkeld. In deze ELISAs werd het cultuur supernatant van een goed gegroeide cultuur onderzocht op de aanwezigheid van MRP of EF als antigeen, terwijl monoclonale en polyclonale antistoffen gericht tegen eiwitten dienden als de 'antigen catching antibodies' en als conjugaat. De resultaten van de MRP- en EF-DAS ELISA waren nagenoeg identiek met die van de immunoblots. Gezien de grote verschillen in optische dichtheid tussen positieve en negatieve uitslagen konden de ELISAs ook visueel, zonder het gebruik van een spectrofotometer, afgelezen worden. Met de combinatie van de twee ELISAs kon goed onderscheid tussen de drie phenotypes van *S. suis* type 2 gemaakt worden, zonder vals positieve of vals negatieve uitslagen.



Transmissie electronen-
microscopische opname van
zich delende *Streptococcus suis*
type 2 bacteriën. De fimbriën
aan het oppervlak zijn duidelijk
zichtbaar. Foto: F. Wagenaar

Diermodel

Om virulentieverschillen *in vivo* te kunnen bestuderen werden dier-experimenten uitgevoerd met gnotobiont biggen. Dit experimentele infectiemodel maakt gebruik van kiemvrije biggen, die via een keizersnede in een steriele chirurgische isolator ter wereld werden gebracht. Vervolgens werden ze groepsgewijs in steriele isolatoren gehuisvest en colostrum-vrij gevoerd. In dit diermodel werden de kiemvrije biggen 5 dagen postpartum intranasaal geïnoculeerd met *Bordetella*

bronchiseptica hetgeen de dieren predisponeerde voor de infectie met *S. suis*, twee dagen later. In eerste instantie werden met dit model twee *S. suis* type 2 stammen vergeleken, namelijk stam D-282 (MRP positief) en T-15 (MRP negatief). Later werden met dit diermodel 10 stammen behorend tot een van de drie phenotypes vergeleken. Stammen met het MRP⁺EF⁺ phenotype induceerden specifieke en niet-specifieke klinische symptomen en leucocytose. Na sectie kon door middel van bacteriologisch en pathologisch onderzoek meningitis, polyserositis en polyarthritis

worden gediagnostiseerd. Stammen met het MRP⁺EF⁺ phenotype veroorzaakten enkel niet-specifieke klinische symptomen en geringe pathologische afwijkingen aan de serosae. Stammen met het MRP⁺EF⁻ phenotype gaven behalve pneumonie verder geen klinische, hematologische, of pathologische afwijkingen. Deze bevindingen geven aan dat het 110-kDa EF en in mindere mate het 136-kDa MRP geassocieerd kunnen worden met virulentie van *S. suis* type 2 voor biggen.

Moleculaire karakterisering van MRP, een eerste stap voor de PCR ontwikkeling

De conventionele bacteriologische technieken om met gebruik van tonsil-materiaal of neusswabs als monster dragers te detecteren zijn bewerkelijk en ongevoelig. Eerst wordt het monster geïnoculeerd op selectief-electief media en na incubatie worden stammen met een precipitatie ("halo"), dus verdacht als *S. suis* type 2, reïngekweekt op bloedplaten. Determinatie geschiedt vervolgens met biochemische en serologische technieken. Om ook naar phenotype te onderscheiden dient vervolgens het eiwitprofiel bepaald met gelelectroforese en immunoblots of, eenvoudiger, dienen de MRP- en EF-ELISAs op het supernatant van reïncultures te worden ingezet. Deze procedure vereist hoge aantallen streptococci in het uitgangsmateriaal voor een uitslag, vandaar dat meer gevoelige en specifieke testen noodzakelijk zijn om dragers te detecteren. Moderne moleculair biologische technieken zoals bijvoorbeeld de "polymerase chain reaction" (PCR) zouden hierin kunnen voorzien.

Voor dit doel, en om informatie te krijgen voor de mogelijke rol van MRP in de pathogenese werd het gen dat codeert voor MRP gecloneerd in *Escherichia coli*. Daartoe werd met behulp van de bacteriofaag λGEM-11 als vector een genenbank gemaakt met het genoom van stam D-282 (MRP⁺EF⁺).

De recombinante bacteriofagen werden geselecteerd met monoclonale antistoffen gericht tegen MRP. Van het *mrp* gen en de flankerende gebieden werd de volledige nucleotide sequentie bepaald. Van de afgeleide aminozuur sequentie codeerde het N-terminale gebied voor een signaal peptide (nodig voor eiwittransport over de celmembraan) terwijl het C-terminale gebied structurele overeenkomsten vertoonde met C-termini van een aantal celenvolop-geassocieerde eiwitten van andere Gram-positieve cocci, waarschijnlijk verantwoordelijk voor de verankering van het eiwit aan de celenvolop. MRP als rijp ("processed") eiwit heeft een lengte van 1.209 aminozuren en een berekend molecuulgewicht van 131.094. De volledige aminozuur sequentie bleek geen of weinig homologie te bezitten met eiwit sequenties aanwezig in de EMBL databank. Echter, een bepaald gebied van MRP vertoonde enige homologie met het fibronectine bindende eiwit van *Staphylococcus aureus*.

Het beschreven onderzoek maakt deel uit van lopend projectmatig onderzoek met als doel de ontwikkeling van bestrijdingsmethoden voor Streptococcus suis infecties in de praktijk.

Mycoplasma's in de luchtwegen van runderen

E.A. ter Laak¹⁾

Proefschrift Universiteit Utrecht, 3 december 1992

Medeauteurs waren: E. Boomsluiters¹⁾, J.M. Bové²⁾, P. Carle²⁾, R.P.J.W. Deltjes¹⁾, J.E. van Dijk¹⁾, J.H. Noordergraaf¹⁾, D.L. Rose³⁾, M.A. Smits⁴⁾, J.G. Tully³⁾, M.H. Verschure¹⁾, G.H. Wentink⁵⁾, G.M. Zimmer⁶⁾

Bij luchtwegaandoeningen van kalveren spelen vele agentia een rol. Met name diverse virus- en bacteriesoorten worden als etiologisch agens aangemerkt naast klimaat- en huisvestingsfactoren. Het proefschrift behandelt het voorkomen en de betekenis van mycoplasma's bij luchtwegaandoeningen van kalveren in Nederland. Het onderzoek werd uitgevoerd, omdat hierover in Nederland vrijwel niets bekend was.

Algemene kenmerken van mycoplasma's

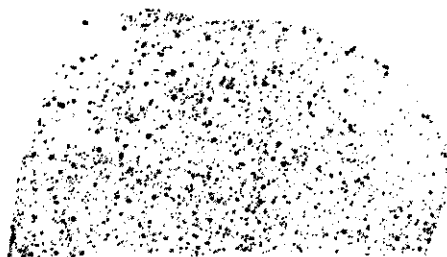
Mycoplasma's zijn de kleinste vrij levende organismen ter wereld met een maximum breedte van 200-300 nm. Ze vormen op vaste voedingsmedia kleine kolonies die bij de meeste soorten de vorm van een spiegelei hebben. Alhoewel men aanneemt dat mycoplasma's evolutionair zijn ontstaan uit grampositieve bacteriën, vormen ze genotypisch een heterogene groep. Tijdens hun evolutie is de celwand verloren gegaan en werd het genoom kleiner. Dit verklaart de hoge eisen die mycoplasma's aan voedingsmedia stellen en hun gastheer-afhankelijkheid.

Mycoplasma's zijn meestal gastheerspecifiek en vaak ook orgaanspecifiek. Men vermoedt dat mycoplasma's tot de soortenrijkste groep organismen behoren. Bij de mens, zoogdieren en vogels leven mycoplasma's op en in de slijmvliezen. Er worden commensale en parasitaire soorten onderscheiden. Het rund is de primaire gastheer van ongeveer 19 soorten.

Identificatie van mycoplasma's

Mycoplasma dispar

Een indirecte immunoperoxidase test is beschreven voor een gemakkelijke en betrouwbare identificatie van *M. dispar* (Figuur 1). Deze soort vormt bij primaire isolatie geen kolonies met de vorm van een spiegelei; slechts een deel van de stammen vormt na herhaaldelijke passages *in vitro* deze typische vorm. Een normale identificatieprocedure door middel van een indirecte immunofluorescentie of immunoperoxidase test is bij veel stammen niet mogelijk, omdat de kolonies van de agar afspoelen. Kolonies



Figuur 1. In de immunoperoxidase-test gekleurde kolonies van *Mycoplasma dispar*, type strain 462/2, gegroeid op een nitrocellulose membraanfilter gedurende 4 dagen. De grootste kolonies hebben een diameter van 80 µm.

1) CDI-DLO, Afdeling Bacteriologie

2) Laboratoire de biologie cellulaire et moléculaire, Institut national de la recherche agronomique, Pont-de-la-Maye, France

3) Mycoplasma Section, Laboratory of molecular microbiology, National institute of allergy and infectious diseases, Frederick cancer research facility, Frederick, Maryland, USA

4) CDI-DLO, Afdeling Moleculaire Biologie

5) Vakgroep Inwendige ziekten en voeding der grote huisdieren, Faculteit Diergeneeskunde Utrecht

6) Gezondheidsdienst voor Dieren, Bostel

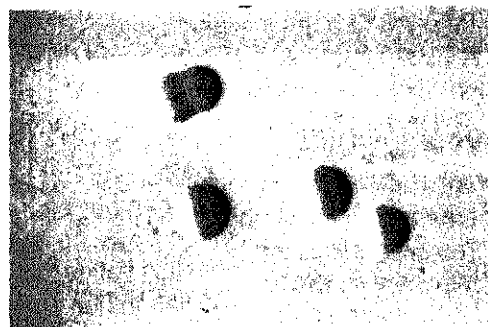
Mycoplasmas
of the
bovine respiratory tract

Ed A. ter Laak

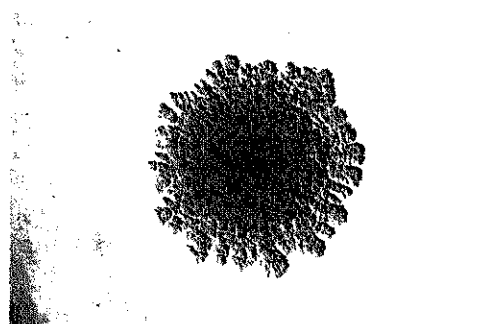
met de vorm van een spieglei groeien in de agar en kunnen niet weggespoeld worden. In tegenstelling tot andere mycoplasma soorten laten veel stammen van *M. dispar* zich niet in hun groei remmen door specifiek antiserum. Een groeiremmingstest als identificatiemethode is bij deze stammen dan ook niet mogelijk. Wanneer culturen van *M. dispar* werden gekweekt op nitrocellulose filters, werden kolonies gevormd die zich op de filters vasthechten en vervolgens konden worden geïdentificeerd door middel van een indirecte immunoperoxidase test. Deze methode bespaarde kosten en tijd.

Mycoplasma canis

Vervolgens is de isolatie, karakterisering en het voorkomen van *M. canis* als onderdeel van de mycoplasmaflora van de luchtwegen van kalveren beschreven. Het voorkomen van deze soort, die normaliter bij honden voorkomt, was bij runderen niet eerder beschreven. Stam C3b (Figuur 2, 3 en 4) werd in Nederland geïsoleerd uit een ontstoken kalverlong.

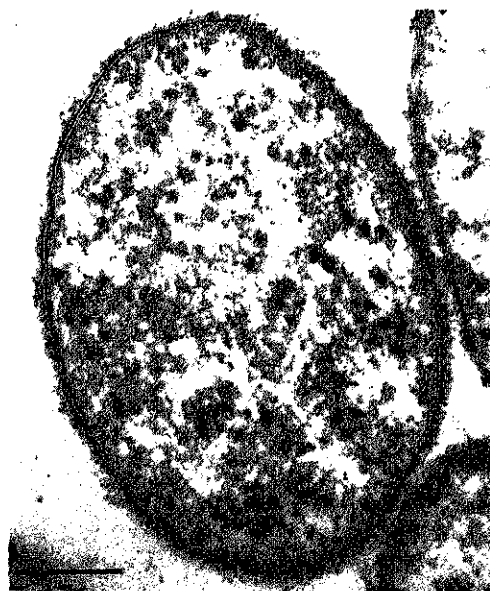


Figuur 2. Kolonies van stam C3b op 'modified Edward agar' na 2 dagen bebroeding bij 37 °C in een atmosfeer van 5% CO₂ in lucht. De diameter van de kolonies bedraagt 420 µm.

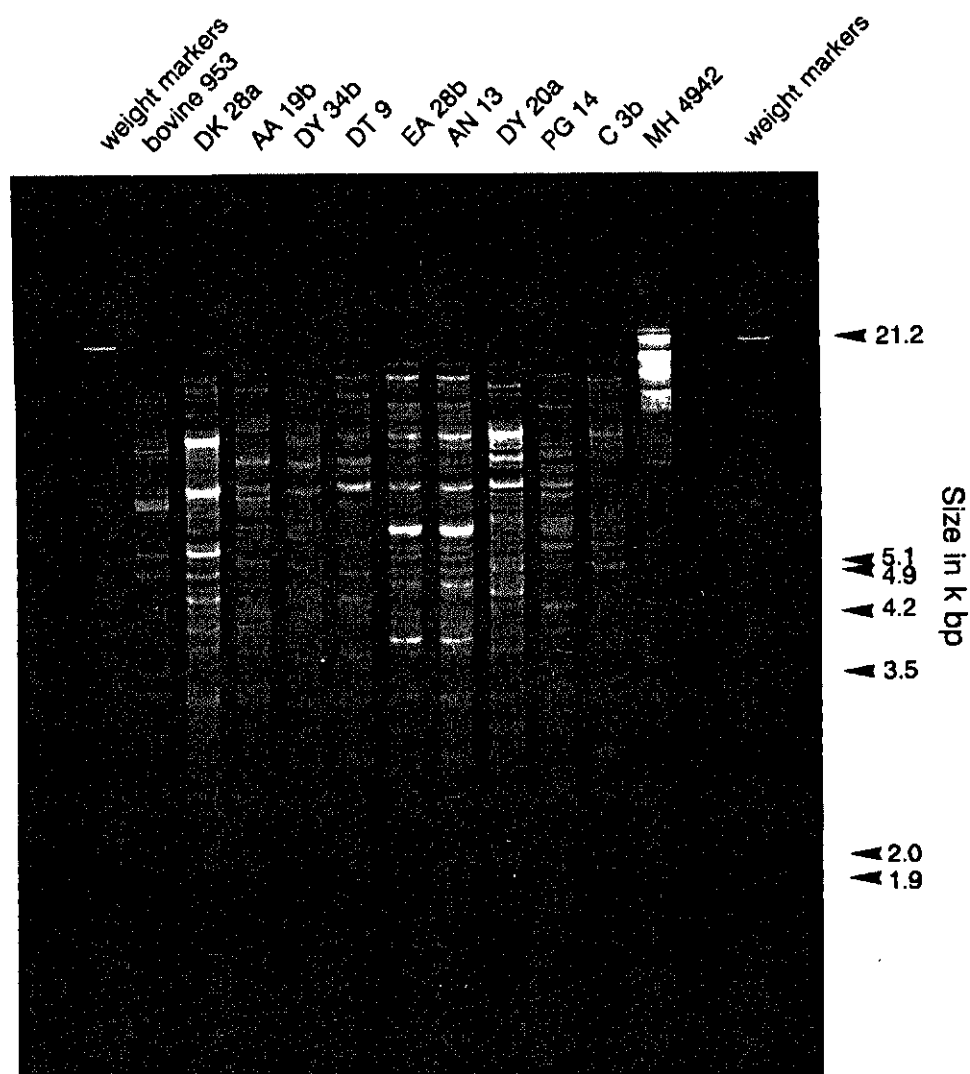


Figuur 3. Kolonie van stam C3b op 'modified Edward agar' na 10 dagen bebroeding bij 37 °C in een atmosfeer van 5% CO₂ in lucht. De diameter van de kolonie bedraagt 1380 µm.

Figuur 4. (rechtsboven) Transmissie EM opname van stam C3b. Het preparaat is gekleurd met 1% uranyl acetaat en lood citraat. Bar = 100 nm.



Vervolgens werden 40 van dergelijke stammen geïsoleerd uit kalveren van 19 andere bedrijven in verschillende delen van Nederland. Acht stammen van acht verschillende bedrijven werden nader onderzocht. De stammen werden geïdentificeerd als een *Mycoplasma* soort, maar bleken niet verwant te zijn aan bekende *Mycoplasma* soorten van runderen. De stammen stelden relatief weinig eisen aan voedingsmedia en groeiden snel in 'modified Edward media' zonder voorkeur voor een bepaalde atmosfeer. Resultaten van tests om te bepalen of de organismen glucose afbraken waren onbeslist. In een serologische vergelijking met de 'type strains' van 86 eerder beschreven *Mycoplasma* soorten, 12 eerder beschreven *Acholeplasma* soorten, 13 nog niet beschreven, vermoedelijke *Mycoplasma* soorten, en 10 nog niet beschreven, vermoedelijke *Acholeplasma* soorten bleek stam C3b verwant te zijn aan *M. canis*. Alhoewel stam C3b en verwante stammen enigszins verschilden van *M. canis* stammen, geïsoleerd uit honden, in groeiremmingstests, in het G+C gehalte van het DNA (Figuur 5), en in glucose metabolisme tests, werd geconcludeerd dat stam C3b en verwante stammen geclassificeerd dienen te worden als *M. canis*. Een nauw contact tussen kalveren en honden werd op diverse bedrijven van herkomst van de stammen vastgesteld.



Figuur 5. DNA restrictie endonuclease patronen van stam C3b en overeenkomstige stammen, geïsoleerd uit kalveren, en *M. canis* stammen, geïsoleerd uit honden, na digestie met *EcoRI*.

Voorkomen van mycoplasma's in de luchtwegen van runderen in Nederland

Mycoplasma bovis

Na een kort overzicht van de epidemiologie, therapie en preventie van *M. bovis* infecties is de toename sinds 1975 van *M. bovis* in Nederland beschreven. *M. bovis* is een verwekker van mastitis bij melkrunderen, van luchtwegaandoeningen bij kalveren en van arthritis bij runderen van elke leeftijd. Deze soort heeft zich in de afgelopen tientallen jaren wereldwijd verspreid. Nadat in 1976 de eerste mastitis uitbraak veroorzaakt door *M. bovis* in Nederland werd vastgesteld,

zijn nog eens 14 uitbraken door *M. bovis* vastgesteld. Het aantal aangetaste runderen per bedrijf lag tussen 1 en 16, en de klinische verschijnselen van mastitis varieerden van mild tot ernstig. Op alle bedrijven met *M. bovis* mastitis werd de infectie uitgeroeid. Tot juli 1991 werden in Nederland gevallen van arthritis veroorzaakt door *M. bovis* vastgesteld op in totaal 12 bedrijven. In een studie van kalveren met luchtwegaandoeningen tussen 1982 en 1986 werd *M. bovis* uitsluitend geïsoleerd uit de luchtwegen van mestkalveren, maar niet uit die van fokkalveren op melkveebedrijven. De infectie was mogelijk veroorzaakt door import van besmet vleesvee uit het buitenland en werd in stand gehouden door de voortdurende aanwezigheid van

met *M. bovis* besmette runderen op mestveebedrijven. Bij fokkalveren met luchtwegaandoeningen op melkveebedrijven werd *M. bovis* pas sinds 1986 aangetoond. Tussen 1986 en 1991 werden monsters van de luchtwegen (voornamelijk longspoelsels en longweefsel), en hieruit geïsoleerde mycoplasmaculturen, afkomstig van kalveren met luchtwegaandoeningen afkomstig van 83 bedrijven, op *M. bovis* onderzocht. *M. bovis* werd geïsoleerd uit monsters van 59 bedrijven; hiervan was 20% een melkveebedrijf en 80% een mestveebedrijf. De etiologie van luchtwegaandoeningen bij kalveren in Nederland is met de introductie van *M. bovis* nog gecompliceerder geworden. Omdat *M. bovis* grote economische schade kan veroorzaken op bedrijven met intensieve rundveehouderij, werd aanbevolen om aangekocht mestvee te scheiden van melkvee om een verdere verspreiding van *M. bovis* te voorkomen.

Andere soorten

Vervolgens is dieper ingegaan op het voorkomen van diverse soorten mycoplasma's bij kalveren met luchtwegaandoeningen in Nederland. In totaal werden 148 kalveren afkomstig van 25 bedrijven onderzocht. De isolatie- en typeringsmethodieken werden beschreven. Vier typen voedingsbodems werden gebruikt om mycoplasma's te isoleren: modified Edward agar medium, twee typen Friis medium, en 'A7B differential agar medium'. Mycoplasma's werden geïsoleerd uit zowel neusuitstrijkjes en longspoelsels die verzameld waren van levende kalveren als van monsters neusslijmvlies en longweefsel die post mortem verzameld waren. Elk mycoplasma isolaat werd geïdentificeerd als één van de volgende soorten:

Ureaplasma diversum (geïsoleerd van 80% van 25 bedrijven), *M. dispar* (92%), *M. bovirhinis* (88%), *M. bovis* (20%), *M. bovigenitalium* (4%), *M. arginini* (16%) of *M. canis* (12%). Uit longspoelsels werden aanmerkelijk vaker en in grotere aantallen *M. dispar* en *U. diversum* geïsoleerd dan uit neusuitstrijkjes. Uit de

luchtwegen van 75% van de onderzochte kalveren werden tenminste twee mycoplasma soorten geïsoleerd. In totaal werden 25 verschillende combinaties van mycoplasma soorten vastgesteld in neus- en longmonsters. De pathogene soorten *U. diversum* en *M. dispar* waren niet eerder geïsoleerd in Nederland.

Vergelijking van de mycoplasmaflora van zieke en gezonde kalveren en koeien

Tenslotte werd de mycoplasmaflora in de neus van gezonde kalveren en koeien onderzocht. De aanleiding hiertoe was tweërlei. Enerzijds is het voorkomen van mycoplasma soorten die aanwezig zijn bij kalveren met luchtwegaandoeningen weinig onderzocht bij oudere runderen. Deze gegevens zijn belangrijk voor de epidemiologie van deze infecties. De tweede reden was om na te gaan in hoeverre mycoplasma soorten die een andere primaire gastheer dan het rund hebben, bij runderen voorkomen. De mycoplasmaflora in de neus van 270 gezonde koeien afkomstig van 27 bedrijven in Nederland en 35 gezonde kalveren van 7 van deze bedrijven werd onderzocht. Diverse isolatiemethoden werden eveneens met elkaar vergeleken. Het voorkomen van de verschillende soorten in kalveren en koeien is in onderstaande tabel aangegeven. Het neusslijmvlies van gezonde kalveren bleek minder vaak gekoloniseerd te zijn door de pathogene soort *U. diversum* en het kiemgetal van *U. diversum* en *M. dispar* was lager dan in de neus van kalveren met luchtwegaandoeningen. *M. dispar* en *U. diversum* werden niet geïsoleerd uit neusuitstrijkjes van koeien. Deze gegevens suggereren dat deze soorten mycoplasma's die bij kalveren met luchtwegaandoeningen zo talrijk aanwezig zijn, alleen in deze leeftijds-categorie circuleren en na verloop van tijd waarschijnlijk in aantal afnemen. Dit is een belangrijk gegeven bij de bestrijding of preventie van deze soorten mycoplasma's.

Tabel 1 Het voorkomen van de verschillende soorten in kalveren en koeien

	Percentage besmette kalveren (n=35)	Percentage besmette koeien (n=270)
<i>U. diversum</i>	9	0
<i>M. dispar</i>	40	0
<i>M. bovis</i>	3	0
<i>M. bovirhinis</i>	66	6
<i>M. bovoculi</i>	23	20
<i>M. canis</i>	3	0
<i>M. equirhinis</i>	0	1
<i>M. conjunctivae</i>	0	1
<i>A. laidlawii</i>	3	1
<i>A. axanthum</i>	0	3

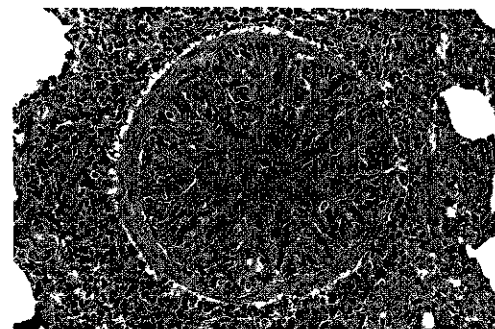
Paarden waren aanwezig op de twee bedrijven waar *M. equirhinis*, een *Mycoplasma* soort van paarden, werd geïsoleerd uit koeien. Op het bedrijf waar *M. conjunctivae*, een *Mycoplasma* soort van schapen en geiten, werd geïsoleerd uit koeien, dateerde het laatste contact tussen de koeien en schapen van een half jaar geleden. Op het bedrijf waar uit een kalf *M. canis* was geïsoleerd, verbleven geen honden. *Acholeplasma axanthum*, *A. laidlawii* en *M. bovoculi*, die een rol speelt bij houw (infectieuze bovine keratoconjunctivitis), werden in de bovenvermelde studie van kalveren met luchtwegaandoeningen niet geïsoleerd. Er werd geconcludeerd dat de mycoplasmaflora van gezonde koeien een andere samenstelling heeft dan die van kalveren met of zonder luchtwegaandoeningen en voorts dat koeien slechts een ondergeschikte rol spelen in de epidemiologie van pathogene *mycoplasma* soorten van kalveren in Nederland.

Experimentele infecties

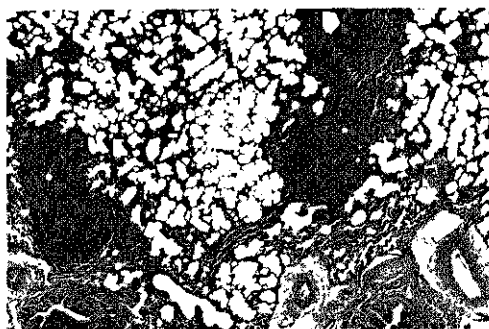
De pathologische veranderingen na experimentele infectie van de longen van 'specific-pathogen-free' kalveren met een Nederlandse stam (BK17) van *U. diversum* en een Nederlandse stam (C3b) van *M. canis* werden met elkaar vergeleken. Van *U. diversum* zijn

wereldwijd slechts twee infectieproeven beschreven. De resultaten van beide proeven spreken elkaar tegen over de betekenis van *U. diversum* als verwekker van luchtwegaandoeningen bij kalveren. Om de pathogene rol van *U. diversum* in kalveren met luchtwegaandoeningen te bevestigen, werd een cultuur van deze soort intranasaal toegediend als een fijne spray in een dosering van 10^7 kleur-veranderende eenheden of endobronchiaal in een dosering van 10^{10} kleur-veranderende eenheden in kalveren die per keizersnede waren geboren en geen colostrum hadden gekregen. Klinische verschijnselen van een luchtwegaandoening werden niet waargenomen, maar in de kalveren die de cultuur endobronchiaal kregen toegediend waren dikke manchetten van lymfocyten en macrofagen rond de bronchi, bronchioli en bloedvaten waarneembaar en had zich bovendien een lobulaire catarrhale longontsteking ontwikkeld (Figuur 6 en 7).

Figuur 6. (rechts) Longweefsel van een kalf, twee dagen na endobronchiale toediening van *U. diversum*. De kleine peribronchiale manchet bestaat uit lymfoïde cellen en macrofagen en wordt omgeven door peribronchiale interstitiële pneumonie. Het lumen van de bronchiolus bevat exsudaat; het epitheel is hyperplastisch en hypertrofisch. HE-kleuring, 125x.

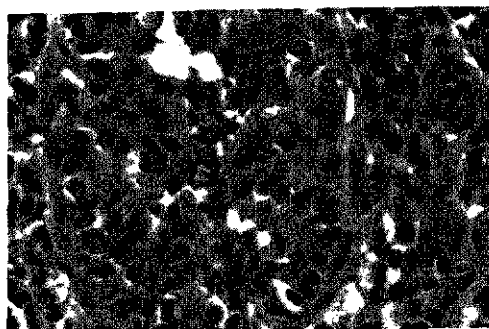


Figuur 7. Longweefsel van een kalf, acht dagen na endobronchiale toediening van *U. diversum*. Peribronchiale manchetten en interstitiële pneumonie; gedeeltelijke atelectasis. HE-kleuring, 60x.



Er werd geconcludeerd dat de pathogeniteit van *U. diversum* aangetoond kan worden na endobronchiale-, maar niet na intranasale toediening.

In een ander experiment werd een cultuur van *M. canis* endobronchiaal toegediend in een dosering van 2×10^{10} kolonie-vormende eenheden in soortgelijke kalveren. Zoals hiervoor werd vermeld, was deze soort vaak geïsoleerd uit de luchtwegen van kalveren in Nederland. Klinische verschijnselen van een luchtwegaandoening werden niet waargenomen. Op dag 2 na de toediening werden slechts geringe pathologische verschijnselen van een luchtwegaandoening aangetoond die op dag 9 waren verdwenen (Figuur 8). *M. canis* kon uit de longen niet worden teruggeïsoleerd zodat een duidelijke rol van *M. canis* bij luchtwegaandoeningen bij kalveren niet was aan te tonen. Door de resultaten van de diverse experimenten onderling te vergelijken werd geconcludeerd dat dunne manchetten van lymfocyten en macrofagen in de longen weliswaar een aanwijzing zijn voor mycoplasma-infecties, maar dat deze niet noodzakelijkerwijs pathognomonisch hoeven te zijn.



Figuur 8. Longweefsel van kalf, twee dagen na endobronchiale toediening van *M. canis*. De bronchiolus bevat exsudaat in het lumen en is omgeven door een smalle zone van lymfocyten en macrofagen. Het epitheel van de bronchiolus is niet hypertrofisch. HE-kleuring, 400x.

Gevoeligheid voor antibiotica

De *in vitro* gevoeligheid van *M. bovis*, *M. dispar* en *U. diversum* stammen voor antimicrobiële middelen werd bepaald. De minimaal remmende concentraties (MRCs) van 16 antimicrobiële middelen voor 16 veldstammen en de type strain van *M. bovis*, 19 veldstammen en de type strain van *M. dispar*, en 17 veldstammen van *U. diversum* werden bepaald in een verdunningsreeks van de antimicrobiële middelen in vloeibare voedingsmedia. De tests werden op verschillende tijdstippen afgelezen, maar de eind-MRCs voor *M. bovis* en *M. dispar* werden na 7 dagen afgelezen en de eind-MRCs voor *U. diversum* na 1 tot 2 dagen. De meeste stammen van de drie soorten waren gevoelig voor tylosine, kitasamycine en tiamuline, maar resistent tegen nifuroquine en streptomycine. De meeste stammen van *U. diversum* waren slechts intermediair gevoelig voor oxytetracycline, maar volledig gevoelig voor chloortetracycline. De meeste stammen van *M. bovis* en *M. dispar* waren resistent tegen beide middelen. De meeste stammen van *M. dispar* en *U. diversum* waren gevoelig voor doxycycline en minocycline, maar stammen van *M. bovis* waren intermediair gevoelig. Gevoeligheid voor of resistentie tegen chlooramphenicol, spiramycine, spectinomycine, lincomycine of enrofloxacin verschilde per soort mycoplasma. De type strains van *M. bovis* en *M. dispar* waren gevoeliger voor diverse antimicrobiële middelen, waaronder de tetracyclines, dan de veldstammen; dit zou erop kunnen wijzen dat veldstammen van *M. bovis* en *M. dispar* resistent worden. Van de geteste antimicrobiële middelen bleek dat tylosine, kitasamycine en tiamuline geschikter waren dan oxytetracycline en chloortetracycline voor de behandeling van mycoplasma-infecties bij longontstekingen van kalveren. De gevoeligheid van de onderzochte stammen voor een aantal veelgebruikte antimicrobiële middelen verklaart de werking van deze middelen, vooral wanneer géén bacteriën werden geïsoleerd.

Pathogene betekenis van mycoplasma's, mogelijkheden van preventie en bestrijding en toekomstig onderzoek

Afhankelijk van de soort mycoplasma kunnen mycoplasma's zelfstandig of samen met andere microorganismen of factoren ziekte veroorzaken. Dit laatste is voor diverse mycoplasma soorten bij diverse gastheersoorten aangetoond. Van de vier mycoplasma soorten die bij kalveren met luchtwegaandoeningen in Nederland talrijk voorkomen is *M. bovis* de enige mycoplasma soort die zelfstandig klinische luchtwegproblemen kan veroorzaken. *M. dispar* en *U. diversum* zijn eveneens pathogene organismen, alhoewel ze zelfstandig slechts subklinische ziekte kunnen veroorzaken. De pathogene werking van deze soorten mycoplasma's in samenhang met andere factoren is vooralsnog onbekend en verdient meer aandacht. De stelling werd geponeerd dat ogenschijnlijk apathogene soorten als *M.*

bovirhinis en *M. canis* mogelijk bijdragen aan luchtwegaandoeningen. Verbetering van klimaat en huisvesting op kalverbedrijven, een minder intensieve vorm van veehouderij met toepassing van het all-in/all-out systeem, veehouderij onder "specific-pathogen-free" condities, toepassing van antibiotica en vaccinatie zijn mogelijkheden van preventie en bestrijding van luchtwegaandoeningen in het algemeen bij jongvee en ten dele ook van mycoplasma-infecties bij dergelijke aandoeningen.

De resultaten van het onderzoek tonen aan dat mycoplasma's een belangrijke rol spelen bij luchtwegaandoeningen van kalveren in Nederland en dat daarom mycoplasma's meer aandacht verdienen bij toekomstig onderzoek van deze ziekte. Naast een periodieke screening van de antibioticumgevoeligheid zal dit onderzoek zich dienen te richten op de pathogenese van mycoplasma-infecties, snellere methoden voor de detectie van antigenen en antistoffen en ontwikkeling van moderne vaccins.



Jaarverslag 1992 Algemeen

cdi-dlo



De CDI-DLO vestiging
Edelhertweg bestond in 1992
tien jaar.



Bestuur

STICHTING CENTRAAL DIERGENEESKUNDIG INSTITUUT

Het bestuur van de Stichting Centraal Diergeneeskundig Instituut bestond in 1992 uit:

J. DE VEER <i>voorzitter</i>	Landbouwschap
Dr. P.W. DE LEEUW <i>ondervoorzitter</i>	Stichting Gezondheidszorg voor Dieren
C.C.J.M. VAN DER MEIJIS <i>secretaris</i>	Ministerie van Landbouw, Natuurbeheer en Visserij

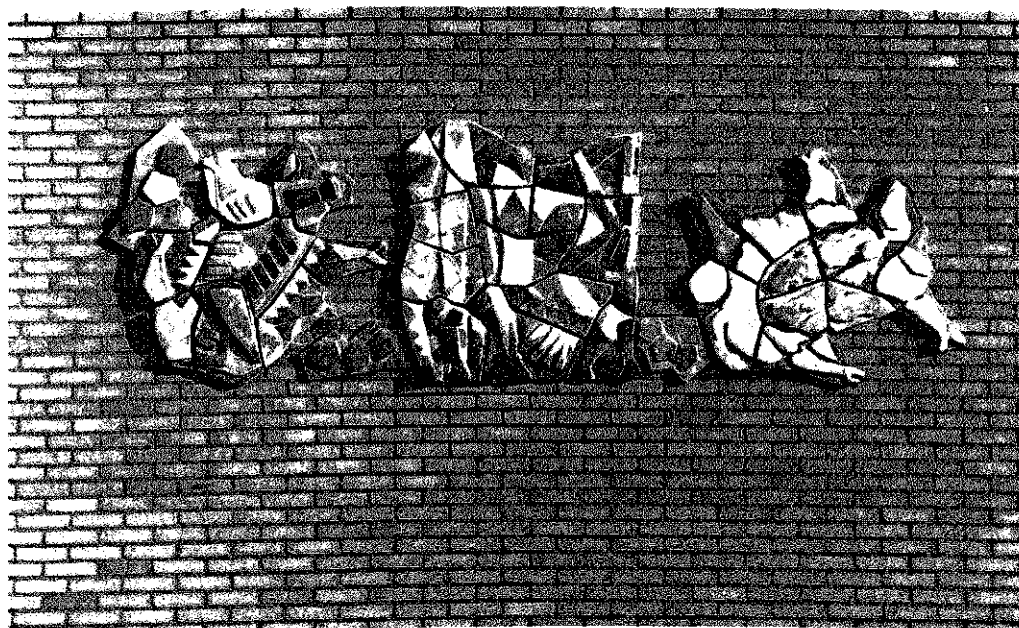
Bestuursleden:

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	Ministerie van Landbouw, Natuurbeheer en Visserij

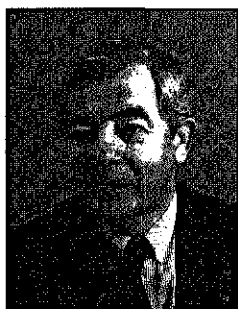
Kunstwerk van de Lelystadse kunstenaar R. Bosari op de gevel van het gebouw Houtribweg. Het symboliseert het virologisch onderzoek. Het werd onthuld op 8 oktober 1992 ter gelegenheid van het 20-jarig bestaan van het gebouw en de voltooide renovatie.



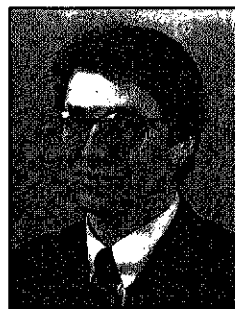
Directie en Staf

DLO-CENTRAAL DIERGENEESKUNDIG INSTITUUT (CDI-DLO)

Directie CDI-DLO



Prof. Dr. C.J.G. WENSING
Directeur



Dr. D. VAN ZAANE
Directeur onderzoek

Onder de directie ressorterende diensten en afdelingen:

Directiesecretaris



Mevr. R. VAN DER HONING-KOOPMANS

Rijkscontrole en Standaardisatie



Drs. H.H. LENSING
Hoofd

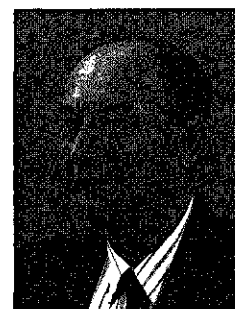
Wet. medew.: Dr. H.L. OEI, Dr. G.H.M. PRENEN
Mevr. Drs. I. SANDBERG, Drs. J.W. SEINHORST
Dr. J. WOLTJES

Veiligheid en Kwaliteitsbewaking



Drs. Ir. W.J.A.M. MEULEPAS

Stafbureau



Dr. H.J. OVER

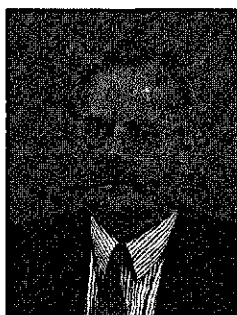
Onderzoekafdelingen

Aviaire Virologie en Tumorvirussen



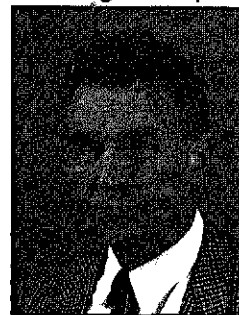
Dr. G. KOCH
Hoofd (waarnemend)
Wet. medew.:
Mevr. Dr. S.H.M. JEURISSEN

Bacteriologie



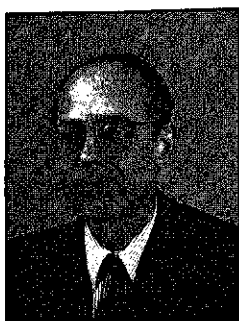
Dr. J. HAAGSMA
Hoofd
Wet. medew.:
Drs. Z. BERCOVICH
Mevr. Drs. E.M. KAMP
Dr. E.A. TER LAAK
Dr. A.J.M. OLYHOEK
Dr. U. VECHT
Drs. F.G. VAN ZIJDERVELD

Bedrijfsdiergeneeskunde, Pathologie en Epidemiologie



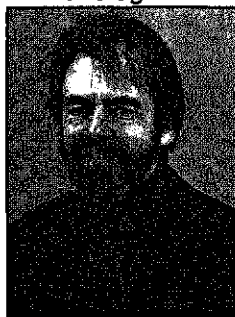
Dr. J.M. VAN LEEUWEN
Hoofd
Wet. medew.:
Dr. F.H.M. BORGSTEEDE
Dr. J.E. VAN DIJK
Mevr. Ir. O.L.M. HAENEN
Dr. Ir. M.C.M. DE JONG
Drs. L.J.M. VAN KEULEN
Dr. L.A.M.G. VAN LEENGOED
Drs. A. MOERMAN
Dr. M.J.A. NABUURS
Dr. J.M.A. POL
Drs. B.E.C. SCHREUDER

Immunologie



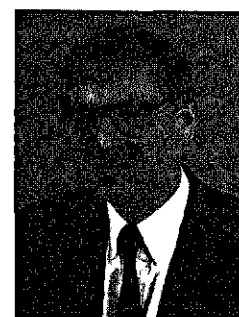
Drs. B.A. BOKHOUT
Hoofd
Wet. medew.:
Dr. A.T.J. BIANCHI
Dr. Ph.J. VAN DER HEIJDEN
Mevr. Dr. F.J. VAN MILLIGEN

Laboratorium Moleculaire Immunologie



Dr. R.H. MELOEN
Hoofd
Wet. medew.:
Dr. J.P.M. LANGEVELD
Mevr. Dr. H.B. OONK
Dr. Ir. W.M.M. SCHAAPER

Moleculaire Biologie



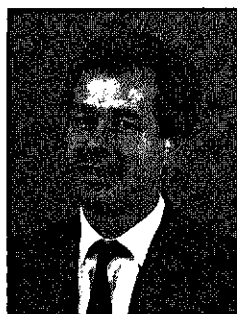
Dr. A.L.J. GIELKENS
Hoofd
Wet. medew.:
Mevr. Ir. E.W. VAN HEEMST
Dr. R.J.M. MOORMANN
Dr. B.H.P. PEETERS
Mevr. Dr. H. SMITH
Dr. M.A. SMITS

Mond- en klauwzeer Vaccin Bank



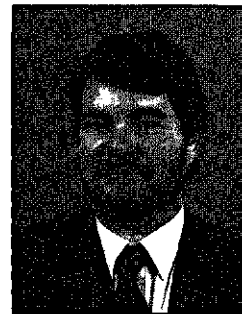
Drs. S.J. BARTELING
Hoofd
Wet. medew.:
Dr. H. VREESWIJK

Productie, Mediabereiding, Centrale Spoel en Sterilisatie



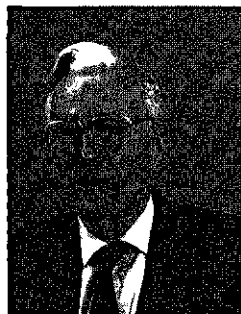
Dr. P. DOKTER
Hoofd
Wet. medew.:
Drs. G. WIERS

Virologie - Open Afdeling



Prof. Dr. J.Th. VAN OIRSCHOT
Hoofd
Wet. medew.:
Dr. J.A. KRAMPS
Drs. J.P.M. LANGEDIJK
Dr. F.A.M. RIJSEWIJK

Zoogdiervirologie



Dr. C. TERPSTRA
Hoofd
Wet. medew.:
Drs. A. DEKKER
Dr. T.G. KIMMAN
Dr. A.P.K.M.I. VAN NIEUWSTADT
Dr. G. WENSVOORT

Ondersteunende afdelingen

Automatische
Informatie
Verwerking



P. TAMBOER

Financiële,
Materiële en
Algemene Zaken



Mevr. E.E. MOL

Personeelszaken



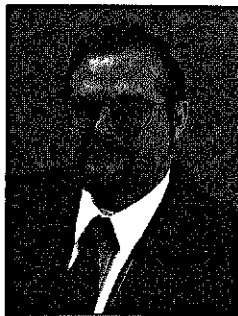
J.C. ANTONIDES

Proefdiervoorziening
en Biotechniek



Drs. P.S. KROON

Public Relations
en Informatie



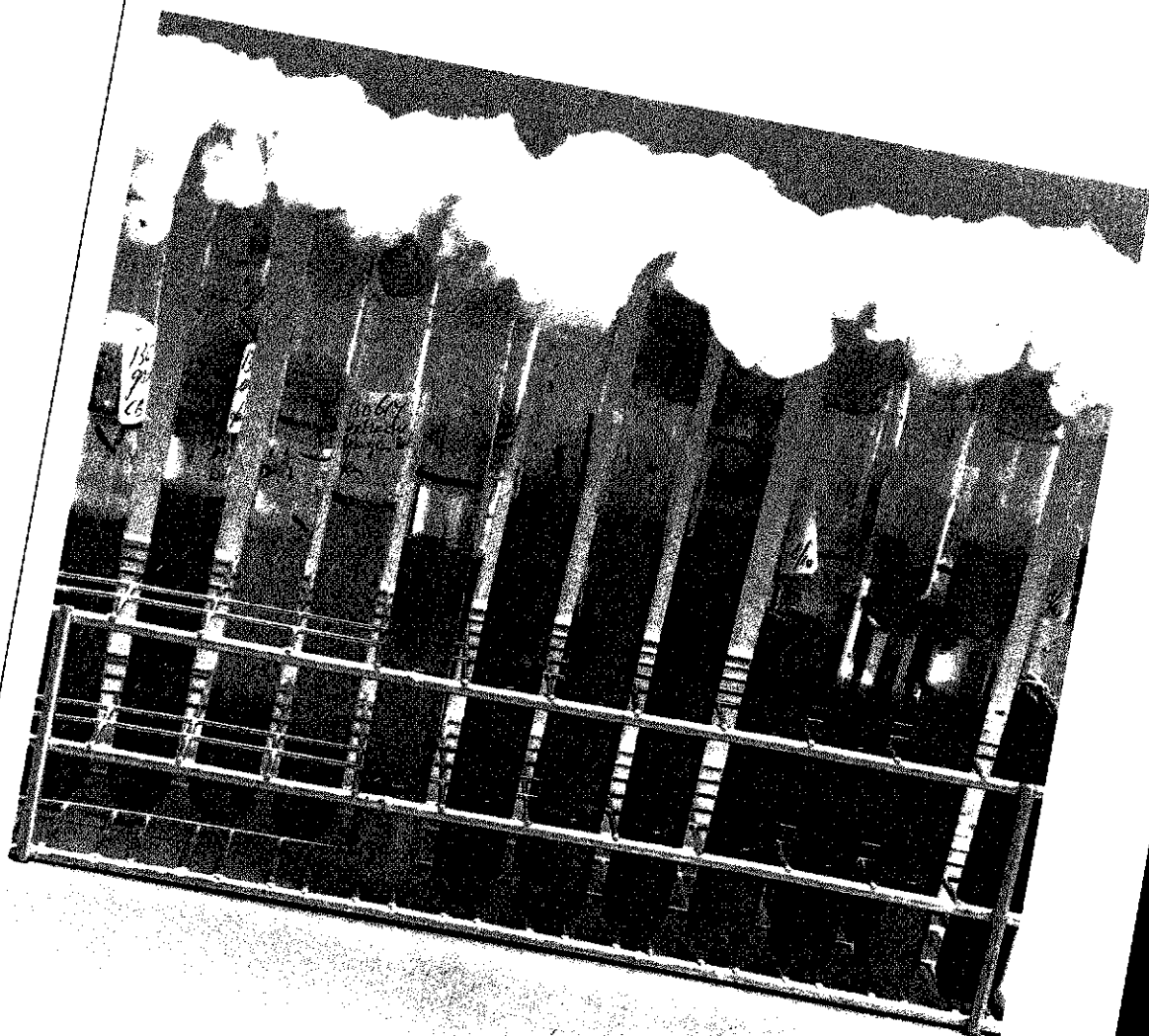
Drs. P.W. VAN OLM

Technische Dienst



F. VAN KEIMPEMA

Pro



Projectenlijst 1992

Titel projectleider, projectgroepleden (alfabetisch)	projectnummer
Diagnostiek en bijbehorend onderzoek van visziekten in verband met aquacultuur Haenen, Borgsteede, Ter Laak, Van Oirschot, Pol	01
Maagdarmziekten van het varken Nabuurs, Van Zijderveld	03
Infectieziekten en intoxicaties bij de wilde fauna Van Leeuwen, Baars, Borgsteede, Haagsma, Ter Laak	06
Reproductie-stoornissen, incl. endocrinologie Oonk, Baars, Van Keulen, Van Leeuwen, Meloen, Moerman, Nabuurs,	10
Veterinaire toxicologie in praktijksituaties Baars	12
Mycobacteriële infecties en sensitinen Van Zijderveld, Haagsma	14
Anaerobe infecties Vecht, Haagsma, Nabuurs,	16
Algemeen bacteriologisch en taxonomisch onderzoek ten behoeve van dierziekteproblemen Ter Laak, Witte	18
Mycoplasma-infecties Ter Laak	19
Actinobacillus-infecties varken Van Leeuwen, Cruysen, Kamp, Van Leengoed, Smits	20
Atrofische rhinitis bij het varken Kamp, Moerman, Smits	21
Gedragsfysiologie, ecologie en bestrijding van ziekteverwekkende arthropoden Thomas	22
Colibacillosis bij biggen Van Zijderveld, Nabuurs	23
Aetiologische, immunologische en epidemiologische aspecten van mastitis Vecht	24
Streptococcus suis type 2 infecties bij varkens Vecht, Smith, Smits	25
Overleving pathogenen in drijfmest Van Leeuwen, Borgsteede, de Jong, Moen, Moerman, Van Nieuwstadt, Van Zijderveld	28
Mucosaal immuunsysteem van het varken Bianchi, Bokhout, Van der Heijden, Van Zijderveld	29
Brucellose Bercovich, Dokter, Haagsma, Ter Laak, Olijhoek, Smits	30

Leptospirose Olijhoek, Bercovich, Bokhout, Haagsma, Moerman ,Smits	31
Ontwikkeling van methoden voor antigeen-aanbieding Van der Heijden, Bokhout, Gielkens, Smits	34
Preventie en bestrijding van parasitaire ziekten bij landbouwhuisdieren Borgsteede	37
Uitvoering EG-taken mond- en klauwzeer (Community Coordinating Institute-taak) Barteling, Dekker, Terpstra, Vreeswijk	44
Productie van mond- en klauwzeerantigeen en -vaccins Barteling, Dekker, Terpstra, Vreeswijk	46
Mond- en klauwzeer vaccincontrole en epidemiologisch onderzoek Terpstra, Barteling, Dekker	47
Varkenspest en exotische virale dierziekten Terpstra, Moormann, Wensvoort	49
Virusinfecties bij paarden Dekker, Gielkens, Terpstra	53
Ziekte van Aujeszky Kimmman, Bianchi, Gielkens, Jacobs, De Jong, Moormann, Van Oirschot, Peeters, Pol, Terpstra thema's: * Moleculaire biologie en vaccin-ontwikkeling * Diagnostiek, epidemiologie en bestrijding * Cellulaire immunologie * Pathogenese * Functionele rol van gl	54
Virale diarree bij varkens Terpstra, Nabuurs, Van Nieuwstadt,	55
Aviaire leukose Koch, Moormann	57
Ziekte van Marek Jeurissen, Pol	58
Enzoötische leukose bij het rund Van Oirschot	59
Infectieuze bronchitis Koch, Jeurissen	60
Mucosaal immuunsysteem van de kip Jeurissen, Koch, Vervelde	61
Rabiesdiagnostiek Van Oirschot, Haagsma, Kramps, Ter Laak, Schreuder, Van Zijderveld	68
Bovine virus diarree Van Oirschot, Moerman, Moormann, Terpstra, Wensvoort	70
Productie van virologische diagnostica en begeleiding van het gebruik Kramps, Van Oirschot,	71
Pathogenese en immunologie van RS-virusinfecties bij runderen Kramps, Van Oirschot,	72

Productie tuberculine Dokter, Haagsma, Wiers	73
* Productie overige biologische preparaten	
* Ontwikkeling en verbetering van veterinaire biologische producten en produktiemethoden	
Onderzoek kwaliteitsbewaking Wiers, Dokter,	76
* Routinematige kwaliteitscontrole van CDI-DLO-producten	
Immunopathologie en immunodiagnostiek van <i>Fasciola hepatica</i> infecties Vacature, Bokhout	78
Productie van SPF, MDF en kiemvrije proefdieren Kroon, Moerman	79
* Wet op de Dierproeven (Artikel 14)	
Rijkskwaliteitscontrole van immunobiologische diergeneesmiddelen Lensing, Oei, Woltjes	81
Ontwikkelings- en standaardisatie onderzoek m.b.t. de rijkskwaliteitscontrole van immunobiologische diergeneesmiddelen Lensing, Oei, Woltjes	82
Rijkskwaliteitscontrole van desinfectiemiddelen en insecticiden voor diergeneeskundig gebruik Lensing, Oei, Seinhorst, Woltjes	83
Rijkskwaliteitscontrole van farmaceutische diergeneesmiddelen Lensing, Prenen, Sandberg, Seinhorst	84
Advisering en ad hoc onderzoek t.a.v. ziekten bij herkauwers Van Oirschot	87
Advisering en ad hoc onderzoek t.a.v. ziekten bij varkens en paarden Terpstra	88
Advisering en ad hoc onderzoek t.a.v. ziekten bij pluimvee Koch	90
Bovine herpesvirussen Van Oirschot, Van den Burg, Van Engelenburg, Gielkens, Moerman, Moormann, Rijsewijk	91
Diagnostisch onderzoek van dieren, incl. im- en export-onderzoek Van Oirschot, Haagsma, Koch, Ter Laak, Terpstra, Witte	93
Veterinaire Ontwikkelingssamenwerking Schreuder, Over	99
Certificering diagnostisch onderzoek Meulepas	105
Infectieuze anaemie bij de kip Koch, Jeurissen	106
Bovine spongieuze encefalopathie (BSE) Schreuder, Belt, Van Keulen, Meloen, Smits	107
Lelystad agents Wensvoort, Meulenbergh, Moormann, De Jong, Pol, Terpstra	109
Synthetische peptiden en Endocrinologie Oonk, Beekman, Hage-van Noort, Langendijk, Meloen, Parohi, Schaaper	110

CDI-DLO binnen de Europese Netwerken

Onderzoek is in belangrijke mate gediend met internationale samenwerking. Dit uitgangspunt is de filosofie achter de samenwerkingsvormen die de EG in haar beleid hanteert en "met zilveren teugels" stuurt. Daarbij wordt onderscheid gemaakt tussen de opbouw van netwerken, waarin beoogt wordt op bepaalde kennis- en wetenschapsterreinen informatie-uitwisseling te stimuleren, de zogenaamde "concerted actions", en de gemeenschappelijke uitvoering van onderzoeksprojecten, die op "shared-cost" basis toepasbare kennis dienen te genereren. Concerted actions speciaal om de netwerken te structureren worden door de EG volgens het systeem van marginale kosten gefinancierd; in shared cost-projecten draagt de Commissie voor maximaal 50 % bij.

Over het laatste decennium is te constateren dat onderzoekprogramma's in toenemende mate door de EG centraal worden gecoördineerd. Daarin speelt het Directoraat-Generaal XII, Wetenschappen, Onderzoek en Ontwikkeling een grote rol. Vanzelfsprekend wordt de opzet van de specifieke programma's, evenals de beoordeling en honorering van de verschillende acties vanuit beleidsrelevantie, in belangrijke mate door de specifieke Directoraat-Generaal bepaald. Voor de programma's waarin CDI-DLO kan scoren is daarbij DG VI, Landbouw, van grote betekenis.

Over de periode 1991-1994 is het Derde Kaderprogramma geïnitieerd. Daarin zijn enkele specifieke programma's te onderkennen waarin CDI-DLO met projectvoorstellen heeft ingeschreven, namelijk in de twee ronden van het Landbouwonderzoek programma AAIR, in het Biotechnologieprogramma BIOTECH en in het Mobiliteitsprogramma HUMAN CAPITAL & MOBILITY. Daarbij kan onderscheid worden gemaakt tussen voorstellen die vanuit het instituut zijn gecoördineerd en die waarbij het CDI-DLO als projectdeelnemer fungeerde. De meeste projecten met CDI-DLO deelname in AAIR verkregen op wetenschappelijke kwaliteit in de weging door deskundigen een goede tot uitstekende score, maar werden in het licht van beleidsrelevantie niet geselecteerd voor contractonderhandelingen. Binnen dit programma is het instituut gehonoreerd door deelname in projecten betreffende:

- *serologie van bovine tuberculose;*
- *epidemiologie en bestrijding van PEARS (Porcine epidemic abortion respiratory syndrome - Lelystad virus);*
- *identificatie van natuurlijke attractantia bij vee voor vliegen;*
- *toepassing van antifungus proteïnen.*

In het BIOTECH programma scoorde CDI-DLO relatief hoog door deelname in projecten over:

- *toepassing van functionele antibody fragmenten;*
- *antigeen presentatie voor inductie T-cell gemedieerde immuunrespons;*
- *nieuwe vaccins voor orale en systemische immunisatie.*

In het programma HUMAN CAPITAL & MOBILITY werd één project met CDI-DLO deelname gehonoreerd namelijk:

- *moleculaire basis van rabies en herpesvirus neurotropisme.*

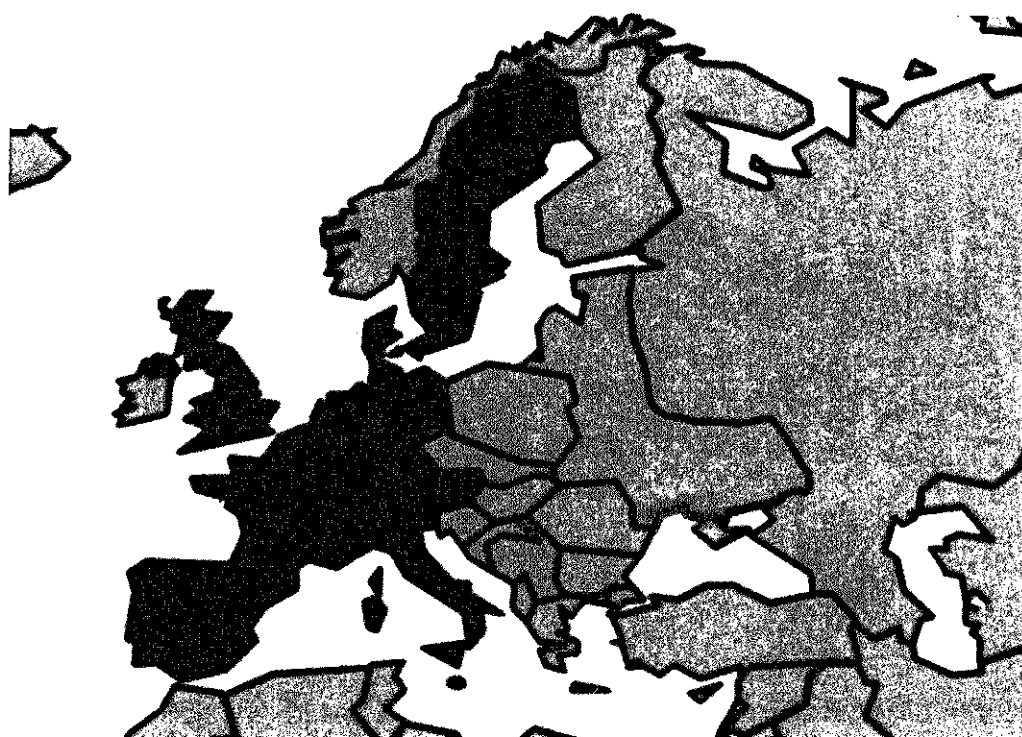
Hoewel op dit moment nog niet alle contract onderhandelingen betreffende deze projecten zijn afgerond kan worden geconcludeerd dat de EG-fondsen een substantieel onderdeel uitmaken van de inkomsten van CDI-DLO. De totale inkomsten uit bovengenoemde fondsen voor de komende 3 jaar bedragen 1.4 miljoen ECU.

Vooruitzichten

Teneinde als CDI-DLO in de voor de landbouw relevante onderdelen van toekomstige EG-onderzoekprogramma's nog beter te scoren dienen de Nederlandse prioriteiten in de onderzoekprogramma's verder afgestemd te worden op de EG prioriteiten. De anticipatie daarop, - het Vierde EG- Kaderprogramma wordt namelijk op dit moment voorbereid -, zal een toenemende aandacht van het instituut vragen.

Daarnaast is een bewuste partnerkeuze voor de deelname aan EG programma's van belang. De bilaterale initiatieven die genomen zijn tussen CDI-DLO en zusterinstituten binnen de EG spelen daarin een belangrijke rol, maar ook de contacten met de sector en de industrie dienen te worden verstevigd. Juist ten aanzien van de landbouweconomie leeft de verwachting dat onderzoeksresultaten hun weerslag moeten vinden in toepasbaarheid.

In onderstaande kaart is af te lezen dat EG-samenwerking tussen CDI-DLO en instituten met de meeste landen plaats vindt. Ook de contacten met Oost-Europese landen en de zogenaamde EFTA landen is groeiende. Beide elementen zullen in toekomstige EG- onderzoekprogramma's van betekenis worden.



Europese samenwerking in de afgelopen jaren.

Veterinaire ontwikkelingssamenwerking

De CDI-DLO activiteiten in het kader van veterinaire ontwikkelingssamenwerking omvatten onderzoek en ondersteunende activiteiten gericht op het verbeteren van een duurzame veehouderij in derde wereldlanden. De nadruk ligt op het verbeteren van de dierlijke gezondheidszorg ten behoeve van kleine veehouders. Voorbeelden van deze activiteiten in de afgelopen 10 jaar waren:

Diagnostiek, preventie en bestrijding van dierziekten

Mond-en-klauwzeer (MKZ): Turkije, Israël, Zuid-Amerika; Rift valley fever: Egypte; Brucellosis: Egypte; Tuberculosis: Tunesië, Saoedi Arabië; Tickborne disease: Oost Afrika; Ziekten bij grote herkauwers: Syrië, Lybië; Ziekten bij kleine herkauwers: Niger, Turkije; Exotische ziekten bij varkens: Mexico

Ontwikkeling en productie van vaccins and diagnostische reagentia

MKZ-vaccin, tuberculine, malleïne, diverse antigenen, conjugaten, monoclonale antilichamen en probes: voor verschillende landen

Infrastructurele voorzieningen

installatie en ondersteunen van diagnostische laboratoria: Benin, Turkije, Indonesië, Pakistan; installatie en ondersteunen van vaccin-productie laboratoria: Marokko, India, Egypte en Israël (high containment units); rehabilitatie van veterinaire voorzieningen: Afghanistan

Training en adviserende taken

verschillende landen

Toekomst

Momenteel wordt aan een meer gestructureerde aanpak gewerkt, waardoor de inzet in het kader van dit project zich zal beperken tot een samenwerkingsverband met een beperkt aantal instituten en tot een beperkt aantal werkgebieden.



Produkten CDI-DLO

Sera

Miltvuurserum voor herkauwer, varken

Vaccins

Mond- en klauwzeervaccins:

MKZ-vaccin voor herkauwer, trivalent type A, O en C

MKZ-vaccin voor varken, monovalent type O en C

Miltvuurvaccin voor paard, herkauwer, varken

Pseudomonas aeruginosa-vaccin voor nertsen

Para-t.b.c. - vaccin (experimenteel)

Para-t.b.c. - vaccin

Sensitinen

Bovine tuberculine

Aviaire tuberculine

Johnine

Malleïne

Reagentia voor diagnostiek

Antigenen

Brucella abortus ringtest-antigeen

Brucella abortus langzaam-antigeen

Campylobacter fetus-antigeen

Salmonella typhimurium en *S. dublin* H-antigeen

Leverbot, incl. controle serum

Longwormantigeen incl. controle serum

Porcine parvovirus-antigeen voor HI-test

Pl3V antigeen voor HI-test



Landen waar het CDI-DLO
in 1992 produkten aan
leverde.

BRS-Elisa BRSV antigeen
BVD-Elisa BVDV antigeen
PPV-Elisa PPV antigeen

Ingrediënten voor complementbindings-reacties

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

Conjugaten

Pl₃V-conjugaat
Porcine parvovirus-conjugaat
T.G.E.-conjugaat
BVD-Elisa HRPO-conjugaat
PPV-Elisa HRPO-conjugaat

Diagnostische sera

Ten behoeve van virologisch laboratorium-onderzoek
Testserum Dysenteria (Doyle)
Antiserum tegen A.P.P. typen

Diversen

Gedefibrineerd runderbloed (S.P.F.)
Geïnactiveerd normaal runderserum (S.P.F.)
Rundererythrocyten met kristalviolet (voor H.E.T.-medium)
Staphylococcen beta-toxine (voor H.E.T.-medium)
Mycobactine P/FE 2 mg/ml
Paardenserum voor Elisa buffer
BRS-Elisa antilichaam gecoate plaat
BVD-Elisa antilichaam gecoate plaat
PPV Elisa gecoate plaat
L. hardjo gecoate plaat
Runderplasma voor Clumpingtest
Anti-*S. suis* typen
Hisbloedplaten
Monoclonalen
CTB-Elisakits - varkenspest
Clostridium sporogenes cultuur
Bacillus subtilis cultuur
Staphylococcus aureus cultuur
Candida albicans cultuur
Serumbouillon buizen
Isosensitest Agarplaat
TSB plaat
SDA plaat
Violet red bile agar plaat
McConkey plaat
Desoxycholate citraat plaat
BGA plaat

Diagnostisch onderzoek CDI-DLO

Serologisch onderzoek

C.B.R.-testen en agglutinatie-testen
Serum neutralisatie-testen
Elisa testen
Immunodiffusie-test/Coggins-test
Brucellosis: Coombs-test
Mycoplasma agalactiae onderzoek
S. abortus equi serologie
Leptospira MAT ten behoeve van export
Pseudotuberculose serologie
Chlamydia serologie
Salmonella serologie
CAA serologie

Ten behoeve van Gezondheidsdiensten voor Dieren

Leptospira MAT
L. hardjo Elisa (melk en serum)

Overig onderzoek

Parasitair faecesonderzoek
Probang onderzoek MKZ
C.E.M. onderzoek
Sperma onderzoek IBR/BVD

Visziekten onderzoek ten behoeve van export/import

Virologisch onderzoek

IPN (Infectious pancreatic necrosis)
VHS (Viral haemorrhagic septicaemia)
IHN (Infectious haematopoietic necrosis)
SVC (Spring viraemia of carp)
PFR (Pike fry rhabdovirus)
CCV (Channel catfish virus)
Rhabdovirus algemeen
Verwekkers SBI (Swim bladder inflammation)

Bacteriologisch onderzoek

Edwardsiella species
Renibacterium salmoninarum
Yersinia species
Vibrio anguillarum, *Vibrio* species
Aeromonas salmonicida salm
Aeromonas salmonicida nova
Flexibacter species
Pseudomonas anguilliseptica
Pseudomonas species

Parasitologisch onderzoek

Myxosoma species
Verwekkers PKD
Bothriocephalus species
Anguillicola species

Algemeen

Klinische keuring partij vis

Visziekten diagnostiek

Sectie, incl. parasitologisch onderzoek

Bacteriologische onderzoek

Virologisch onderzoek

Histologisch onderzoek

Water-onderzoek

Kiemgetalbepaling

Vogelziekten onderzoek

Importvogels (sectie, bacteriologisch onderzoek, psittacosis)

Aanvullend onderzoek New Castle disease (NCD) virus

Psittacosis onderzoek

Botulisme watervogels, incl. typering

Onderzoek in het kader van het vervolgingsbeleid door beëdigde opsporingsambtenaren

Publikaties 1992

Bacteriology / Molecular biology

<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	79
<i>Brucella abortus</i>	81
<i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	81
<i>Escherichia coli</i>	82
<i>Mycobacterium paratuberculosis</i>	83
<i>Mycoplasma's</i>	84
<i>Salmonella enteritidis</i>	88
<i>Streptococcus suis</i>	89

Cardiology

<i>Endotoxin infusion</i>	93
---------------------------------	----

Endocrinology

<i>Male fertility</i>	94
-----------------------------	----

Epidemiology

<i>Infection models</i>	95
-------------------------------	----

Immunology

<i>Avian immunity</i>	96
<i>Mucosal immunity</i>	97

Molecular immunology

<i>Pepscan</i>	99
----------------------	----

Parasitology

<i>Anguillicola crassus</i>	104
<i>Anthelmintic resistance</i>	104
<i>Ascaris suum</i>	105
<i>Fasciola hepatica</i>	106
<i>Lungworm infection</i>	107

Pharmacology

<i>Muscle / nerve</i>	107
-----------------------------	-----

Toxicology

<i>Intoxications</i>	108
----------------------------	-----

Vaccinology

<i>Vaccines</i>	110
-----------------------	-----

Virology / Molecular biology

<i>Aujeszky's disease virus / Pseudorabies virus</i>	111
<i>Avian influenza virus</i>	117
<i>Bovine viral diarrhea virus</i>	118
<i>Chicken anemia virus</i>	118
<i>Equine influenza virus</i>	120
<i>Foot-and-mouth disease virus</i>	121
<i>Infectious bronchitis virus</i>	121
<i>Lelystad virus</i>	122
<i>Newcastle disease virus</i>	123
<i>Swine fever virus / hog cholera virus</i>	124
<i>Swine vesicular disease virus</i>	124
<i>Transmissible gastroenteritis virus</i>	125
<i>Varicella-zoster virus</i>	125

Auteurs

<i>Auteurs CDI-DLO</i>	126
<i>Auteurs extern</i>	127

Overige publikaties

<i>Overige publikaties</i>	131
----------------------------------	-----



ACTINOBACILLUS PLEUROPNEUMONIAE

Phagocytosis and killing of *Actinobacillus pleuropneumoniae* by alveolar macrophages and polymorphonuclear leukocytes isolated from pigs

T.L.M. Cruisen, L.A.M.G. van Leengoed, T.C.E.M. Dekker-Nooren, E.J. Schoevers*), J.H.M. Verheijden*

Infection and immunity 60, 1992, 4867-4871

To study the cellular response of phagocytic cells to *Actinobacillus pleuropneumoniae*, we investigated whether porcine alveolar macrophages (AM) and polymorphonuclear leukocytes (PMN) are able to phagocytize and intracellularly kill *A. pleuropneumoniae* *in vitro*. Bacterial cultivation methods of *A. pleuropneumoniae* were used to assess *in vitro* phagocytosis and the ability to kill. A specific-pathogen-free pig was killed, blood was collected, and PMN were isolated and counted. The AM were isolated by lung lavage of the same animal and counted. In addition, convalescent-stage serum was collected from a specific-pathogen-free pig that was infected with *A. pleuropneumoniae*. Both porcine AM and porcine PMN effectively phagocytized *A. pleuropneumoniae* in the presence of convalescent-stage pig serum. PMN killed 90 to 99% of the bacteria intracellularly, whereas AM did not. Because *A. pleuropneumoniae* produces exotoxins that kill porcine AM and porcine PMN, we incubated equal amounts of bacteria and phagocytic cells and tested the viability of the cells 120 min later. In the presence of convalescent-stage pig serum, *A. pleuropneumoniae* was toxic to AM but not to PMN. Probably in porcine AM, intracellular released toxins of *A. pleuropneumoniae* lessen the ability of the cell to kill the bacterium. Consecutive lysis of AM and release of viable *A. pleuropneumoniae* may initiate the characteristic porcine pleuropneumonia.

Influence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2 and its cytolytins on porcine neutrophil chemiluminescence

P. Dom*, F. Haesebrouck*, E.M. Kamp, M.A. Smits

Infection and immunity 60, 1992, 4328-4334

The effects of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2 and its metabolites on the oxidative activity of porcine neutrophils were studied by using a chemiluminescence technique. Viable *A. pleuropneumoniae* stimulated the production of oxygen radicals by neutrophils. After having reached a peak value, the oxidative activity decreased until a total inhibition of the oxidative activity of the neutrophils was achieved. All effects were neutralized with homologous convalescent-phase pig sera which had been adsorbed by heat-inactivated *A. pleuropneumoniae*. Inactivated bacteria and bacteria in the presence of chloramphenicol each had no influence on the oxidative activity of neutrophils. In contrast, a heat-labile factor in *A. pleuropneumoniae* culture supernatants stimulated and inhibited the oxidative activity of the neutrophils in a dose-dependent manner. Undiluted and low dilutions of culture supernatants were toxic for the phagocytes, while high dilutions stimulated the oxygen radical production of the neutrophils. These effects were neutralized with homologous convalescent-phase pig sera. (ABSTRACT TRUNCATED)

*) Externe auteurs zijn met * aangegeven. Achter dit overzicht is een lijst van CDI-DLO auteurs en hun afdelingen opgenomen. Van de externe auteurs is de instelling alsmede het land van herkomst vermeld.

ACTINOBACILLUS PLEUROPNEUMONIAE

Comparison of the cytolyisin II genetic determinants of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes

R. Jansen, J. Briare, E.M. Kamp, M.A. Smits

Infection and immunity 60, 1992, 630-636

Cytolysins (Cly) I, II, and III are toxins secreted by *Actinobacillus pleuropneumoniae*. These toxins are thought to play an important role in the pathogenesis of porcine pleuropneumonia. ClyI and ClyII are RTX toxins and in general these toxins are encoded by operons consisting of four genes, *C*, *A*, *B*, and *D*. Our group recently cloned the *C* and *A* genes of the ClyII operon (*clyIIICA*) of serotype 9. We found that this ClyII operon is truncated and lacked intact *B* and *D* genes (*clyIIBD*). *B* and *D* genes of the ClyI operon (*clyIBD*) were present however in serotype 9. In this study we analyzed the ClyII operons of the reference strains of the 12 *A. pleuropneumoniae* serotypes and compared them with the ClyII operon of serotype 9. We focused on (i) the presence, (ii) the sequence similarity, and (iii) the genomic environment of the *clyIIICA* genes. The presence of the *clyIIICA* sequences was studied by hybridization analysis of genomic DNA. The sequence similarity was studied by restriction fragment analysis on polymerase chain reaction- amplified DNA. The genomic environment was compared by analysis of the sequences that are located 3' of the *clyIIICA* genes. We demonstrated that the *clyIIICA* genes (i) are present in the reference strains of all serotypes, except serotype 10, (ii) have a high degree of sequence similarity, and (iii) are not contiguous with intact *clyIIBD* genes. We conclude that the organization and nucleotide sequence of the ClyII operons of *A. pleuropneumoniae* are very similar. We also studied the presence of *clyIBD* sequences and found them to be present in the reference strains of all serotypes, except serotypes 3 and 6. Thus, in most serotypes the *clyIBD* genes may complement the absent *clyIIBD* genes.

Influence of calcium on secretion and activity of the cytolyisins of *Actinobacillus pleuropneumoniae*

L.A.M.G. van Leengoed, H.W. Dickerson*

Infection and immunity 60, 1992, 353-359

In vitro production of a secreted hemolytic cytolyisin of *Actinobacillus pleuropneumoniae* has been reported to be dependent on the presence of calcium in culture media. This is not the case with *Escherichia coli* hemolysins, however, where calcium has been shown to be required only for activation and binding to target cells. Because the cytolyisins of *A. pleuropneumoniae* have structural and functional similarities to those of hemolytic *E. coli*, we sought to reexamine the role that calcium plays in the secretion and activity of *A. pleuropneumoniae* cytolyisins. *A. pleuropneumoniae* hemolytic strain S4074 secreted two major protein into culture supernatants independent of the presence of calcium in growth medium. These proteins were identified with murine monoclonal antibodies as the 105-kDa cytolyisin I and the 103-kDa cytolyisin II. It was found that both cytolyisins required calcium for binding to erythrocyte membranes. Culture fluids from bacteria grown with calcium lysed porcine erythrocytes even after free calcium in the fluid was removed prior to the hemolytic assay. When bacteria were grown in medium depleted of calcium, no lysis of erythrocytes was detected unless calcium was added to assay buffers. Culture supernatants from *A. pleuropneumoniae* nonhemolytic strain 1421 grown with or without calcium contained two predominant proteins, which were identified with mouse monoclonal antibodies as the 103-kDa cytolyisin II and the 120-kDa cytolyisin III. Binding to erythrocytes (without hemolysis) by cytolyisin II was dependent on calcium. (ABSTRACT TRUNCATED).

BRUCELLA ABORTUS

Detection of brucellosis in dairy herds after an outbreak of the disease using a delayed-type hypersensitivity test

Z. Bercovich, E.A. ter Laak, J.H.H. van Lipzig*

Preventive veterinary medicine 13, 1992, 277-285

A study of 14 herds was conducted to assess the skin delayed-type hypersensitivity (SDTH) test used in combination with the serum agglutination test and complement fixation test to curtail the spread of brucellosis. The tests were used to screen dairy herds suspected of brucellosis, and herds located near infected herds. The herds were tested every 5-6 weeks for 6 months. Cattle with a palpable skin swelling at the injection site of the allergen were considered as brucellosis suspects and were slaughtered. Supramammary lymph nodes of these cattle were collected and examined bacteriologically to determine their infection status. Brucellosis was detected and confirmed bacteriologically in three seronegative herds in which cattle tested positive with the SDTH test. Brucellosis was also confirmed bacteriologically in five seropositive herds in which cattle tested positive with the SDTH test. Brucellosis was not confirmed bacteriologically in one seronegative and four seropositive herds in which cattle reacted positively with the SDTH test. One herd reacted negatively in all tests. Because the SDTH test is able to detect latent carriers of *Brucella* organisms in seronegative herds, we recommend that the SDTH test be used in combination with serologic tests to curtail the spread of brucellosis.

CORYNEBACTERIUM PSEUDOTUBERCULOSIS

Double-antibody sandwich ELISA and immunoblot analysis used for control of caseous lymphadenitis in goats and sheep

E.A. ter Laak, J. Bosch, G.C. Bijl, B.E.C. Schreuder

American journal of veterinary research 53, 1992, 1125-1132

A double-antibody sandwich ELISA for detection of antibodies directed against the exotoxin of *Corynebacterium pseudotuberculosis*, the cause of caseous lymphadenitis (CL) in small ruminants, was developed. A concentrated exotoxin was used. For interpretation of ELISA results, these sera were tested: sequentially obtained sera of *C. pseudotuberculosis* inoculated goats and sheep that were monitored for 68 weeks; sequentially obtained sera from 80 goats of 3 flocks with CL; sera from 652 goats of 7 flocks without CL; sera from 160 sheep of 4 flocks without CL; and 2,265 caprine and 208 ovine sera submitted for diagnostic testing. Data regarding the infection status and history of 10,454 of the 23,302 animals were collected after testing; most of these were goats that had been part of a CL control program. Specificity and sensitivity of the ELISA were nearly 100%. Subsequently, 31,978 animals from which no data on infection status of flocks had been collected were then tested. It was concluded that the ELISA is a useful diagnostic test for CL eradication programs. Sera with doubtful or inconclusive ELISA results were examined by use of immunoblot analysis. Proteins from *C. pseudotuberculosis* culture supernatant were separated by sodium dodecyl sulfate-polycrylamide gel electrophoresis and blotted onto nitrocellulose. Six proteins with molecular mass of 68, 65, 39, 38, 31 and 29 kDa reacted with sera from goats and sheep with experimentally induced or naturally acquired infection. Immunoblot analysis was valuable in classifying sera with doubtful or inconclusive results by ELISA.

ESCHERICHIA COLI

Characterization of the antigenic and adhesive properties of FaeG, the major subunit of K88 fimbriae

D. Bakker*, P.T.J. Willemsen*, L.H. Simons*, F.G. van Zijderveld, F.K. de Graaf*

Molecular microbiology 6, 1992, 247-255

The two K88 serotypes, K88ab and K88ac, differ in terms of antigenic and adhesive properties. The structural determinants of the serotype-specific epitopes and the identity of the amino acid residues involved in fimbriae-receptor interaction were studied by the construction and analysis of K88 hybrid proteins in which various parts of the K88ab and K88ac fimbrial subunit FaeG were exchanged, and by *in vitro* mutagenesis of non-conserved amino acid residues. Using a set of monoclonal antibodies, several regions or amino acid residues involved in the formation of serotype-specific antigenic determinants were located. The haemagglutinating activity of the hybrid and mutant proteins revealed several amino acid residues involved in the formation of the receptor binding site. A clear correlation was found between the receptor binding site and the serotype-specific antigenic determinants.

Passive protection of suckling infant mice against F41-positive enterotoxigenic *Escherichia coli* strains by intravenous inoculation of the dams with monoclonal antibodies against F41

M. Duchet-Suchaux*, P. Menanteau*, F.G. van Zijderveld

Infection and immunity 1992, 60, 2828-2834

Ten monoclonal antibodies (MAbs) against five different epitope clusters of adhesion factor F41 (two MAbs per cluster) were tested for protection of infant mice against an oral challenge with F41-positive enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) B2C and B41M. Infant mice suckling dams intravenously inoculated with MAbs were orally challenged, and the survival rates were measured for 12 days after inoculation and challenge. Irrespective of their epitope specificity, all F41 MAbs given in a single dose of 4 mg per dam had a protective effect against both ETEC strains. In contrast, one K99 MAb of the same isotype and given in the same dose as the F41 MAbs did not protect infant mice at all. A reduction in the dose of F41 MAbs to 0.032 mg per dam resulted in a decrease in protection. Two different MAbs against the same epitope cluster were not necessarily equally protective. Combining MAbs two by two, whether the MAbs recognized the same epitope cluster or not, resulted in protective activity essentially similar to that obtained with each MAb separately, without any improvement. Therefore, one MAb against any epitope may be sufficient for protection. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) titers of MAbs in the serum of dams were similar, irrespective of the epitope specificity of the MAbs, and gradually decreased from day 1 to day 12 after inoculation. (ABSTRACT TRUNCATED).

MYCOBACTERIUM PARATUBERCULOSIS

Amplification of 16S rRNA sequences to detect *Mycobacterium paratuberculosis*

J.W. van der Giessen*, A. Eger, J. Haagsma, R.M. Haring*, W. Gaastra*, B.A. van der Zeijst*

Journal of medical microbiology 36, 1992, 255-263.

A probe based on 16S ribosomal RNA (rRNA) sequences was developed to detect *Mycobacterium paratuberculosis*, the causative agent of Johne's disease in cattle. Three universal primers were used to sequence the amplified fragments of the 16S rRNA gene of various species of mycobacteria. When the nucleotide sequences were analysed, a deletion was detected in the sequence of the fast-growing species. An oligonucleotide probe (P) directed to this region was synthesised and hybridised directly with total RNA of various mycobacterial strains in a dot-spot assay. The probe detected *M. paratuberculosis*, some other slow-growing mycobacteria of the *M. avium-intracellulare* (MAI) complex, and one atypical strain, *M. goodii*. To increase the sensitivity of the probe, a 413-bp fragment of the 16S rRNA gene of *M. paratuberculosis* between P and a second oligonucleotide primer was amplified and hybridised with a *M. paratuberculosis*/*M. avium*-specific probe. When faecal samples of cattle were tested, all culture-positive samples were positive in the PCR assay.

Evaluation of the abilities of three diagnostic tests based on the polymerase chain reaction to detect *Mycobacterium paratuberculosis* in cattle: Application in a control program

J.W. van der Giessen*, R.M. Haring*, E. Vauclare*, A. Eger, J. Haagsma, B.A. van der Zeijst*

Journal of clinical microbiology 30, 1992, 1216-1219

Three assays for the specific detection of *Mycobacterium paratuberculosis* by dot spot hybridization of polymerase chain reaction products were applied to fecal samples of dairy cattle. The first two tests used polymerase chain reaction primers and a DNA probe derived from *M. paratuberculosis*-specific sequences of the 16S rRNA gene and insertion element IS900, respectively.

These two tests were carried out on spiked fecal samples to determine the detection limits. The 16S rRNA test was able to detect 10^7 bacteria per g of feces, and the IS900 test detected 10^4 to 10^5 per g of feces. Next, we studied the usefulness of these tests in a control program for paratuberculosis. Therefore, the tests and a third, commercially available, test (IDEXX Corp.) were used twice with an interval of 3 months on fecal samples of 87 cows from two dairy herds with a history of Johne's disease.

We compared the results of these tests with those of culturing. This showed that the tests are specific but that the sensitivity ranged from 3 to 23%.

Further improvement of the sensitivity is needed before the tests can be used in a control program to eradicate Johne's disease.

MYCOPLASMA'S

Mycoplasmas of the bovine respiratory tract.

Scope of the thesis

E.A. ter Laak

Thesis : University of Utrecht, 1992, 159 p.

Respiratory disease of calves has many etiologic factors and is widespread in the Netherlands. Some of the factors that contribute to respiratory diseases, in addition to various microorganisms such as bacteria, viruses, and mycoplasmas, are housing and climate factors such as the number of animals in a herd, the density of population, temperature, and ventilation. In the Netherlands, this disease has been studied for a long time and much attention has been paid to viruses as causal agents during the past 15 years. Although the etiologic role of viruses, in particular respiratory syncytial virus, in respiratory disease of calves is accepted, it has been only occasionally induced in experimentally inoculated calves. Thus, the causes, origin, and development of this disease are far from being understood.

Until now, no data were available on the prevalence of mycoplasmas in the respiratory tract of pneumonic calves in the Netherlands. Therefore, the specific aims of the thesis were to investigate

- the mycoplasma species involved in respiratory diseases in calves,
- the prevalence of mycoplasma species in pneumonic calves compared to healthy calves and adult cattle
- the pathogenicity of mycoplasma species, whose pathogenicity was controversial or unknown, and
- the *in vitro* susceptibility of various mycoplasma strains for antimicrobial agents.

The general aim of this thesis has been to involve mycoplasmas in the discussion on respiratory disease in calves in the Netherlands in order to contribute to the etiology of this disease and subsequently to its prevention and therapy.

An improved method for the identification of *Mycoplasma dispar*

E.A. ter Laak, J.H. Noordergraaf

Veterinary microbiology 14, 1987, 25-31; also in: *Mycoplasmas of the bovine respiratory tract* / E.A. ter Laak. - Thesis : University of Utrecht, 1992, Chapter 2.1, pp. 21-28

An indirect immunoperoxidase test is described for easy and reliable identification of *Mycoplasma dispar*. Cultures suspected of being *M. dispar* were grown on nitrocellulose filter papers and could be identified without having produced centre-forming colonies. These develop only after several passages *in vitro* and are required for standard identification procedures such as immunofluorescence or growth inhibition. It is to be expected that the method reported here could also be useful for the identification of other mycoplasma species forming centre-less colonies.

MYCOPLASMA'S

Recognition of *Mycoplasma canis* as part of the mycoplasmal flora of the bovine respiratory tract

E.A. ter Laak, J.G. Tully*, J..H. Noordergraaf, D.L. Rose*, P. Carle*, J.M. Bové*, M.A. Smits

Veterinary microbiology, in press; also in: Mycoplasmas of the bovine respiratory tract / E.A. ter Laak. - Thesis : University of Utrecht, 1992, Chapter 2.2, pp. 29-54

Strain C3b was isolated in the Netherlands from the lung of a pneumonic calf. Forty similar strains were isolated afterwards from calves of 19 other farms in different parts of the Netherlands. Eight strains from eight different farms were investigated in this study. The strains were identified as a *Mycoplasma* species, but appeared to be unrelated to known *Mycoplasma* species of cattle. Various characteristics were investigated. The strains were not fastidious and grew rapidly in modified Edward media with no preference for atmospheric conditions. Results of tests to determine whether the organism catabolized glucose were inconclusive. Four strains, including strain C3b, apparently catabolized glucose under some test conditions; the remaining four strains did not. Strain C3b appeared to be serologically related to *Mycoplasma canis* in a comparison with the type strains of 86 previously described *Mycoplasma* species, 12 previously described *Acholeplasma* species, 13 unclassified putative *Mycoplasma* species, and 10 unclassified putative *Acholeplasma* species. Although strain C3b and similar strains were slightly different from canine *M. canis* strains in growth inhibition tests, G+C contents of the DNA, and glucose metabolism tests, we concluded that strain C3b and similar strains have to be classified as *M. canis*. A close contact between calves and dogs was observed in several herds where strain C3b or similar strains were isolated. This is the first report of *M. canis* isolated from cattle.

Increased prevalence of *Mycoplasma bovis* in the Netherlands

E.A. ter Laak, G.H. Wentink*, G.M. Zimmer*

Veterinary quarterly 15, 1992, 100-104; also in Mycoplasmas of the bovine respiratory tract / E.A. ter Laak. - Thesis : University of Utrecht, 1992, Chapter 3.1, pp. 57-69

The epidemiology, therapy, and prevention of *M. bovis* infections are briefly reviewed. In a survey begun in 1982, *M. bovis* was found frequently in the respiratory of veal calves and beef cattle with respiratory problems. In replacement calves infected with respiratory disease in dairy herds, however, the organism has only been detected since 1986. Respiratory tract specimens collected from calves with respiratory disease were submitted for examination for *M. bovis* from 1986 to 1991 and originated from 83 herds. *Mycoplasma bovis* was detected in specimens from 59 of the herds, 20% of which were dairy herds and 80% fattening herds. Arthritis caused by *M. bovis* was observed in 12 herds until July 1991. Since 1976 when the first mastitis outbreak caused by *M. bovis* was diagnosed, *M. bovis* has caused 14 more outbreaks. The number of diseased cattle varied from 1 to 16 per farm, and clinical signs of mastitis varied from mild to severe. In all instances the infection has been eradicated from the herds. Because *M. bovis* can cause great losses in intensively reared cattle herds, it is advisable to separate purchased veal calves and beef cattle from dairy cattle to prevent further spread of *M. bovis*.

MYCOPLASMA'S

Prevalence of mycoplasmas in the respiratory tracts of pneumonic calves

E.A. ter Laak, J.H. Noordergraaf, R.P.J.W. Dieltjes

Journal of veterinary medicine, series B, 39, 1992, 553-562; also in: Mycoplasmas of the bovine respiratory tract / E.A. ter Laak. - Thesis : University of Utrecht, 1992, Chapter 3.2, pp. 71-86

The prevalence of mycoplasmas in the respiratory tracts of 148 pneumonic calves originating from 25 herds in the Netherlands is reported. Four types of culture media were used to isolate mycoplasmas: solid modified Edward medium, 2 types of Friis media, and A7B differential agar medium. Mycoplasmas were isolated both from nasal swab specimens and lung lavage fluids collected from live calves and from nasal mucosa and lung tissue specimens collected post mortem. All of the mycoplasma strains isolated could be identified as either *Ureaplasma diversum* (isolated from 80% of 25 herds), *Mycoplasma dispar* (92%), *M. bovirhinis* (88%), *M. bovis* (20%), *M. bovis genitalium* (4%), *M. arginini* (16%), or *M. canis* (12%). Isolation rates of *M. dispar* and *U. diversum* were considerably higher from lung lavage fluids than from nasal swab specimens. *M. bovis* was detected only in fattening herds and not in dairy herds. The respiratory tracts of 75% of the calves examined contained at least 2 mycoplasma species. In total, 25 different combinations of mycoplasma species were detected in specimens collected from noses and lungs. The pathogenic species *U. diversum* and *M. dispar* had not been isolated before in the Netherlands.

The nasal mycoplasmal flora of healthy calves and cows

E.A. Ter Laak, J.H. Noordergraaf, E. Boomsliuter

Journal of veterinary medicine, series B, 39, 1992, 610-616; also in: Mycoplasmas of the bovine respiratory tract / E.A. ter Laak. - Thesis : University of Utrecht, 1992, Chapter 3.3, pp. 87-98

The nasal mycoplasmal flora of 270 healthy cows from 27 herds in the Netherlands and 35 healthy calves from 7 of these herds was examined. Various methods for isolating mycoplasmas were compared. The prevalence of the various species was as follows: *Ureaplasma diversum* in 3 (9%) calves; *Mycoplasma dispar* in 14 (40%) calves; *M. bovis* in 1 (3%) calf; *M. bovirhinis* in 23 (66%) calves and 16 (6%) cows; *M. bovoculi* in 8 (23%) calves and 53 (20%) cows; *M. canis* in 1 (3%) calf; *M. equirhinis* in 2 (1%) cows; *M. conjunctivae* in 2 (1%) cows; *Acholeplasma laidlawii* in 1 (3%) calf and 3 (1%) cows; and *A. axanthum* in 7 (3%) cows. The noses of healthy calves were less frequently colonized by the pathogenic species *U. diversum* and contained fewer *U. diversum* and *M. dispar* organisms than the noses of pneumonic calves. We concluded that the mycoplasmal flora of calves and healthy cows was quite different and also that cows play only a minor role in the epidemiology of pathogenic mycoplasma species of calves in the Netherlands.

MYCOPLASMA'S

Comparison of pathologic signs of disease in specific-pathogen-free calves after inoculation of the respiratory tract with *Ureaplasma diversum* or *Mycoplasma canis*

E.A. ter Laak, J.E. van Dijk, J.H. Noordergraaf

Journal of comparative pathology, in press; also in: Mycoplasmas of the bovine respiratory tract / E.A. ter Laak. - Thesis : University of Utrecht, 1992, Chapter 4, pp. 99-112

To confirm the pathogenic role of *Ureaplasma diversum* in respiratory disease of calves, we intranasally inoculated caesarean-delivered, colostrum-deprived calves with a dose of 10^7 colour-changing units (CCU) or endobronchially with a dose of 10^{10} CCU. Clinical signs of respiratory disease were not observed, but in the endobronchially inoculated calves, thick cuffs of round cells surrounded the bronchi, bronchioli and blood vessels, and a lobular catarrhal pneumonia developed. It was concluded that the pathogenicity of *U. diversum* can be demonstrated after endobronchial but not after intranasal inoculation. Similar calves were endobronchially inoculated with a dose of 2×10^{10} colony-forming units of *M. canis*. Clinical signs of respiratory disease were not observed. At day 2 after inoculation, only slight pathologic signs of respiratory disease were detected, and these disappeared at day 9. *Mycoplasma canis* was not recovered from the lungs. Hence, *M. canis* could not be clearly identified as a pathogen in respiratory disease of calves. By comparing the results of the various experiments, we concluded that thin cuffs of round cells in the lungs can indicate mycoplasma infections, but that these are not necessarily pathognomonic.

Susceptibility of *M. bovis*, *M. dispar*, and *U. diversum* strains to antimicrobial agents *in vitro*

E.A. ter Laak, J.H. Noordergraaf, M.H. Verschure

In: Mycoplasmas of the bovine respiratory tract / E.A. ter Laak. - Thesis : University of Utrecht, 1992. Chapter 5, pp. 113-128

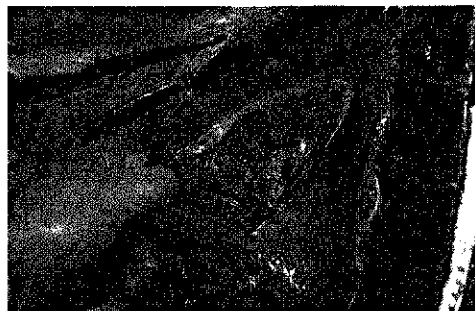
The purpose of the study was to determine the susceptibility of various strains of *Mycoplasma bovis*, *M. dispar*, and *Ureaplasma diversum*, which are prevalent causes of pneumonia in calves, to 16 antimicrobial agents *in vitro*. The MICs of the antimicrobial agents were determined by a serial broth dilution method for 16 field strains and the type strain of *M. bovis*, for 19 field strains and the type strain of *M. dispar*, and for 17 field strains of *U. diversum*. Final MICs for *M. bovis* and *M. dispar* were read after 7 days and final MICs for *U. diversum* after 1 to 2 days. All strains tested were susceptible to tylosin, kitasamycin, and tiamulin, but were resistant to nifuroquine and streptomycin. Most strains of *U. diversum* were intermediately susceptible to oxytetracycline but fully susceptible to chlortetracycline; most strains of *M. bovis* and *M. dispar*, however, were resistant to both agents. Strains of *M. dispar* and *U. diversum* were susceptible to doxycycline and minocycline, but strains of *M. bovis* were only intermediately susceptible. Susceptibility or resistance to chloramphenicol, spiramycin, spectinomycin, lincomycin, or enrofloxacin depended on the species, but was not equal for the three species. The type strains of *M. bovis* and *M. dispar* were more susceptible to various antimicrobial agents including tetracyclines than the field strains. This finding might indicate that *M. bovis* and *M. dispar* strains are becoming resistant to these agents. It was concluded that tylosin, kitasamycin, and tiamulin should be preferred over oxytetracycline and chlortetracycline in treating mycoplasma infections in pneumonic calves.

MYCOPLASMA'S

Contagious bovine pleuropneumonia: a review

E.A. ter Laak

Veterinary quarterly 14, 1992, 104-110



Chronic lesions in CBPP.
Fibrous and adhesive pleurisy
accompanies necrotic lung
lesions with sequestration
(From Dr. J.L. Martel,
CNEVA-LPB, France).

The prevalence, characteristics of the aetiological agent, clinical signs, pathological changes, pathogenesis, epizootiology, microbiological and serological diagnosis, prevention, and control of contagious bovine pleuropneumonia (CBPP), caused by *Mycoplasma mycoides* subspecies *mycoides* SC type, are reviewed. New aspects of the disease are discussed. A renewed interest in this disease is important because of outbreaks in Southern Europe since 1980. When, at the end of 1992, the national borders of the countries of the

European Community are abolished it is conceivable, that the disease will be introduced by cattle imported into CBPP-free countries.

SALMONELLA ENTERITIDIS

Comparison of four different enzyme-linked immunosorbent assays for serological diagnosis of *Salmonella enteritidis* infections in experimentally infected chickens

F.G. van Zijderveld, A.M. van Zijderveld-van Bemmelen, J. Anakotta

Journal of clinical microbiology 30, 1992, 2560-2566

The programme for the eradication of *Salmonella enteritidis* from chickens in The Netherlands is based on bacteriological examination of breeding flocks. There is a great need for a specific and sensitive serological screening test. For that purpose, we developed four different enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA's), i.e., an indirect ELISA with *S. enteritidis* flagellin, an indirect ELISA with *S. enteritidis* lipopolysaccharide, a double-antibody sandwich blocking ELISA that uses monoclonal antibodies against *S. enteritidis* flagellin (GM-DAS blocking ELISA), and a double-antibody sandwich ELISA that uses monoclonal antibodies against *S. enteritidis* lipopolysaccharide. In the present study, we compare the results of those ELISA's with sera from experimentally infected 1-day-old chickens and with sera and eggs from experimentally infected laying hens. Experimental infections were induced with strains of *S. enteritidis* phage types 1 and 2, *S. typhimurium*, and *S. panama*. Sera were collected up to days 44 and 39 after infection from 1-day-old chickens and laying hens, respectively. Only the GM-DAS blocking ELISA was able to discriminate between *S. enteritidis* infections and infections with the other serotypes. This ELISA had both a sensitivity and a specificity of 100% for all serum samples from experimentally infected chickens. A field study is in progress to evaluate whether this test can be implemented in the Dutch *S. enteritidis* eradication programme.

STREPTOCOCCUS SUIIS

Identification of phenotypes associated with virulence. Scope of the thesis

U. Vecht

Thesis: University of Utrecht, Utrecht, 1992, 132 p.

The scope of the thesis was:

- to study the prevalence of various streptococcal infections in pigs, shortly after new outbreaks occurred in Dutch pig farms and to compare the biochemical profiles of the various *S. suis* isolates;
- to assess detectable carrier rates in some herds with and without a history of *S. suis* type 2 infections;
- to analyse protein profiles of various cell fractions of numerous *S. suis* strains isolated from diseased pigs, healthy pigs at slaughter, and from human patients;
- to identify proteins associated with virulence. Three phenotypes of *S. suis* type 2 were recognized, based on the absence or presence of these proteins in the protein profile of the strain;
- to develop an experimental animal model for virulence studies *in vivo* of *S. suis* strains that differ in phenotype;
- to develop an ELISA to discriminate between virulent and nonvirulent *S. suis* strains *in vitro*;
- to clone and to establish the nucleotide sequence of the gene encoding one of the two virulence associated proteins.

These studies were part of an on-going research project to develop methods for controlling *S. suis* type 2 infections in pig herds.

***Streptococcus suis* infections in pigs in the Netherlands (part one)**

U. Vecht, L.A.M.G. van Leengoed, E.R.M. Verheijen

Veterinary quarterly 7, 1985, 315-321; also in: *Streptococcus suis* type 2 / U. Vecht. - Thesis : University of Utrecht, 1992, Chapter 2, pp. 9-20

Data are presented on the prevalence of various streptococcal infections in pigs in the Netherlands. 314 strains isolated in the course of routine post-mortem diagnosis were examined. The most frequently occurring streptococcus was *S. subacidus* (bio) type II which was isolated in 31.2% of the cases. *S. suis* type 2 (Serogroup R) and *S. equisimilis* (Serogroup C) constituted 16.2% and 13.7% of the isolates respectively. Besides meningitis, endocarditis and polyserositis, *S. suis* type 2 infections may frequently be associated with pneumonia (42%). The biochemical profiles of the various *S. suis* and *S. subacidus* (bio)types are presented. The profile of both species is almost identical. It seems justified to use the name *S. suis* for strains with this characteristic profile and to abandon the name *S. subacidus*. Haemolysis does not appear to be a suitable characteristic to screen for *S. subacidus* vs *S. suis*. In comparing three serological methods for typing *S. suis* type 2, gel precipitation using Fuller's extract and slide agglutination give an almost 100% correlation. These two methods are recommended for serotyping.

STREPTOCOCCUS SUIS

***Streptococcus suis* type 2 infections in pigs in the Netherlands (part two)**

L.A.M.G. van Leengoed, U. Vecht, E.R.M. Verheijen

Veterinary quarterly 9, 1987, 111-117; also in: *Streptococcus suis* type 2 / U. Vecht. - Thesis : University of Utrecht 1992, Chapter 2, pp. 21-30

Since 1983 some pig breeding and fattening farms in the Netherlands have been faced with a considerable mortality in pigs due to *Streptococcus suis* type 2 infections. The most predominant clinical feature of *S. suis* type 2 infection is meningitis, although sudden deaths often occur. It was noted that some affected farms had imported breeding stock from the United Kingdom.

Tonsils of slaughter pigs were collected from herds with and without a history of *S. suis* type 2 infections. Bacteriological examination was done by using an elective-selective medium. No significant difference was found in carrier rates of *S. suis* type 2 between clinically healthy and affected herds (38% vs. 45%).

A cohort study was carried out by regular bacteriological examination of tonsil biopsies on a farm with a high incidence of streptococcal meningitis. Twenty-seven percent of the pigs were carriers of *S. suis* type 2 at nine weeks of age. Possible methods for disease control are discussed.

Differences in virulence between two strains of *Streptococcus suis* type 2 after experimentally induced infection of newborn germfree pigs

U. Vecht, J.P. Arends*, E.J. van der Molent†, L.A.M.G. van Leengoed

American journal of veterinary research 50, 1989, 1037-1043; also in *Streptococcus suis* type 2 / U. Vecht. - Thesis : University of Utrecht 1992, Chapter 3, pp. 31-46

Fifteen newborn germfree pigs were inoculated with 2 strains, D-282 and T-15, of *Streptococcus suis* type 2. Some pigs also were preinoculated with *Bordetella bronchiseptica*, which successfully predisposed them to *S. suis* infection. The 2 streptococcal strains were differentiated by muramidase treatment, which released certain high molecular-weight proteins, termed muramidase-released proteins (MRP), from the cell wall of strain D-282, but not from the cell wall of strain T-15. Only strain D-282 (MRP-positive) induced clinical signs of disease and markedly increased neutrophil numbers in pigs. Streptococci were more frequently isolated from fecal swab specimens obtained from pigs inoculated with strain D-282 (MRP-positive) than from specimens obtained from pigs inoculated with strain T-15 (MRP-negative). Both strains were isolated from nasal swab specimens obtained from all infected pigs. Postmortem examination revealed fibrinopurulent meningitis, polyserositis, and polyarthritis in pigs inoculated with strain D-282; this strain was isolated from the CNS, serosae, visceral organs, heart, and joints. Whereas strain D-282 caused several pathologic changes, strain T-15, isolated from the lungs, caused only pneumonia. Both strains were isolated from the tonsils of all pigs. Virulence differed distinctly between the MRP-positive and the MRP-negative strains.

STREPTOCOCCUS SUIIS

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

U. Vecht, H.J. Wisselink, M.L. Jellema, H.E. Smith

Infection and immunity 59, 1991, 3156-3162; also in: *Streptococcus suis* type 2 / U. Vecht. - Thesis : University of Utrecht 1992, Chapter 4, pp. 47-58

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 may play a role in the pathogenesis of *S. suis* type 2 infections in pigs and human patients.

Virulence of *Streptococcus suis* type 2 strains in newborn germfree pigs depends on phenotype

U. Vecht, H.J. Wisselink, J.E. van Dijk, H.E. Smith

Infection and immunity 60, 1992, 550-556; also in: *Streptococcus suis* type 2 / U. Vecht. - Thesis : University of Utrecht 1992, Chapter 5, pp. 59-73

To determine whether the virulence of *Streptococcus suis* type 2 is associated with the phenotype of the strain, we infected newborn germfree pigs with ten strains of *S. suis* type 2 categorized by three phenotypes. In an earlier study, the phenotypes were distinguished by the presence or absence of the muramidase-released protein (MRP) and an extracellular factor (EF) and were designated MRP⁺EF⁺, MRP⁺EF⁻ and MRP⁻EF⁻. Pigs were first inoculated with *Bordetella bronchiseptica* to predispose them to infection and were then intranasally inoculated with the streptococci. Strains of the MRP⁺EF⁺ phenotype induced fever and increased the number of polymorphonuclear leucocytes in blood. Specific clinical signs of disease such as nervous disorders and lameness were also observed. At necropsy bacteriologic and pathologic examination disclosed meningo-encephalitis, polyserositis, and polyarthritis. Strains of the MRP⁺EF⁻ phenotype induced only nonspecific clinical signs of disease such as recumbency, lack of appetite, and fever; only slight pathologic changes were detected in the serosae. The four strains of the MRP⁻EF⁻ phenotype induced no signs of disease. These findings indicate that the 110-kDa EF and, to a lesser degree, the 136-kDa MRP, may be associated with the virulence of the bacterium. The results demonstrated that *S. suis* type 2 strains producing both MRP and EF are pathogenic for pigs.

STREPTOCOCCUS SUIIS

Discrimination between virulent and nonvirulent *Streptococcus suis* type 2 strains by enzyme-linked immunosorbent assay

U. Vecht, H.J. Wisselink, J. Anakotta, H.E. Smith

Veterinary microbiology in press, also in: Streptococcus suis type 2 / U. Vecht. - Thesis : University of Utrecht 1992, Chapter 6 pp. 75-88

Discrimination between virulent and nonvirulent strains of *Streptococcus suis* type 2 will allow proper diagnosis of diseased pigs and the identification of carrier pigs. To discriminate between virulent and nonvirulent strains, we developed two double antibody sandwich (DAS) enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) using specific monoclonal antibodies directed against two virulence markers of *S. suis* type 2. One MAb was directed against the 136-kilodalton (kDa) cell-wall-associated protein, designated muramidase-released-protein (MRP). The other MAb was directed against a 110-kDa extracellular protein, provisionally called extracellular factor (EF). We examined 179 strains of *S. suis* serotype 2, 22 strains of *S. suis* serotypes 1 to 22, 22 other streptococci, 20 other bacterial strains, and one yeast. The ELISA results were almost identical with Western blot analysis of these strains. Visual readings of the two DAS-ELISAs were enough to discriminate accurately between the three phenotypes of *S. suis* type 2. We concluded that the two DAS-ELISAs are reliable, rapid, and simple assays to identify virulent strains of *S. suis* type 2.

Cloning and nucleotide sequence of the gene encoding the 136-kDa surface protein (mrp) of *Streptococcus suis* type 2

H.E. Smith, U. Vecht, A.L.J. Gielkens, M.A. Smits

Infection and immunity 60, 1992, 2361-2367, also in: *Streptococcus suis* type 2 / U. Vecht. - Thesis : University of Utrecht 1992, Chapter 7, pp. 89-102

We cloned and sequenced the gene encoding the muramidase-released protein (MRP) of a pathogenic *Streptococcus suis* type 2 to determine whether its amino acid sequence resembles that of proteins with known functions and to determine its function in virulence. The complete nucleotide sequence comprising the gene and the regions flanking it was determined. The deduced amino acid sequence revealed the presence of a signal peptide at the N terminus and a cell-envelope anchor at the C terminus, both of which resembled similar regions in several other surface proteins from Gram-positive bacteria. The processed form of MRP has a length of 1,209 amino acids and a calculated molecular weight of 131,094. A highly repetitive region preceded the envelope anchor. The repeated units were preceded by a proline-rich stretch of amino acids (26 out of 86). No overall homologies were observed between the amino acid sequence of MRP and protein sequences in the EMBL data bank. However, a particular region within the amino acid sequence showed some similarity with the fibronectin-binding protein of *Staphylococcus aureus*. Binding of MRP to human fibronectin, however, could not be confirmed.

ENDOTOXIN INFUSION

High volume hemofiltration improves right ventricular function in endotoxin-induced shock in the pig

A.F. Grootendorst*, E.F.H. van Bommel*, B. van der Hoven*, L.A.M.G. van Leengoed, A.L.M. van Osta*

Intensive care medicine 18, 1992, 235-240

Using a rapid computerized thermodilution method, we examined the changes in right ventricular performance in 5 pigs after endotoxin infusion. A significant decrease in ejection fraction (0,47 to 0,28) was found. This drop in EG was caused by a significant drop in stroke volume (52 ml to 35 ml) while no significant change in end diastolic volume was seen. The observed right ventricular pump failure appears to be associated with an alteration in systolic mechanical properties, leading to decreased compliance of the ventricle.

High volume hemofiltration improves hemodynamics of endotoxin-induced shock in the pig

A.F. Grootendorst*, B. van der Hoven*, L.A.M.G. van Leengoed, E.F.H. van Bommel*, A.L.M. van Osta*

Journal of critical care 7, 1992, 67-75

Hemofiltration was applied in 5 pigs with endotoxin induced shock. The hemodynamics of these pigs were compared to five pigs who received endotoxin without hemofiltration treatment.

In the hemofiltration group cardiac output, blood pressure and left ventricular stroke work were significantly higher than in the control group. The literature on hemofiltration in sepsis and multiple organ failure is summarized. The relevance of this model to the treatment of human septic shock is discussed.



MALE FERTILITY

Immunomodulation of reproductive systems

M. Hage-van Noort, W.C. Puijk, W.M.M. Schaaper, D. Kuperus, N.J.C.M. Beekman, H.H. Plasman, H. Lankhof, C.J.G. Wensing, R.H. Melen

Animal reproduction science 28, 1992, 187-193

Immunomodulation of reproductive systems is a means of increasing or decreasing reproductive efficiency. In veterinary medicine, it may be applied to "castrate" animals without removing the gonads and to treat diseases caused by hormonal imbalance. Endogenous hormones are recognized as "self" by an animal. To acquire a foreign antigen for immunization purposes, endogenous hormones are usually coupled to a molecule that is foreign to the animal. For immunoneutralization of endogenous hormones, a high titer of specific antibodies is required, a requirement that is often difficult to meet. Nevertheless, in the last decade it has been demonstrated that endocrine systems can be influenced using active and passive immunization against steroid hormones, such as androstenedione, protein hormones, such as inhibin, and peptide hormones, such as luteinizing hormone releasing hormone (LHRH). A new and promising development is the use of peptides as antigens in active immunization against hormones such as inhibin and human chorionic gonadotrophin.

Hormone-induced resistance of rat Leydig cells to the cytotoxic effects of ethane-1,2-dimethane sulphonate

K.J. Teerds*, D.G. de Rooij*, C.J.G. Wensing, F.F.G. Rommerts*

Journal of endocrinology 134, 1992, 85-90

Several studies have shown that the cytotoxic agent ethane-1,2-dimethane sulphonate (EDS) specifically destroys Leydig cells in the adult rat testis. It has also been reported that when rats are pretreated with human chorionic gonadotrophin (hCG), administration of EDS does not result in the complete destruction of the Leydig cell population. It has been suggested that hCG pretreatment 'protects' Leydig cells against the cytotoxic action of EDS. In the present study the underlying principles for this resistance to the cytotoxic effects of EDS have been investigated. Within 48 h of the start of daily hCG treatment the number of nuclear profiles of Leydig cells (henceforth called relative number of Leydig cells) had increased from 1014 ± 40 to 1368 ± 30 cells per 1000 Sertoli cell nuclei. Previous experiments have indicated that these newly formed Leydig cells probably develop from differentiating Leydig cell precursors. When EDS is administered concomitantly with the third injection of hCG (2 days after the start of hCG treatment), the relative number of Leydig cells surviving EDS treatment was 388 ± 52 per 1000 Sertoli cells. Hence, there is a similarity between the increase in the relative number of Leydig cells after 2 days of hCG treatment and the relative number of EDS-resistant Leydig cells. The Leydig cells that survived EDS administration showed characteristics which also occur in developing Leydig cells in the immature testis. It is concluded that, in rats pretreated with hCG for 2 days before EDS administration, new Leydig cells with some immature characteristics are formed. One of these characteristics is that these cells are insensitive to EDS.

MALE FERTILITY

Pubertal development in the male pig: effects of treatment with a long-acting gonadotropin-releasing hormone agonist on plasma luteinizing hormone, follicle stimulating hormone and testosterone

V.L. Trudeau*, J.C. Meijer*, J.H.F. Erkens*, D.F.M. van de Wiel*, C.J.G. Wensing

Canadian journal of veterinary research 56, 1992, 102-109

The effects of a long-acting-gonadotropin-releasing hormone (GnRH) agonist, [D-Trp⁶]-GnRH (GnRH-A) on developmental profiles of plasma luteinizing hormone (LH), follicle stimulation hormone (FSH) and testosterone (T), and pituitary responsiveness to exogenous GnRH were studied in male Dutch Landrace x Large White crossbred pigs from 1 to 30 wk of age. Group 1 control animals (control; n=12) were injected subcutaneously in the neck with vehicle at 1 and 16 wk of age. Group 2 animals (early treatment; n=10) were injected with 600 g [D-Trp⁶]-GnRH at 1 wk and with vehicle at 16 wk. Group 3 animals (late treatment; n=8) were injected with vehicle and 3 mg GnRH-A at 1 and 16 wk, respectively. Group 4 animals (early plus late treatment; n=9) were injected at both 1 and 16 wk with GnRH-A. Blood was collected by brachiocephalic puncture at weekly or biweekly intervals, and through brachiocephalic cannulae, to determine longitudinal profiles of LH, FSH and T, and plasma gonadotropin responses to intravenous injection of GnRH (0.1 g/kg), respectively. In control animals, LH and FSH declined over the first 5 wk of postnatal life and peaked again at 10-14 wk. Levels of both hormones were basal from 18 to 30 wk. Plasma T was high in the first week, declined progressively over the next few weeks and remained low until 24 wk when a transient increment was noted. The LH and FSH responses to acute GnRH stimulation were similar at 7 and 14 wk and declined significantly at 23 wk of age. (ABSTRACT TRUNCATED).

INFECTION MODELS

A method to calculate - for computer-simulated infections - the threshold value, R_0 , that predicts whether or not the infection will spread

M.C.M. de Jong, O. Diekmann*

Preventive veterinary medicine 12, 1992, 269-285

Computer-simulation models of infections can easily incorporate heterogeneity among animals (important for the effect of control measures) by allocating animals to various classes. These classes are termed "states" and the change from one state to another, during a unit of time, is termed a "transition". Hence, most computer models are state-transition models. Using a fairly universal representation of state-transition models, we derived an analytic expression (a formula) for the basic reproduction ratio of infection (R_0), i.e. the number of cases caused by one typical infectious animal. When $R_0 > 1$, the infection can spread; when $R_0 < 1$, the infection will disappear. Therefore, a strategy for controlling an infective agent is effective when, and only when, the ratio for that strategy is less than one.

Using the reproduction-ratio formula derived in this paper (instead of interpreting results from a large number of simulations) has several advantages for veterinary researchers. The structure of the formula allows investigators to understand how certain parameters (e.g. infection, demographic or control-strategy parameters), if changed, will influence the ratio. Moreover, the ratio can be calculated directly and quickly, hence whether an infection will spread or disappear can be determined quickly. (ABSTRACT TRUNCATED).

AVIAN IMMUNITY

Histological and functional differentiation of non-lymphoid cells in the chicken spleen

S.H.M. Jeurissen, E. Claassen*, E.M. Janse

Immunology 77, 1992, 75-80

The phenotypes and functions of various populations of non-lymphoid cells in the chicken spleen were investigated with monoclonal antibodies and after *in vivo* administration of antigens. Monoclonal antibody CVI-ChNL-68.1 was used to detect red pulp macrophages, interdigitating cells, and monocytes, whereas CVI-ChNL-68.2 was used to detect ellipsoid-associated non-lymphoid cells (EANC). Two new monoclonal antibodies were developed: CVI-ChNL-74.2, which specifically recognized red pulp macrophages and a ring of macrophages of surrounding the peri-ellipsoid lymphocyte sheath; and CVI-ChNL-74.3, which specifically recognized follicular dendritic cells (FDC) in germinal centres and small clusters of stromal cells in T-cell areas. After intravenous injection of lipopolysaccharide (LPS), the number of 68.1⁺ and 74.2⁺ macrophages decreased dramatically, whereas 68.2⁺ EANC and 74.3⁺ FDC were unaffected. After intravenous injection of heat-inactivated *Brucella abortus*, the numbers of both macrophages and EANC decreased. In contrast, a significant increase of 74.3⁺ cells was observed in the T-cell areas outside the germinal centres. As expected, intravenous injection of non-mitogenic antigens, such as keyhole limpet haemocyanin and Ficoll, and carrageenan did not affect the non-lymphoid cell populations. At least six subpopulations of non-lymphoid cells in the chicken spleen can now be discriminated with monoclonal antibodies. Our results show that mononuclear phagocytes are sensitive for mitogenic stimulators such as LPS and *Brucella abortus*. In contrast, stromal non-lymphoid cells are only sensitive to the particulate mitogen *Brucella abortus*. We conclude that the complex formed by ellipsoid cells, the peri-ellipsoid B-cell sheath, and the surrounding macrophages, is the functional equivalent of the mammalian marginal zone.

In situ immunocytochemical detection of cells containing antibodies specific for *Eimeria tenella* antigens

L. Vervelde, A.N. Vermeulen*, S.H.M. Jeurissen

Journal of immunological methods 151, 1992, 191-199

A three-step immunocytochemical method for the *in situ* detection of antibodies specific for *Eimeria tenella* has been developed. The method is based on the binding of *E. tenella* antigens to antibodies in cryostat sections of chicken tissues and the recognition of these antigens by rabbit antiserum specific for *E. tenella* or mouse monoclonal antibodies specific for *E. tenella*. The rabbit antiserum and mouse monoclonal antibodies were revealed by the immunoperoxidase technique. Suspensions of sonicated sporulated oocysts, incubated with or without various concentrations of the non-ionic detergents Triton X-100 (TX-100) or Nonidet P-40 (NP-40), were used as antigen. Cells containing antibodies specific for *E. tenella* were detected only when detergent extracts of sonicated sporulated oocysts were used. After chickens were intravenously immunized with a suspension of sonicated sporulated oocyst antigen, cells containing antibodies specific for *E. tenella* antigens were detected in the red pulp of the spleen. After simultaneous immunoenzyme staining for isotype and antigen specificity, the *E. tenella*-specific antibody-containing cells were of the IgM isotype after the primary immunization and of the IgM and IgG isotype after the booster immunization. Immune complexes specific for *E. tenella* on the surfaces of follicular dendritic cells in the germinal centers were also stained. Chickens were also orally infected with sporulated oocysts. In these experiments, cells containing antibodies specific for *E. tenella* were detected in the lamina propria of the ceca and in the red pulp of the spleen. (ABSTRACT TRUNCATED).

AVIAN IMMUNITY

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

H.J. Zentel*, D. Nohr*, R. Albrecht*, S.H.M. Jeurissen, O. Vainio*, E. Weihe*

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-immunoreactive (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 systems, 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 microenvironment primarily by regulating the blood supply.

MUCOSAL IMMUNITY

Apathogenic, intestinal, segmented, filamentous bacteria stimulate the mucosal immune system of mice

H.L.B.M. Klaasen*, P.J. van der Heijden, W. Stok, F.G.J. Poelma*, J.P. Koopman*, M.E. van den Brink*, M.H. Bakker*, W.M.C. Eling*, A.C. Beynen*

In: A study of segmented filamentous bacteria in the ileum of mice / H.L.B.M. Klaasen. - Thesis : University of Nijmegen, 1992. - Chapter 4.1, pp. 167-187

Segmented, filamentous bacteria (SFBs) are apathogenic, autochthonous bacteria in the murine small intestine that preferentially attach to Peyer's patch epithelium. SFBs have never been cultured *in vitro*. We have studied the effects of SFBs on the immune system of the host. Mice mono-associated with SFBs were compared with germ-free mice, and mice associated with SFBs plus a specified pathogen-free (SPF) gut flora were compared with mice associated with the SPF gut flora only. SFBs versus no microbial flora raised the number of lymphoid cells in lamina propria of ileal and caecal mucosa, raised the number of IgA secreting cells in the intestinal mucosa, produced elevated IgA titres in serum and intestinal secretions and enhanced the concanavalin A-induced proliferative response of mesenteric lymph node cells. The SPF flora had similar effects, but less pronounced than those mediated by SFBs. The results indicate that SFBs stimulate the mucosal immune system to a larger extent than do other autochthonous gut bacteria.

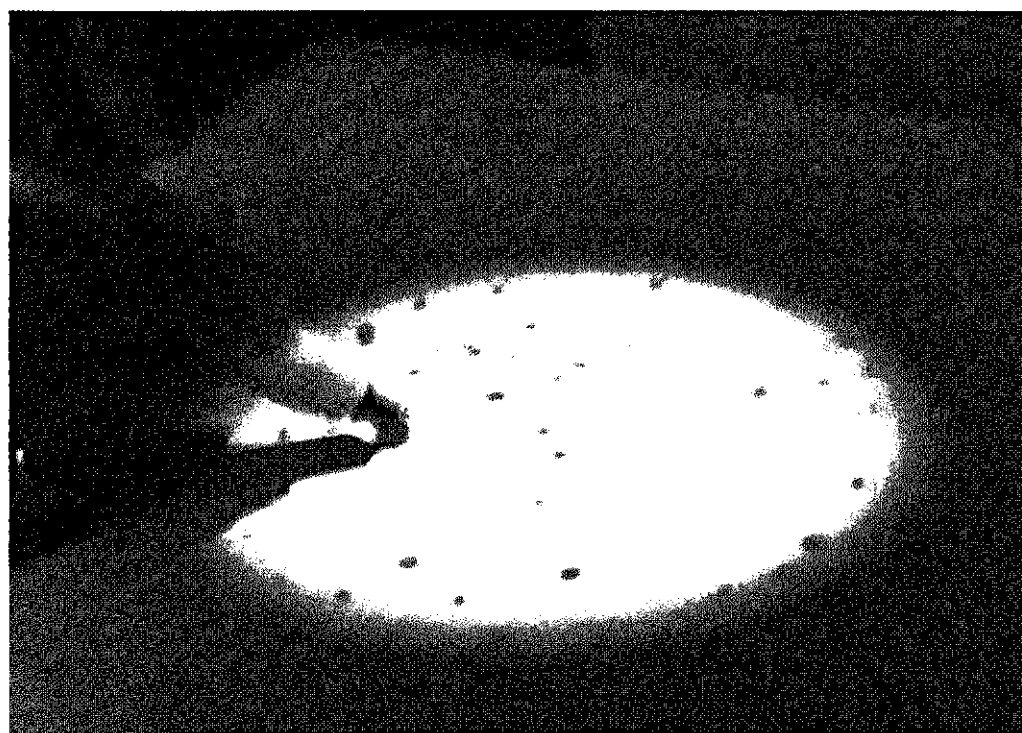
MUCOSAL IMMUNITY

Development of the B- and T-cell compartments in porcine lymphoid organs from birth to adult life: An immunohistological approach

A.T.J. Bianchi, R.J. Zwart, S.H.M. Jeurissen, H.W.M. Moonen-Leusen

Veterinary immunology and immunopathology 33, 1992, 201-221

Using immunohistological techniques, we studied the development over time of B- and T-cell compartments in the lymphoid organs of specific-pathogen-free pigs. Tissue samples were collected at various time-points, starting 2 days before the pigs were born until the pigs were 10 months old. The samples were collected from the spleen, thymus, peripheral lymph node, mesenteric lymph node, duodenum, jejunum, ileum, jejunal Peyer's patch and ileal Peyer's patch. Monoclonal antibodies specific to B- and T-cells were used to identify where the following cells were localized: IgM-B cells (cells positive to surface immunoglobulin), IgM-, IgG- and IgA-containing cells (cells positive to cytoplasmic immunoglobulin), and CD2-, CD4- and CD8-positive cells. The development of the B- and T-cell subpopulations in each organ was analysed. Two days before birth, most organs contained quantities of IgM-B cells. The spleen, lymph nodes, Peyer's patches and, notably, the thymus, contained some immunoglobulin-containing cells (Ig-CC); this finding indicates that pigs have cells that secrete immunoglobulins before birth. Just after birth, the incidence of Ig-CC increased in most organs; first IgM-CC increased, then either IgG- or IgA-CC increased, depending on the organ. (ABSTRACT TRUNCATED).



PEPSCAN

Peptides reactive with a transmission-blocking monoclonal antibody against *Plasmodium falciparum* Pfs25: 2000-fold affinity increase by PEPSCAN-based amino acid substitutions

A. van Amerongen, P.J.A. Beckers*, H.H. Plasman, W.M.M. Schaaper, R.W. Sauerwein*, J.H.E.Th. Meuwissen*, R.H. Melen

Peptide research 5, 1992, 269-274

Based on PEPSCAN analyses, a peptide derived from the 25-kDa surface protein of *P. falciparum* sexual stages (LDTSNPVKT, amino acids 122-130) was recently shown to react with transmission-blocking monoclonal antibodies. Subsequently, a pinbound construct (FDDTDPIKK; six amino acids substituted) was designed that reacted 1000 times better with the transmission-blocking monoclonal antibody 32F81 than with the parent LDTSNPVKT peptide. While this construct was obtained through single amino acid replacement studies, it now is shown that the combined contribution of the various substitutions is necessary to give the total effect. Free peptides comprising LDTSNPVKT or FDDTDPIKK were shown to inhibit the interaction of the transmission-blocking monoclonal antibody with plate-bound peptides, when prepared by conventional synthesis procedures. Compared with peptides that contained LDTSNPVKT, similar levels of inhibition could be achieved with an average 500-fold lower molar amount of peptides containing the FDDTDPIKK sequence. Affinity constants of the peptides for the transmission-blocking monoclonal antibody ranged from 1.3×10^5 , for peptides that contained LDTSNPVKT, to 2.6×10^8 , for peptides that contained FDDTDPIKK. The structural relationship between the epitope of the 25-kDa surface protein and the peptides was demonstrated by competition experiments with the transmission-blocking monoclonal antibody 32F81. Again, peptides comprising the newly designed sequence FDDTDPIKK competed about 200 times better than peptides with the parent LDTSNPVKT sequence.

Localization of an immunodominant domain on baculovirus- produced parvovirus B19 capsids: Correlation to a major surface region on the native virus particle

C.S. Brown*, T. Jensen*, R.H. Melen, W. Puijk, K. Sugamura*, H. Sato*, W.J.M. Spaan

Journal of virology 66, 1992, 6989-6996

An immunodominant region on baculovirus-produced parvovirus B19 VP2 capsids was localized between amino acids 259 and 426 by mapping the binding sites of a panel of monoclonal antibodies which recognize determinants on the particles. The binding sites of three monoclonal antibodies were fine-mapped within this antigenic domain. Six VP2-specific monoclonal antibodies recognized determinants common to both the empty capsids and native parvovirus. The defined antigenic region is most probably exposed on the native B19 virion and corresponds to part of the threefold spike on the surface of canine parvovirus particles.

PEPSCAN

Functional analysis of DR17(DR3)-restricted mycobacterial T cell epitopes reveals DR17-binding motif and enables the design of allele-specific competitor peptides

A. Geluk*, K.E. van Meijgaarden*, A.A.M. Janson*, J.W. Drijfhout*, R.H. Melen, R.R.P. de Vries*, T.H.M. Ottenhoff*

Journal of immunology 149, 1992, 2864-2871

We have previously shown that p3-13 (KTIAYDEEARR) of the 65-kDa heat shock protein (hsp65) of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium leprae* is selected as an important T cell epitope in HLA-DR17⁺ individuals, by selectively binding to (a pocket in) DR17 molecules, the major subset of the DR3 specificity. We have now further studied the interaction between p3-13, HLA-DR17 and four different TCR (V β 5.1, V β 1, and V β 4) by using T cell stimulation assays, direct peptide-DR binding assays, and a large panel (n=240) of single amino acid substitution analogs of p3-13. We find that residues 5(I) and 8(D) of p3-13 are important DR17 binding residues, whereas the residues that interact with the TCR vary slightly for each DR17-restricted clone. By using N- and C-terminal truncated derivatives of p2-20 we defined the minimal peptide length for both HLA-DR17 binding and T cell activation: the minimal peptide that bound to DR17 was seven amino acids long whereas the minimal peptide that activated T cell proliferation was eight amino acids in length. (ABSTRACT TRUNCATED).

Synthetic peptides based upon a three-dimensional model for the receptor recognition site of follicle-stimulating hormone exhibit antagonistic or agonistic activity at low concentrations

M. Hage-van Noort, W.C. Puijk, H.H. Plasman, D. Kuperus, W.M.M. Schaaper, N.J.C.M. Beekman, J.A. Grootegoed*, R.H. Melen

Proceedings of the national academy of sciences of the USA 89, 1992, 3922-3926

Follicle-stimulating hormone (follicotropin, FSH) belongs to a group of closely related glycoprotein hormones that contain two noncovalently linked dissimilar subunits designated α and β . By using synthetic peptides, several receptor interaction sites in these hormones have been identified; however, the peptides have a reduced potency (lowest effective concentration of 10^{-4} to 10^{-5} M) relative to the hormone itself (10^{-8} to 10^{-11} M). This suggests that the peptides represent only a portion of a larger recognition site in the intact hormone that comprises parts of both the β and the α chains. To develop peptides that exhibit FSH-antagonistic activity at low concentrations, we have constructed a three-dimensional model for FSH, which is based on an alignment of both the β and the α chains of glycoprotein hormones with thioredoxin, for which x-ray diffraction data are available. This model resulted in the prediction of a conformational receptor-binding site in FSH, in which (parts of) three earlier proposed binding regions on the FSH molecule [namely, the regions FSH α -(34-37), with the amino acid sequence SRAY; FSH β -(40-43), with the amino acid sequence TRDL; and FSH β -(87-94), the "determinant loop" with the amino acid sequence CDSSTDC] are located within 10 Å of one another. On the basis of this model, peptides have been synthesized in which two of these binding regions are linked by a synthetic amino acid whose length was derived from the model, Ac-TSDSDS-NH-(CH₂)₅-CO-SRAY-NH₂ and Ac-SRAY-NH-(CH₂)₄-CO-TRDL-NH₂. (ABSTRACT TRUNCATED).

PEPSCAN

The principal neutralization determinant of simian immunodeficiency virus differs from that of human immunodeficiency virus type 1

K. Javaherian*, A.J. Langlois*, S. Schmidt*, M. Kaufmann*, N. Cates*, J.P.M. Langedijk, R.H. Melen, R.C. Desrosiers*, D.P.W. Burns*, D.P. Bolognesi*, G.J. LaRosa*, S.D. Putney*

Proceedings of the national academy of sciences of the USA 89, 1992, 1418-1422

To identify the principal neutralization determinant (PNB) of simian immunodeficiency virus (SIV), antisera were generated using recombinant gp110 [the SIV analog of the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) external envelope glycoprotein, gp120], gp140, several large recombinant and proteolytic envelope fragments, and synthetic peptides of the SIV_{mac251} isolate. When purified under conditions that retain its native structure, gp110 bound CD4 and elicited antisera that neutralized SIV_{mac251} with high titer. Native gp110 also completely inhibited neutralizing antibody in sera from SIV_{mac251}-infected macaques. In contrast, denatured gp110 and gp140, large envelope fragments, and synthetic peptides (including peptides analogous to the HIV-1 PNB) elicited very low or undetectable neutralizing antibody titers and did not inhibit neutralizing antibody in infected macaque sera. Enzymatically deglycosylated gp110 efficiently absorbed neutralizing antibodies from macaque sera, showing that neutralizing antibodies primarily bind the protein backbone. A 45-kDa protease digest product, mapping to the carboxyl-terminal third of gp110, also completely absorbed neutralizing antibodies from infected macaque sera. These results show that the PNB(s) of this SIV isolate depends on the native conformation and that linear peptides corresponding to the V3 loop of SIV envelope, in contrast to that of HIV-1, do not elicit neutralizing antibody. This may affect the usefulness of SIV_{mac} for evaluating HIV-1 envelope vaccine approaches that rely on eliciting neutralizing antibody.

Comparison and fine mapping of both high and low neutralizing monoclonal antibodies against the principal neutralization domain of HIV-1

J.P.M. Langedijk, N.K.T. Back*, E. Kinney-Thomas*, C. Bruck*, M. Francotte*, J. Goudsmit*, R.H. Melen

Archives of virology 126, 1992, 129-146

Monoclonal antibodies raised against viral lysate of HIV-1 (strain LAV-1) and against recombinant gp 160 of HIV-1 (strain HTLV IIIB) which neutralized HIV-1 in a type specific manner were mapped with the aid of peptides (Pepscan analysis). Each of these monoclonal antibodies bound to peptides located on the principal neutralizing domain (PND) of HIV-1. We found that the antigenic sites of the MAbs described in this paper are represented by linear peptides of at least 10 amino acids long. The affinity of the MAbs is high for these peptides and in the same order of magnitude as for native gp 160. The fine mapping of the epitopes may reflect structural features of the PND, for instance which amino acid side chains are exposed and which are buried in the protein. Furthermore the fine mapping of the epitopes explained the HIV type-specific neutralizing activity of the MAbs. Antibodies that bound to the tip of the loop (amino acids QRGPGRFV) have a higher neutralizing activity than antibodies that bound to amino acids towards the N-terminal side of the loop (amino acids KSIRI). Furthermore, MAbs that bound to virtually the same amino acids on the tip of the loop (amino acids IQRGPGRFV and RGPGRFV) had different neutralizing activities due to different affinities for native gp 160. (ABSTRACT TRUNCATED).

PEPSCAN

Isolation of sequences from a random-sequence expression library that mimic viral epitopes

J.A. Lenstra*, J.H.F. Erkens*, J. Langeveld, W.P.A. Posthumus, R.H. Melen, F. Gebauer*, I. Correa*, L. Enjuanes*, K.K. Stanley*

Journal of immunological methods 152, 1992, 149-157

We describe the use of random peptide sequences for the mapping of antigenic determinants. An oligonucleotide with a completely degenerate sequence of 17 or 23 nucleotides was inserted into a bacterial expression vector. This resulted in an expression library producing random hexa- or octapeptides attached to a β -galactosidase hybrid protein. Mimotopes, or antigenic sequences that mimic an epitope, were selected by immunoscreening of colonies with monoclonal antibodies, which were specific for antigenic sites on the spike protein of the coronavirus transmissible gastroenteritis virus. We report one mimotope for antigenic site II, eight for site III and one for site IV. The site III and site IV mimotopes were closely similar to the corresponding linear epitopes, localized previously in the amino acid sequence of the S protein. An alignment of the site II mimotope and the sequence of the S protein around Trp97, which is substituted in escape mutants, suggests that this mimotope mimics a conformational epitope located around residues 97-103. Applications of mimotopes to epitope mapping, serodiagnosis and vaccine development are discussed.

Suppression of lymphocyte proliferation by a retroviral p15E-derived hexapeptide

R.A.J. Oostendorp*, W.M.M. Schaaper, J. Post*, B.M.E. Von Blomberg*, R.H. Melen*, R.J. Scheper*

European journal of immunology 22, 1992, 1505-1511

CKS-17 (LQNRRLDLLFLKEGGL), a synthetic peptide derived from a conserved region of retroviral transmembrane protein, has previously been shown to suppress several different immune effector mechanisms. The present study was undertaken to further delineate immunosuppressive site(s) of CKS-17. Overlapping hexapeptides covering the complete sequence of CKS-17 were synthesized. One CKS-17-derived hexapeptide, LDLLFL, suppressed ligand [CD3, interleukin (IL)-2]-induced lymphocyte proliferation. Spontaneous proliferation of transformed lymphoid cell lines, as well as cell lines from myeloid or epitheloid origin, was not inhibited by LDLLFL. Full suppression required the continuous presence of LDLLFL during culturing, and did not involve interference with monocyte function. Radiolabeling studies showed that the hexapeptide did not compete with IL-2 for IL-2 receptor binding. Most likely the LDLLFL motif interferes with steps shared by the IL-2 and CD3 receptor-induced signalling pathways. Since LDLLFL displays multiple immunosuppressive activities, it may constitute a biologically relevant immunosuppressive site of retroviral transmembrane proteins.

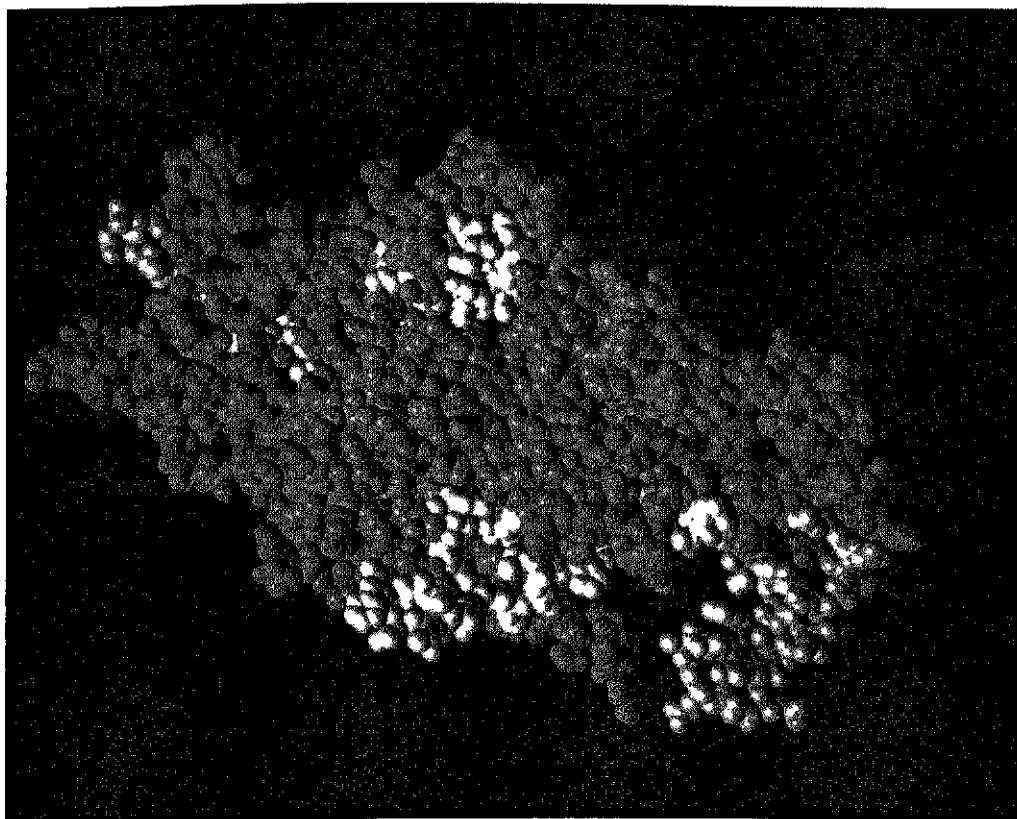
PEPSCAN

Synthetic hexapeptides derived from the transmembrane envelope proteins of retroviruses suppress *N*-formylpeptide-induced monocyte polarization

R.A.J. Oostendorp*, W.M.M. Schaaper, J. Post, R.H. Melen, R.J. Scheper*

Journal of leukocyte biology 51, 1992, 282-288

Retroviral infections are frequently associated with immunosuppression. Retroviral transmembrane envelope proteins (TM proteins) play an important role in this phenomenon. CKS-17, a synthetic heptadecapeptide, represents the immunosuppressive site of these retroviral TM proteins. Here we report on the further delineation of this immunosuppressive site using CKS-17-derived hexapeptides. The *N*-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine-induced monocyte polarization assay was used throughout this study because this monocyte function has been shown to be highly sensitive to TM protein p15E-related immunosuppression. We found that in addition to CKS-17 one CKS-17-derived hexapeptide, LDLLFL, reversibly inhibited monocyte polarization, with 50% inhibitory concentrations of 20 and 2 M respectively. LDLLFL-mediated inhibition was sequence specific because the reverse peptide LFLDL and scrambled peptides were not inhibitory. Hexapeptides corresponding to LDLLFL, but derived from various retroviruses other than murine leukemia virus, also inhibited monocyte polarization. Peptides most homologous to LDLLFL-LDILFL (feline leukemia virus) and LDLLFW (human T lymphotropic virus types I and II)- were the most potent inhibitors. Peptides homologous to primate and human endogenous proviruses were not suppressive. LDLLFL and some of its homologues also inhibited polarization of neutrophilic granulocytes. These findings lend further support to the view that conserved retroviral TM protein-related peptides can play an important role in suppression of inflammatory cell function as encountered in retrovirus-associated immunosuppression.



Mantelwit van parvovirus

ANGUILLICOLA CRASSUS

Artificial infection of the European eel with third-stage larvae of the nematode *Anguillicola crassus*

O.L.M. Haenen, L. Grisez*, D. de Charleroy*, C. Belpaire*, F. Ollevier

Journal of aquatic animal health 3, 1991, 263-265

We conducted an experiment on the migration of larvae of the nematode *Anguillicola crassus* in European eels *Anguilla anguilla* during an artificial infection. Three hundred young (I-g) elvers were fed the copepod *Paracyclops fimbriatus* infected with nematode larvae. At different time intervals, groups of 10 eels were sampled and preserved in Bouin Hollande for histological survey. The last sampling took place six months after infection. The nematodes used a direct migration route through the intestinal wall and body cavity into the swim bladder. Within 17h after infection, migrating larvae had already reached the swim bladder. Within 3 months after infection, the next larval stage was found. Preadult larvae were found within 4 months after infection. Our experimental results generally agree with findings on the life cycle of *Anguillicola* spp. in Japanese eels *Anguilla japonica*. However, the parasite can show aberrant migration paths in European eels. The pathological phenomena after this single experimental infection appeared less severe than after natural infections.

ANTHELMINTIC RESISTANCE

Studies on an *Ostertagia ostertagi* strain suspected to be resistant to benzimidazoles

F.H.M. Borgsteede, S. Geerts*, R. de Deken*, V. Kumar*, J. Brandt*

Veterinary parasitology 41, 1992, 85-92

Four calves were infected with a susceptible (laboratory) strain of *Ostertagia ostertagi* and four with a field strain suspected to be resistant to benzimidazoles. After 25 days two calves from each group were treated with 3.5 mg kg⁻¹ fenbendazole. Egg output fell to zero in all treated calves. Treated calves did not harbour worms at slaughter 35 days after infection. Significant differences between the strains were shown for ED₅₀ values for thiabendazole in the egg hatch assay, but not in the tubulin binding assay. It is concluded that benzimidazole resistance in the suspected strain cannot be confirmed.

ANTHELMINTIC RESISTANCE

World association for the advancement of veterinary parasitology (W.A.A.V.P.) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance

G.C. Coles*, C. Bauer*, F.H.M. Borgsteede, S. Geerts*, T.R. Klei*, M.A. Taylor*, P.J. Waller*

Veterinary parasitology 44, 1992, 35-44

Methods have been described to assist in the detection of anthelmintic resistance in strongylid nematodes of ruminants, horses and pigs. Two tests are recommended, an *in vivo* test, the faecal egg count reduction test for use in infected animals, and an *in vitro* test, the egg hatch test for detection of benzimidazole resistance in nematodes that hatch shortly after embryonation. Anaerobic storage for submission of faecal samples from the field for use in the *in vitro* test is of value and the procedure is described. The tests should enable comparable data to be obtained in surveys in all parts of the world.

ASCARIS SUUM

***Ascaris suum*-infecties als oorzaak van klinische problemen bij runderen?**

Ascaris suum-infections causing clinical problems in cattle?

F.H.M. Borgsteede, W.A. de Leeuw, Th. Dijkstra*, G. Alisma*, W. de Vries*

Tijdschrift voor diergeneeskunde 117, 1992, 296-298.

Op twee bedrijven waar zowel melkkoeien als varkens werden gehouden vertoonden de melkkoeien in het voorjaar van 1991 een plotselinge daling in de melkgift, een verhoogde ademhalingsfrequentie en soms ook hoesten. Het bleek dat de koeien hadden gegraasd op met varkensdrijfmest bemeste percelen. Het laboratoriumonderzoek van een aantal dieren uit beide koppels toonde aan dat eosinofilie aanwezig was en dat er hoge ELISA-titers van antilichamen tegen *Ascaris suum* konden worden gemeten. De klinische verschijnselen verdwenen op het ene bedrijf na behandeling met oxfendazole, op het andere bedrijf na enige tijd spontaan.

FASCIOLA HEPATICA

Comparison of an indirect haemagglutination assay and an ELISA for diagnosing *Fasciola hepatica* in experimentally and naturally infected sheep

J.B.W.J. Cornelissen, W.A. de Leeuw, P.J. van der Heijden

Veterinary quarterly 14, 1992, 152-156

An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) with somatic (S) or excretory-secretory antigens (ES) was compared with an indirect haemagglutination assay (IHA) for ability to detect antibodies against *Fasciola hepatica* in sheep. The specificity of both assays was determined by testing sera collected from sheep experimentally or naturally mono-infected with *Fasciola hepatica*, *Haemonchus contortus*, *Ostertagia circumcincta*, *Cooperia curticei*, *Taenia ovis*, *Eimeria* spp., *Trichostrongylus vitrinus*, *Trichostrongylus colubriformis* or *Nematodirus battus* respectively. With S or ES antigens the specificity of the ELISA was 98% or 95% respectively, whereas the specificity of the IHA was 86%. Antibodies directed against *Fasciola hepatica* were detected by the ELISA with S or ES antigens from 2 weeks after infection until the end of the experiment, whereas the IHA detected antibodies from week 3. We conclude that the ELISA with S antigens compares favourably with the IHA and can be used for the serodiagnosis of ovine fasciolosis in the Netherlands.

An epidemiological study of *Fasciola hepatica* in the Netherlands

C.P.H. Gaasenbeek, H.J. Over, N. Noorman, W.A. de Leeuw

Veterinary quarterly 14, 1992, 140-144

Transmission of *F. hepatica* under natural conditions was analysed in a three year programme. The variables used were the indirect haemagglutination (IHA) technique, worm establishment in tracer lambs and the population dynamics, infection rate and shedding pattern of *Lymnaea truncatula*.

It is concluded that fluke eggs, infected snails and metacercariae on herbage can survive the winter in the Netherlands. Metacercarial availability was positively correlated to the amount of rainfall in the grazing period. The role of developed eggs that survive the winter is important, because this results in earlier infections in the herd.

The use of the serological diagnosis method IHA is important to detect *F. hepatica* infection in an early stage. Use of cellophane paper on floats is a useful method for determining the shedding pattern of cercariae from *L. truncatula*. It is concluded that collection of metacercariae on cellophane floats, inventarization of *L. truncatula* and its infection level are useful tools for the prediction of liverfluke infections.

LUNGWORM INFECTIONS

***Dictyocaulus viviparus* in calves: effect of rotational grazing on the development of infections**

M. Eysker*, J.H. Boersema*, J.B.W.J. Cornelissen, F.N.J. Kooyman*, W.A. de Leeuw

Veterinary parasitology 41, 1992, 127-135

A study was made of the possibility of reducing lungworm infections in young grazing calves by rotational grazing for weekly periods on six paddocks. For this purpose three groups of four calves each were grazed on separate pastures in 1989, whereas a fourth group served as a permanently housed control group. Two groups of calves were infected experimentally with six doses of 10 larvae of *Dictyocaulus viviparus* during the first 3 weeks on pasture. In the third group, low natural infections with overwintered larvae occurred. One of the experimentally infected groups was rotationally grazed for weekly periods on six small plots while both other groups were set-stocked. Faecal larval counts and worm counts in tracer calves demonstrated lower lungworm infections in the rotationally grazed group than in both set-stocked groups. However, the numbers of worms found after challenge infection and subsequent necropsy were relatively high in the rotationally grazed group, indicating that development of immunity was less than in both other groups. Owing to the dry weather conditions in the summer of 1989, no serious clinical signs of husk developed in any of the three groups. These dry conditions, however, did not prevent the build-up of heavy pasture infectivity with gastro-intestinal nematodes resulting in heavy worm burdens and serious clinical signs in tracer calves grazing for 4 days in August and September-October, respectively. This implies that rotational grazing did not have a clear effect on build-up of gastro-intestinal nematode infections.

MUSCLE / NERVE

K⁺-channel blockers do not decrease acetylcholine depolarizations in canine trachealis

E.E. Daniel*, J. Jury*, R. Serio*, L.P. Jager

Canadian journal of physiology and pharmacology 70, 1992, 43-52

Using the double sucrose gap, we have examined the role of K⁺ channels in the cholinergic depolarizations in response to field stimulation and acetylcholine (ACh) in canine trachealis. Acetylcholine-like depolarization *per se* decreased electrotonic potentials from hyperpolarizing currents. The net effect of acetylcholine (10⁻⁶ M) depolarization on membrane conductance was a small increase after the depolarization was compensated by current clamp. Reversal potentials for acetylcholine depolarization and for the excitatory junction potential (EJP) were determined by extrapolation to be 20-30 mV positive to the resting potential, previously shown to be approximately -55 mV. They were shifted positively by tetraethylammonium ion (TEA) at 20 mM or Ba²⁺ at 1 mM. TEA or Ba²⁺ initially depolarized the membrane and increased membrane resistance. Repolarization of the membrane restored any reductions in EJP amplitudes associated with depolarization. After 15 min, the membrane potential partially repolarized, and acetylcholine-induced depolarization and contractions were then increased by TEA. 4-Aminopyridine depolarized the membrane but decreased membrane resistance.... K⁺-channel closure cannot be a complete explanation of acetylcholine-induced membrane effects of this tissue. Acetylcholine must have increased the conductance of an ion with a reversal potential positive to the resting potential in addition to any effect to close K⁺-channels.

INTOXICATIONS

Lead intoxication in cattle: a case report

A.J. Baars*, H. van Beek, I.J.R. Visser*, G. Vos*, W. van Delft*, G. Fennema*, G.W. Lieben*, K. Lautenbag*, J.H.M. Nieuwenhuijs*, P.A. de Lezenne Coulander*, F.H. Pluimers*, G. van de Haar*, Tj. Jorna*, L.G.M.Th. Tuinstra*, P. Zandstra*, B. Bruins Jzn*

Food additives and contaminants 9, 1992, 357-364

During the autumn of 1989 a feed contamination induced a widespread lead intoxication of cattle in the northern provinces of The Netherlands (Groningen and Friesland). Over 300 farms were involved, affecting about 15500 animals (mostly dairy cattle). For a period of one to four weeks these animals took up a thousand kg of lead. This resulted in lead levels in milk, livers, and kidneys above the regulatory safety limits. Due to the chelating therapy, which was rapidly applied by the local veterinarians, only about 30 animals died of an acute lead intoxication. A joint action of the governmental and private authorities prevented exposure of consumers to lead-contaminated animal products. Based on observations, measurements and literature data, predictions were made of the lead levels to be expected in animal products and the time needed for depletion of these levels. The appropriate animals were ear-tagged to ensure their identification, and the decline in time of the lead levels in milk and offals was conscientiously monitored. In the second week of 1990 the lead concentrations were decreased to levels well below the regulatory limits, and hence the tags were removed. The present paper reports our observations and conclusions, especially regarding treatment, predictions and outcome of this incident.

Lead and cadmium in birds in the Netherlands: a preliminary survey

L.C.M.P. Hontelez, H.M. van den Dungen, A.J. Baars

Archives of environmental contamination and toxicology 23, 1992, 453-456

Three birds species (*Buteo buteo*, *Ardea cinerea*, and *Somateria mollissima*) from the Netherlands were investigated for lead and cadmium concentrations using kidneys, livers and tibiae. A major purpose of this study was to gain insight into the exposure of the birds in the Netherlands to the two heavy metals. Secondly, the use of these birds as biomonitors for environmental pollution was studied.

Common eiders contained a higher cadmium load in liver and kidney than buzzards and grey herons. Additionally, they contained a higher lead burden in bone than grey herons.

The three bird species, all standing at the end of a different food chain, seem appropriate indicators for environmental contamination with heavy metals.

INTOXICATIONS

Sterfte van rundvee na het voeren van beschimmelde bloembollen

Death of cattle fed mouldy flower bulbs

N.H.M.T. Peperkamp*, E. Gruys*, A. Joosten*, H. Peeters*, J. Sybesma*, S.H.W. Notermans*, J. Haagsma

Tijdschrift voor diergeneeskunde 117, 1992, 165-168

In een koppel vee vonden vijf van de acht dieren plotseling de dood zonder vooraf waargenomen ziekteverschijnselen. De peracute sterfte werd in verband gebracht met het voeren van beschimmelde tulpenbollen.

Een kort overzicht wordt gegeven van het gebruik van bloembollen als veevoeder, de toepassing van bestrijdingsmiddelen in de bloembollenteelt en de daarmee samenhangende wetgeving.

Diverse toxicologische aspecten, waarmee men bij het voeren van bloembollen aan rundvee rekening moet houden, worden in dit artikel nader belicht.

Zowel het CDI-DLO als het RIVM toonden in een muizenproef een toxine aan in het extract van de beschimmelde tulpebollen. Dit toxine is waarschijnlijk geproduceerd door de in de bloembollen aanwezige schimmels. De dood van de dieren is zeer waarschijnlijk te wijten aan een niet nader geïdentificeerd mycotoxine.

Increased metallothionein in the liver and kidney of patients with amyotrophic lateral sclerosis

P.A.E. Sillevius-Smitt*, H. van Beek, A.J. Baars, D. Troost*, E.S. Louwerse*, A.C.M. Kroops-Hermus, F.A.S. de Wolff*, J.M.B.V. de Jong*

Archives of neurology 49, 1992, 721-724

To evaluate the putative role of metals and trace elements in the pathogenesis of classic amyotrophic lateral sclerosis, we studied the metallothionein levels in liver and kidney samples obtained at autopsy from 24 patients with amyotrophic lateral sclerosis and 18 controls. To assay metallothioneins and copper, cadmium, and zinc bound to metallothioneins, we used high-performance liquid chromatography directly coupled to flame atomic absorption spectrometry. Total cadmium, zinc and copper concentrations were determined separately with the use of graphite furnace atomic absorption spectrometry with Zeeman background correction. The median liver metallothionein level was 60.3 mg/kg (range, 9 to 318 mg/kg) in the patients with amyotrophic lateral sclerosis and 12.6 mg/kg (range, 0 to 104.5 mg/kg) in the controls. In the kidney, median metallothionein levels were 126.9 mg/kg (range, 44 to 387 mg/kg) in the patients with amyotrophic lateral sclerosis and 64 mg/kg (range, 13.1 to 187 mg/kg) in the controls. Total zinc, cadmium, and copper concentrations, as measured by atomic absorption spectrometry, were not significantly different in patients vs controls. Our finding of elevated metallothionein levels in organs from patients with amyotrophic lateral sclerosis may indicate an increased exposure to metals.

INTOXICATIONS

Loodintoxicatie bij rundvee in Noord-Nederland: Vervolgonderzoek bij twee bedrijven

Lead intoxication of cattle in the northern part of the Netherlands: Follow up study on cattle of two dairy farms

A. Wijbenga*, F.R. van der Kolk*, I.J.R. Visser*, A.J. Baars

Tijdschrift voor diergeneeskunde 117, 1992, 78-81

Bij twee melkveebedrijven is de nasleep van een loodvergiftiging door gecontamineerd voer in beeld gebracht. Een aantal kalveren en koeien werd tot een half jaar na het optreden van het incident in oktober 1989 gevolgd. De klinische toestand werd beoordeeld en het loodgehalte en het zinkprotoporfyrinegehalte (ZPP) in het bloed werden bepaald. Dieren van het meest getroffen bedrijf vertoonden duidelijke gevolgen van de loodvergiftiging, namelijk blindheid, ongecoördineerde bewegingen en schrikachtigheid. Twee dieren stierven. Uiteindelijk moest veertig procent van de koeien van het bedrijf worden opgeruimd. De ZPP-gehalten in bloed van kalveren van het bedrijf waren na zes maanden nog licht verhoogd. De ZPP-gehalten correspondeerden beter met de klinische beelden dan de bloedloodwaarden. De dieren waarbij het ZPP-gehalte lager dan 3 mg/l RBC bleef, vertoonden geen blijvende effecten van de loodvergiftiging. De bepaling van het ZPP-gehalte in bloed kan gebruikt worden voor de voorspelling van de gevolgen van een loodintoxicatie.

VACCINES

Risks connected with the use of conventional and genetically engineered vaccines

T.G. Kimman

Veterinary quarterly 14, 1992, 110-118

A review is given of real and potential risks connected with the use of conventional and genetically engineered live and dead vaccines. Special attention is given to live carrier vaccines expressing one or more heterologous genes of other microorganisms. Because most carrier vaccines are still in an experimental phase, there is only limited experience with the risks of carrier vaccines. There are three potential risks of live carrier vaccines which will be discussed:

- changes in cell, tissue, of host tropism, and virulence of the carrier through the incorporation of foreign genes;
- exchange of genetic information with other vaccine or wildtype strains of the carrier organism;
- spread in the environment.

Only limited experimental data available on changes in biological behaviour of microorganisms through the incorporation of foreign genes. For example, there are indications that vaccinia virus carrying the attachment protein G of respiratory syncytial virus (RSV) replicates better in lungs of mice than vaccinia virus carrying other genes of RSV. Poxviruses carry genes that probably determine their replication in different hosts. Exchange of such host tropism genes might alter their host spectrum. Recombination between herpesvirus vaccine or wildtype strains may lead to the appearance of virulent strains with or without heterologous genes. Before carrier vaccines are applied, these risks must be thoroughly evaluated case-by-case. Potential methods for the design of safe carrier vaccines are discussed.

AUJESZKY'S DISEASE VIRUS / PSEUDORABIES VIRUS

Effects of replacing the promoter of the immediate early gene with the promoter of *Drosophila* heat-shock gene HSP70 on the growth and virulence of pseudorabies virus

K. Glazenburg, A. Gielkens, R. Moormann

Veterinary microbiology 33, 1992, 35-43

We investigated whether altering control of expression of an essential gene of pseudorabies virus (PRV) influences virus replication and virulence. The PRV immediate early (IE) gene was selected as a target, and its promoter was replaced with the promoter of the heat-shock gene HSP70 of the fruit fly *Drosophila*. The HSP70 promoter was selected because it is well characterized and can be induced in a broad range of eukaryotic cell lines at temperatures around 42°C. Overlap recombination was used to construct the NIA-3-HSP mutant virus. When stocks of the recombinant virus were titrated at 42°C, virus titres were 100 times higher than titres obtained at 37°C. Once replication began, however, the rate of growth of the mutant NIA3-HSP was equal at both temperatures. When wild-type virus was titrated at both temperatures, titres were identical. Mice that were infected with the mutant virus had a longer mean-time-to-death than those infected with the wild-type virus. Thus, the mutant virus was considered to be less virulent. We conclude that replication and virulence of PRV can be modified by altering control of expression of the viral IE gene.

Comparative efficacy of three doses of the genetically engineered Aujeszky's disease virus vaccine strain 783 in pigs with maternal antibodies

T.G. Kimman

Vaccine 10, 1992, 363-365

Pigs with low levels of maternally derived antibodies were vaccinated twice intramuscularly with 10^5 , $10^{5.5}$, or 10^6 plaque forming units (p.f.u.) of the genetically engineered Aujeszky's disease virus (ADV) vaccine strain 783. Strain 783 has deletions in genes encoding glycoprotein gI and thymidine kinase. All vaccinated pigs showed a high level of protection against clinical disease after challenge infection with virulent ADV. Vaccination also reduced virus excretion. The daily mean virus excretion and the mean number of days with virus excretion, fever, mild clinical signs, and growth retardation were higher in pigs vaccinated with 10^5 than in pigs vaccinated with $10^{5.5}$ or 10^6 p.f.u. of strain 783.

AUJESZKY'S DISEASE VIRUS / PSEUDORABIES VIRUS

Measurement of isotype-specific antibody responses to Aujeszky's disease virus in sera and mucosal secretions of pigs

T.G. Kimman, R.A.M. Brouwers, F.J. Daus, J.T. van Oirschot, D. van Zaane

Veterinary immunology and immunopathology 31, 1992, 95-113.

Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) for the detection of porcine IgM, IgA, IgG1 and IgG2 antibodies directed against Aujeszky's disease virus (ADV) are described. ADV-specific IgA and IgM were detected in an antibody capture assay, and ADV-specific IgG1 and IgG2 were detected in an indirect double antibody sandwich assay. A selected set of samples was tested in the four ELISAs and in a 24h virus neutralization assay. Comparison of the results showed that the ELISAs were isotype-specific, sensitive, and reproducible. Samples with ADV antibody of one isotype showed that ADV-specific IgG1, IgG2 and IgM were able to neutralize the virus in vitro. In vitro neutralization of virus can be enhanced by complement. ADV-specific IgA neutralized virus only weakly. ADV-infected cells activated complement in the absence of antibody. Specific IgG2 and IgM enhanced complement activation. Analysis of the time course of antibody responses after infection or vaccination revealed that the isotype-specific ELISAs are suitable to study the humoral antibody response of pigs to the virus in mucosal secretions. Wild-type virus (strain NIA-3) and an attenuated vaccine strain (Bartha) administered intranasally induced mucosal IgM and IgA responses to the virus. In contrast, a killed vaccine (Nobivac) administered intramuscularly induced only weak mucosal IgM responses. The attenuated vaccine strain primed for a mucosal IgA memory response evoked upon challenge infection with wild-type virus.

Role of memory B-cell responses in serum and mucosal fluids of swine for protective immunity against pseudorabies virus

T.G. Kimman, N. Oei-Lie, D. van Zaane

American journal of veterinary research 53, 1992, 1992-1998

We examined primary and memory isotype-specific antibody responses directed against pseudorabies virus in serum and mucosal fluid of pigs with and without passively acquired maternal antibody, and we studied the relationship between these responses and protection against virus challenge. Pigs were inoculated intranasally with the virulent NIA-3 strain or the avirulent Bartha strain, or they were inoculated IM with an inactivated vaccine containing the Phylaxia strain. Ten weeks later, all pigs were challenge-exposed intranasally with strain NIA-3. Only pigs that were without passively acquired antibody at the time they were inoculated with virulent virus appeared to have complete protective immunity against challenge exposure, as evidenced by lack of clinical signs of pseudorabies and lack of virus excretion. In contrast, pigs inoculated with strain Bartha or with the inactivated vaccine developed fever, had a period of growth arrest, and excreted virus after challenge exposure. In pigs without passively acquired antibody, intranasal inoculation with strains NIA-3 or Bartha was followed by primary IgM and IgA responses in serum and in oropharyngeal fluid as well as primary IgG1 and IgG2 responses in serum. (ABSTRACT TRUNCATED).

AUJESZKY'S DISEASE VIRUS / PSEUDORABIES VIRUS

Role of different genes in the virulence and pathogenesis of Aujeszky's disease virus

T.G. Kimman, J.M.A. Pol, N. de Wind*, N. Oei-Lie, A.J.M. Berns*, A.L.J. Gielkens

Veterinary microbiology 33, 1992, 45-52

In this study the role of different genes located in the unique short region of the genome of Aujeszky's disease virus was examined. Inactivation of the genes encoding the protein kinase (PK), gp63, and gI reduced virulence of the virus for pigs, in contrast to inactivation of the genes encoding the 28 kDa protein, and gX. There was no correlation between virulence and virus multiplication *in vitro* or in the oropharynx *in vivo*. The morphogenesis of the PK mutant was altered. The gI mutant replicated to normal titres in the oropharynx and could be recovered from the trigeminal ganglia but not from other parts of the central nervous system, suggesting that gI facilitates the spread of the virus from neuron to neuron. All mutants induced neutralizing antibody and complete or partial protection against a challenge infection. PK and gp63 were required for the induction of complete protection, although these proteins are reportedly not targets for neutralizing antibody or cytotoxic T cells.

Contribution of single genes within the unique short region of Aujeszky's disease virus (suid herpesvirus type 1) to virulence, pathogenesis and immunogenicity

T.G. Kimman, N. de Wind*, N. Oei-Lie, J.M.A. Pol, A.J.M. Berns*, A.L.J. Gielkens

Journal of general virology 73, 1992, 243-251

Pigs (3 and 10 weeks old) were infected intranasally with Aujeszky's disease virus (ADV) mutants that functionally lacked one of the non-essential genes in the unique short region of the genome (except the gene encoding the 11K protein). Virus excretion in oropharyngeal fluid and disease symptoms were monitored. Some pigs were killed to study pathogenesis, whereas others were challenged with virulent ADV 8 weeks after the primary infection. Mutants lacking protein kinase, or glycoproteins gp63 or gI showed reduced virulence, but mutants lacking gX or the 28K protein showed normal virulence. Glycoprotein gI appears to affect the tissue tropism of ADV in pigs, presumably by facilitating the spread of the virus through the central nervous system.

In this study, there was no correlation between virulence and virus multiplication in either cultured cells or in the oropharynx *in vivo*. All mutants induced neutralizing antibody and complete or partial protection against challenge infection. Complete protection was obtained by inoculation with the gI and gX mutants, whereas incomplete protection was obtained using gp63 and protein kinase mutants. Complete clinical and virological protection was associated with the absence of secondary antibody responses in the serum.

AUJESZKY'S DISEASE VIRUS / PSEUDORABIES VIRUS

Glycoprotein H of pseudorabies virus is essential for entry and cell-to-cell spread of the virus

B. Peeters, N. de Wind*, R. Broer, A. Gielkens, R. Moormann

Journal of virology 66, 1992, 3888-3892

To study the function of the envelope glycoprotein gH of pseudorabies virus, a gH null mutant was constructed. A premature translation termination codon was introduced in the gH gene by linker insertion mutagenesis, and a mutant virus was rescued by using a cell line that express the wild-type protein. Mutant virus isolated from complementing cells was unable to form plaques on noncomplementing cells, indicating that gH is essential in the life cycle of the virus. Immunological staining and electron microscopy showed that the mutant virus produced noninfectious progeny and was unable to spread from infected to uninfected cells by cell-cell fusion. Thus, similar to gH of herpes simplex virus, gH of pseudorabies virus is required for entry and cell-to-cell spread.

Pseudorabies virus envelope glycoproteins gp50 and gII are essential for virus penetration, but only gII is involved in membrane fusion

B. Peeters, N. de Wind*, M. Hooisma, F. Wagenaar, A. Gielkens, R. Moormann

Journal of virology 66, 1992, 894-905

To investigate the function of the envelope glycoproteins gp50 and gII of pseudorabies virus in the entry of the virus into cells, we used linker insertion mutagenesis to construct mutant viruses that are unable to express these proteins. In contrast to gD mutants of herpes simplex virus, gp50 mutants, isolated from complementing cells, were able to form plaques on noncomplementing cells. However, progeny virus released from these cells was noninfectious, although the virus was able to adsorb to cells. Thus, the virus requires gp50 to penetrate cells but does not require it in order to spread by cell fusion. This finding indicates that fusion of the virus envelope with the cell membrane is not identical to fusion of the cell membranes of infected and uninfected cells. In contrast to the gp50 mutants, the gII mutant was unable to produce plaques on noncomplementing cells. Examination by electron microscopy of cells infected by the gII mutant revealed that enveloped virus particles accumulated between the inner and outer nuclear membranes. Few noninfectious virus particles were released from the cell, and infected cells did not fuse with uninfected cells. These observations indicate that gII is involved in several membrane fusion events, such as (i) fusion of the viral envelope with the cell membrane during penetration, (ii) fusion of enveloped virus particles with the outer nuclear membrane during the release of nucleocapsids into the cytoplasm, and (iii) fusion of the cell membranes of infected and uninfected cells.

AUJESZKY'S DISEASE VIRUS / PSEUDORABIES VIRUS

Round table on control of Aujeszky's disease and vaccine development based on molecular biology

M. Pensaert*, A.L.J. Gielkens, B. Lomniczi*, T.G. Kimman, P. Vannier*, M. Eloit*

Veterinary microbiology 33, 1992, 53-67

A summary is given on the 4 topics which were discussed during the round table and which represent current knowledge on the molecular biology of Aujeszky's disease (pseudorabies) virus. They include a review on 1. the genome and gene products of the virus; 2. the viral genes associated with virulence; 3. the immunological role of the viral gene products and 4. studies intended to compare the efficacy of several commercially available vaccines and to establish a possible correlation between antibodies against individual structural viral proteins and degree of protection.

It was concluded that gl deleted vaccines appear to be the best choice for use in intensive vaccination programmes towards eradication of Aujeszky's disease virus. However, there remains a need for development of more potent vaccines which induce strong humoral and cell mediated immune responses and afford complete protection, virological protection included. It is often observed that live vaccine strains which are completely avirulent lose much capacity to replicate and spread within the vaccinated animal. It is, however, not excluded that a certain degree of dissemination may be needed to be fully efficacious. Loss of virulence may thus be accompanied by too much loss of immunogenicity. An improved genetic stability of live vaccine strains when they are obtained by genetic manipulation, possibly justifies a more widespread dissemination of the vaccine strain in the body compared to that with conventionally developed strains or compared to what is presently allowed.

Immunological risk indicators for morbidity and mortality in ADV challenged pigs with and without climatic stress

C.J.M. Scheepens*, E.J. Hensen*, T.G. Kimman, H.J.F. van der Heijden*, M.J.C. Hessing*, M.W.A. Versteegen*, M.J.M. Tielen*

In: Effects of draught as climatic stress or on the health status of weaned pigs / C.J.M. Scheepens. - Thesis : University of Utrecht, 1991, Chapter 7, pp. 117-136

Two experiments were performed to study the effect of climatic stress (i.e. daily and intermittent daily unpredictable draught) during the weaning period (5-10 wks) on the health status of weaned pigs. Finally, pigs were exposed to an artificial Aujeszky's disease virus (ADV)-challenge at about ten weeks of age to test for differences in specific disease susceptibility possibly related to climatic stress.

Logistic regression was used to develop models relating morbidity and mortality both before and after the ADV-challenge with supposed risk indicators.

Risk indicators for morbidity before ADV-challenge were:

exposure to unpredictable draught, a particular MHC-haplotype (defined HF38/DF3), blood eosinophilia and neutrophilia. No mortality before ADV-challenge was observed. Another MHC-haplotype HF16/DF4 was increased in the healthy population.

No relation between severity of Aujeszky's disease and climatic stress (i.e. exposure to unpredictable draught) was observed. (ABSTRACT TRUNCATED).

AUJESZKY'S DISEASE VIRUS / PSEUDORABIES VIRUS

The pseudorabies virus homolog of the herpes simplex virus UL21 gene product is a capsid protein which is involved in capsid maturation

N. de Wind*, F. Wagenaar, J. Pol, T. Kimman, A. Berns*

Journal of virology 66, 1992, 7096-7103

We mutagenized, mapped, and sequenced the pseudorabies virus (PRV) homolog of gene UL21 of herpes simplex virus type 1. A polyclonal mouse antiserum against the protein encoded by the UL21 homolog was generated and used to monitor the expression and subcellular localization of the UL21-encoded protein. We found that the protein is identical to a previously detected PRV capsid protein. We analyzed viable PRV strains encoding mutant UL21 homologs, truncated by insertion of an oligonucleotide that contains stop codons in all reading frames. In two PRV mutants carrying the oligonucleotide at two sites within the gene, processing of newly replicated viral DNA was impaired. In addition, we show that one of the UL21 mutants has strongly reduced virulence for mice.

Mutagenesis and characterization of a 41 kilobase pair region of the pseudorabies virus genome

N. de Wind*, A. Zijderveld*, T. Kimman, A. Berns*

In: Mutagenesis and characterization of large subgenomic regions of pseudorabies virus / Niels de Wind. - Thesis : University of Amsterdam, 1992. - Chapter 4, pp. 39-71

Pseudorabies virus (PRV) is an alphaherpesvirus, related to the human alphaherpesviruses herpes simplex virus 1 and 2 (HSV-1 and HSV-2), and varicella-zoster virus (VZV) (Roizman, 1982; Ben-Porat and Kaplan, 1985). In contrast to its human relatives, little is known about gene structure and function in PRV. An efficient way to gain insight in gene structure and function of PRV is by oligonucleotide insertion mutagenesis of a large cloned segment of the viral genome (de Wind *et al.*, 1990), followed by reconstitution of mutant virus strains by cotransfection of the mutant DNA fragment with overlapping cloned viral fragments, together comprising the entire viral genome (van Zijl *et al.*, 1988). This procedure results in a series of mutant virus strains in a single experiment, greatly facilitating the search for genes involved in virulence and pathogenicity of the virus. The inserted oligonucleotide does probably not influence the expression of genes located on overlapping transcripts as may be the case when large deletions or insertions are introduced. In addition, the unique *EcoRI* site present in the inserted oligonucleotide facilitates both mapping of the site of insertion of the oligonucleotide and the further manipulation of the mutagenized region of the viral genome. (ABSTRACT TRUNCATED).

AVIAN INFLUENZA VIRUS

Klassieke vogelpest en mildere influenza-infecties bij vogels en zoogdieren

Classic fowl plague (avian influenza) and milder influenza infections in birds and mammals

G.F. de Boer, C. van Maanen, J.T. Siebinga, W. Back

Tijdschrift voor diergeneeskunde 117, 1992, 735-740

Het wilde watergevoegelte wordt momenteel beschouwd als het grootste reservoir voor de diverse hemagglutinine- (H) en neuraminidase- (N) subtypen van influenzavirus. Tot dusver werden bij watervogels dertien verschillende H-typen en negen verschillende N-typen onderkend. Virustransmissie van vogels naar andere diersoorten en naar de mens levert in eerste instantie weinig gevaar op. Echter door kleine veranderingen op moleculair niveau kan een bepaald HN-subtype plotseling een virulent karakter krijgen voor de nieuwe gastheer, hetgeen recent bij kippen geschiedde. Door "genetic reassortment" kan uitwisseling van genfragmenten coderend voor hemagglutinine of neuraminidase optreden. Dit verschijnsel heeft belangrijke epidemiologische consequenties als het in de varkensstapel optreedt. Nieuwe influenza-epidemieën bij de mens vonden steeds hun oorsprong in gebieden waar watervogels, varkens en mensen dicht op elkaar leven. De serologische diagnostiek van influenza A infecties kan nu ook worden uitgevoerd met een blokkerings-ELISA en de virologische diagnostiek met een antigeendetektie-ELISA. In deze testen is de immunologische reactie gericht tegen een geconserveerde antigene determinant van het influenza A-nucleoproteïne. Met deze testen kan de influenzadiagnostiek bij diverse diersoorten worden vereenvoudigd, met name bij de species waarbij verschillende H- en N-subtypen voorkomen. Bij varkenssera treedt echter aspecifieke reactiviteit op.

AVIAN LEUKOSIS VIRUS

Detection of proviral DNA and viral RNA in various tissues early after avian leukosis virus infection

P.A.M. van Woensel*, A. van Blaaderen, R.J.M. Moormann, G.F. de Boer

Leukemia 6, 1992, S135-S137

Using molecular biological techniques, a study was made of tissue tropism of avian leukosis virus (ALV) early after infection. Two strains of chickens, one with and the other without endogenous viral genes, were infected with ALV of subgroup A immediately after hatching: specimens of nine tissues and blood samples were analyzed at various times thereafter. A polymerase chain reaction (PCR), specific to ALV subgroup A, was used to detect proviral DNA and viral RNA. In *situ* hybridization was used to confirm the presence of proviral DNA in tissue samples and to calibrate the PCR. The pattern of detection of proviral DNA and of ALV-RNA in the various tissues was similar for both chicken strains. At 2 weeks of age, ALV-RNA was demonstrated in all tissues tested: bursa of Fabricius, thymus, bone marrow, proventriculus, liver spleen, kidney, muscle, gonads and blood samples, and at 4 weeks of age all tissues contained proviral DNA. No tropism for a specific tissue was observed early after an ALV infection.

BOVINE VIRAL DIARRHEA VIRUS

Application of the polymerase chain reaction to the detection of bovine viral diarrhea virus infections in cattle

B.J.L. Hooft van Iddekinge, J.L.B. van Wamel, H.G.P. van Gennip, R.J.M. Moormann

Veterinary microbiology 30, 1992, 21-34

We used the polymerase chain reaction (PCR) technique to detect bovine viral diarrhea virus (BVDV) infections in cattle. Of 120 cattle screened in this study, 29 were scored positive for BVDV with both PCR and conventional virus isolation. Ninety cattle were negative in both assays. One cow was scored positive for BVDV with the PCR but was negative with virus isolation. In dilution experiments PCR analysis was at least 10 times more sensitive than BVDV isolation.

CHICKEN ANEMIA VIRUS

Susceptibility of thymocytes for infection by chicken anemia virus is related to pre- and posthatching development

S.H.M. Jeurissen, M.E. Janse, D.J. van Roozelaar, G. Koch, G.F. de Boer

Developmental immunology 2, 1992, 123-129

To investigate the age-dependent mechanism of susceptibility for chicken anemia virus (CAV) infection, we inoculated embryos and chickens of ages between day 9 of embryonic development and day 28 after hatching with CAV. Chicken embryos inoculated at day 9 and 11 of development showed no CAV-infected cells in the thymus, nor in other lymphoid organs. Many CAV-infected cells were detected in the thymic cortex of all chicken embryos inoculated at days 13 and 16 of development and of all chickens inoculated 1, 3, and 7 days after hatching. All embryos and chickens that contained CAV-infected cells in the thymus also contained CAV-infected cells in the bone marrow, but not in the bursa of Fabricius or the spleen. In chickens inoculated at days 14 and 21, only few CAV-infected cells were detected in the thymus, whereas these cells were not detected in thymi of 28-day-old inoculated chickens. Depletion of the thymic cortex was only detected in chickens inoculated from day 16 of embryonic development till day 21 after hatching. Only hematocrit values of the chickens inoculated 1 and 3 days after hatching were below normal. The rationale for the simultaneous susceptibility of cells of the T-cell lineage and cells of the erythrocyte lineage is discussed. As far as the thymus is concerned, the absence of clinical and microscopical signs of CAV infection in older chickens and the inability of CAV to infect embryos at days 9 and 11 of embryonic development may be caused by a lack of susceptible thymocytes. In view of the three waves of thymic precursor cells that populate the thymus during ontogeny, as described by Le Douarin and colleagues, we hypothesize that CAV only infects thymocytes derived from the second wave of precursor cells.

CHICKEN ANEMIA VIRUS

Chicken anemia virus causes apoptosis of thymocytes after *in vivo* infection and of cell lines after *in vitro* infection

S.H.M. Jeurissen, F. Wagenaar, J.M.A. Pol, A.J. van der Eb*, M.H.M. Neteborn*

Journal of virology 66, 1992, 7383-7388

After infection of 1-day-old-chickens, chicken anemia virus (CAV) causes a complete depletion of the thymic cortex by day 14. Since cell death can be caused either by necrosis or by apoptosis, we investigated which type of cell death occurs after *in vivo* and *in vitro* infections with CAV. Using electron microscopy and biochemical methods, we demonstrated that CAV induces apoptosis of cortical thymocytes after *in vivo* infection and of lymphoblastoid cell lines after *in vitro* infection. At day 13 after *in vivo* infection, virus-like particles were detected in apoptotic bodies that were absorbed by epithelial cells. These results show that apoptosis, a phenomenon that has been observed for a few other viruses, is also an important phenomenon during the pathogenesis of CAV.

Transcription of the chicken anemia virus (CAV) genome and synthesis of its 52-kDa protein.

M.H. Neteborn*, O. Kranenburg*, A. Zanema*, G. Koch, G.F. de Boer, A.J. van der Eb*

Gene 118, 1992, 267-271

This paper describes the expression of the chicken anemia virus (CAV) genome, a recently characterized single-stranded circular-DNA virus of a new type [Neteborn *et al.*, J. Virol. 65 (1991) 3131-3139]. The major transcript from the CAV genome is an unspliced mRNA of about 2100 nucleotides (nt). Its transcription start point and poly(A)-addition site are located at nt 354 and 2317 of the CAV sequence, respectively. *In vitro* translation experiments provide evidence that the major CAV open reading frame encodes a 52-kDa protein by using the fifth AUG as a start codon of the unspliced CAV mRNA.

CHICKEN ANAEMIA VIRUS

Detection of chicken anaemia virus by DNA hybridization and polymerase chain reaction

M.H.M. Noteborn*, C.A.J. Verschueren*, D.J. van Roozelaar, S. Veldkamp, A.J. van der Eb*, G.F. de Boer

Avian pathology 21, 1992, 107-118

A clone containing the complete genome of chicken anaemia virus (CAV) was used in hybridizations with DNA from various field isolates of CAV. CAV DNA from all field isolates was detected in a polymerase chain reaction with oligonucleotides derived from the sequence of the cloned CAV DNA as primers. By way of Southern blot analysis with ^{32}P -labelled DNA probes derived from cloned CAV DNA, all field isolates were shown to contain DNA molecules of about 2.3 kb, i.e. the size of cloned CAV DNA. In a dot-blot assay it was demonstrated that non-radioactively-labelled cloned CAV DNA hybridized specifically to DNA from field isolates. The cloned CAV DNA is highly similar to the DNA of field isolates, as borne out by restriction-enzyme mapping. We conclude that our cloned CAV genome is representative for CAV in the field. The described PCR and hybridization techniques, may, therefore, be used for research and diagnosis of CAV infections.

EQUINE INFLUENZA VIRUS

Interference of maternal antibodies with the immune response of foals after vaccination against equine influenza

C. van Maanen, G. Bruin*, E. de Boer-Luijtz, G. Smolders*, G.F. de Boer

Veterinary quarterly 14, 1992, 13-17

The purpose of the study was twofold. First, using two groups of 22 foals each, we investigated the extend to which maternal antibodies interfere with the humoral response against equine influenza. The foals were born to mares that had been vaccinated twice yearly against influenza since 1982. Foals of group I were vaccinated three times at early ages (12, 16, and 32 weeks of age), and foals of group II were likewise vaccinated but at later ages (24, 28, and 44 weeks of age). After the first and second vaccinations, neither group showed an increase in antibodies that inhibit haemagglutination. Group II foals, however, had a significantly stronger antibody response against nucleoprotein after the second vaccination than the foals of group I. After the third vaccination, group II foals had a significantly stronger and longer lasting antibody response against haemagglutinin than the foals of group I. However, the antibody response to nucleoprotein was comparable in both groups.

Second, the foals of group II were studied to determine the persistence of maternal antibodies directed against a common nucleoprotein and haemagglutinin of two strains of equine influenza A virus. Biological half-lives of 39, 32, and 33 days were calculated for maternal antibodies directed against haemagglutinin of strains H7N7 Prague and H3N8 Miami, and against the nucleoprotein respectively.

Maternal antibody titres at the time of vaccination were closely related to the degree of interference with the immune response. Because even small amounts of maternal antibodies interfered with the efficacy of vaccination, we conclude that foals born to mares vaccinated more than once yearly against influenza virus should not be vaccinated before 24 weeks of age.

FOOT-AND-MOUTH DISEASE VIRUS

Proliferative lymphocyte responses to foot-and-mouth disease virus and three FMDV peptides after vaccination or immunization with these peptides in cattle

M.J.C. van Lierop*, K. van Maanen, R.H. Melen, V.P.M.G. Rutten*, M.A.C. de Jong*, E.J. Hensen*

Immunology 75, 1992, 406-413

We studied proliferative responses of bovine T lymphocytes to foot-and-mouth disease virus (FMDV) serotypes A, O and C as well as to three peptides including the two major B-cell epitopes of FMDV (VP1[141-156] and VP1[200-213]). Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from cattle previously vaccinated with monovalent vaccine responded to both homotypic and heterotypic virus strains. Of 14 FMDV-specific bovine T-cell clones, which were prepared from PBMC of an animal vaccinated with the trivalent vaccine, 11 reacted to each of the three serotypes A, O and C. This indicates that several T-cell epitopes might be conserved among these serotypes. PBMC from one of two cattle immunized with VP1[141-156]KLH, one of two cattle immunized with VP1[200-213]KLH and two of three cattle immunized with CC-VP1[200-213]-PPS-VP1[141-156]-PCG responded to the homotypic virus strain. After immunizations with VP1[200-213]KLH also heterotypic responses were found. Thus, it appears that these two B-cell sites include T-cell determinants that are recognized by some cattle. (ABSTRACT TRUNCATED).

INFECTIOUS BRONCHITIS VIRUS

Location of the amino acid differences in the S1 spike glycoprotein subunit of closely related serotypes of infectious bronchitis virus

D. Cavanagh*, P.J. Davis*, J.K.A. Cook*, D. Li*, A. Kant, G. Koch

Avian pathology 21, 1992, 33-43

Four UK strains of three different serotypes were found to differ by only 2-3% of their S1 amino acids. The S1 sequences were also very similar to those of three Dutch isolates (D207, D274 and D3896), the greatest difference between two of the seven isolates being 4.4%. The few amino acid differences between the seven isolates were located largely between residues 19-122 and 251-347 of the mature S1 subunit.

The seven isolates could be differentiated using 16 monoclonal antibodies in an enzyme-linked immunosorbent assay. Some virus neutralizing (VN) antibody-inducing epitopes were common to all seven isolates even though the strains had been differentiated into three serotypes by polyclonal sera. The results indicate that the most antigenic of the VN antibody-inducing epitopes are formed by very few amino acids and that the most antigenic of the VN antibody-inducing epitopes are formed by very few amino acids and that these occur in the first and third quarters of the S1 subunit. We suggest that serology-based epizootiological studies of IBV should therefore, be augmented by the inclusion of nucleic acid sequencing and/or monoclonal antibody analysis.

INFECTIOUS BRONCHITIS VIRUS

Location of antigenic sites defined by neutralizing monoclonal antibodies on the S1 avian infectious bronchitis virus glycopolyptide

A. Kant, G. Koch, D.J. van Roozelaar, J.G. Kusters*, F.A.J. Poelwijk*, B.A.M. van der Zeijst*

Journal of general virology 73, 1992, 591-596

Neutralizing monoclonal antibodies directed against five antigenic sites on the spike (S) S1 glycopolyptide of avian infectious bronchitis virus (IBV) were used to select neutralization-resistant variants of the virus. By comparing the nucleotide sequence of such variants with the sequence of the IBV parent strain, we located five antigenic sites on the amino acid sequence of the S1 glycopolyptide. The variants had mutations within three regions corresponding to amino acid residues 24 to 61, 132 to 149 and 291 to 398 of the S1 glycopolyptide. The location of three overlapping antigenic sites on the IBV spike protein was similar to the location of antigenic sites on the spike protein of other coronaviruses.

LELYSTAD VIRUS

Antigenic comparison of Lelystad virus and swine infertility and respiratory syndrome (SIRS) virus

G. Wensvoort, E.P. de Kluyver, E.A. Luijze, A. den Besten, L. Harris*, J.E. Collins*, W.T. Christianson*, D. Chladek*

Journal of veterinary diagnostic investigation 4, 1992, 134-138

This study reports the antigenic relatedness of isolates of Lelystad virus collected in the Netherlands, Germany, and the United States. The binding of antibodies directed against these isolates were tested in a set of field sera collected during outbreaks of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome in Europe and outbreaks of swine infertility and respiratory syndrome (SIRS) in North America. Two sets of sera from pigs experimentally infected with Lelystad virus or SIRS virus were also tested. Although all 7 isolates reacted with anti-Lelystad virus sera, antigenic variation was considerable. The 4 European isolates resembled each other closely, but differed from the American isolates, and the 3 American isolates differed antigenically from each other. To reliably diagnose Lelystad virus infection, a common antigen must first be identified.

LELYSTAD VIRUS

Lelystad virus, the cause of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome: a review of mystery swine disease research at Lelystad

G. Wensvoort, E.P. de Kluyver, J.M.A. Pol, F. Wagenaar, R.J.M. Moormann, M.M. Hulst, R. Bloemraad, A. den Besten, T. Zetstra, C. Terpstra

Veterinary microbiology 33, 1992, 185-193

This paper reviews the laboratory investigations that led us to isolate the Lelystad virus and demonstrate that this virus causes mystery swine disease. We describe: 1) isolating the virus from the disease; 2) characterizing the virus as a new enveloped RNA virus; 3) reproducing the disease experimentally with the isolated Lelystad virus; 4) isolating the virus from the experimentally induced disease.

NEWCASTLE DISEASE VIRUS

Effect of vitamin A deficiency and Newcastle disease virus infection on IgA and IgM secretion in chickens

J.H.W.M. Rombout*, S.R. Sijtsma*, C.E. West*, Y. Karabinis*, O.K.W. Sijtsma, A.J. van der Zijp*, G. Koch

British journal of nutrition 68, 1992, 753-763

The effect of vitamin A deficiency or the lentogenic La Sota strain of Newcastle disease virus (NDV) infection, or both, on immunoglobulin (IgA and IgM) levels in bile and plasma were investigated. In addition, tissue distribution of IgA-, IgG- and IgM-containing cells was studied to establish the source of these Ig. Chickens (1-d-old) with limited vitamin A reserves were fed *ad lib.* on diets containing either marginal or adequate levels of vitamin A. At 4 weeks of age, half the chickens in each group were infected with NDV. The number of IgA- and IgM-containing cells was not significantly affected by vitamin A deficiency, demonstrating that neither class-switching nor homing of Ig-containing cells is influenced by vitamin A deficiency. Although bile IgM levels were not significantly different in vitamin A-deficient chickens compared with normal chickens, IgA levels were significantly lower. This decrease was even more pronounced in deficient NDV-infected chickens, despite the higher number of IgA-containing cells found in these birds. These results together with the slightly increased levels of IgA in plasma of vitamin A-deficient chickens, suggest that the hepatobiliary transport of IgA is impaired by vitamin A deficiency and possibly also by NDV infection, although disturbed secretion by IgA-containing cells cannot be excluded.

SWINE FEVER VIRUS / HOG CHOLERA VIRUS

A preliminary map of epitopes on envelope glycoprotein E1 of HCV strain Brescia

P.A. van Rijn, R.G.P. van Gennip, E.J. de Meijer, R.J.M. Moormann

Veterinary microbiology 33, 1992, 221-230

Monoclonal antibodies (MAbs) directed against envelope glycoprotein E1 (gp51-54) of hog cholera virus (HCV) strain Brescia have been shown to recognize four different antigenic domains A, B, C and D. Epitopes of within domain A have mainly been found conserved among HCV strains, whereas epitopes within domains B, C and D are not conserved. We used transiently expressed hybrid E1 genes of HCV strains Brescia and "C" to map the non-conserved epitopes on E1. Epitopes in domains B and C are located within the ultimate N-terminal 104 amino acids. The non-conserved subdomain A3 is most probably located between domains B/C and a hydrophobic region, which is highly conserved between HCV strains Brescia and "C". The conserved subdomains A1 and A2 are probably located in the vicinity and C-terminally of this conserved, hydrophobic region, which is near the centre of the E1 amino acid sequence.

SWINE VESICULAR DISEASE VIRUS

Vesiculaire varkensziekte in Nederland

Swine vesicular disease in the Netherlands

C. Terpstra

Tijdschrift voor diergeneeskunde 117, 1992, 623-626

Er wordt een beschrijving gegeven van het klinisch beeld, de diagnostiek en epizootologie van vesiculaire varkensziekte. De symptomen worden toegelicht aan de hand van kleurenfoto's van experimentele en natuurlijke infecties. Speciale aandacht wordt besteed aan de verschillen tussen vesiculaire varkensziekte en mond- en klauwzeer (MKZ) en aan de keuze van de desinfectantia.

TRANSMISSIBLE GASTROENTERITIS VIRUS

Comparison of the antibody response to transmissible gastroenteritis virus and porcine respiratory coronavirus, using monoclonal antibodies to antigenic sites A and X of the S glycoprotein

A.P. van Nieuwstadt, J. Boonstra

American journal of veterinary research 53, 1992, 184-190

Pigs were inoculated with various strains of transmissible gastroenteritis virus (TGEV) or with porcine respiratory coronavirus (PRCV), and antigenic site-specific antibody responses were compared.

A blocking-ELISA was used to study to what extent antibodies in convalescent sera interfered with the binding of monoclonal antibodies (MAB) 57.16 or 57.110 to the attenuated TGEV/Purdue virus. Monoclonal antibody 57.16 is directed against the A site on the peplomer, neutralizes virus, and recognizes TGEV and PRCV. Monoclonal antibody 57.110 is directed against the X site on the peplomer, but does not neutralize virus, and recognizes only TGEV. Antibodies directed against TGEV and PRCV could be detected in a blocking ELISA, using MAB 57.16 as a conjugate. Antibodies directed against both viruses were detectable as early as 1 week after inoculation. Antibody titers correlated well with those in a virus-neutralization test. Antibodies against TGEV could be detected in a blocking ELISA, using MAB 57.110 as a conjugate. Such antibodies were not induced by a PRCV infection. In the blocking ELISA, using MAB 57.110 as a conjugate, antibodies were detectable as early as 2 weeks after inoculation. There was a significant difference between antibody titers reached after infection with various TGEV strains, however. The difference is ascribed to a variation of the antigenic site defined by MAB 57.110 in TGEV strains. (ABSTRACT TRUNCATED).

VARICELLA-ZOSTER VIRUS

Immunoelectron microscopy for rapid diagnosis of varicella-zoster virus in a complicated case of human T-cell lymphotropic virus type 1 infection

E. Folkers*, J. Vreeswijk, F. Wagenaar, J.G. Kapsenberg*, H.J. Hulsebosch*, A.P. Oranje*

Journal of clinical microbiology 30, 1992, 2487-2491

Rapid techniques for the detection of herpes simplex virus (HSV) and varicella-zoster virus (VZV) are needed for optimal therapeutic management. VZV infection poses a serious threat, especially to seriously ill patients for instance, immunocompromised patients. We report a case of human T-cell lymphotropic virus type 1-positive leukemia complicated by atypical multi-dermatomal herpes zoster. Viral culture and standard serological tests failed to prove VZV infection. Herpesvirus infection was confirmed by cytodiagnostics (Tzanck test). The final diagnosis of VZV was made by immunoelectron microscopy (IEM), which can differentiate between HSV and VZV. Immunoglobulin M antibodies in serum directed against VZV were detected by IEM but not by immunofluorescence. Because IEM was able to identify virus and analyze sera in only 2 h, it is considered a valuable additional tool for the rapid diagnosis of HSV and VZV infections.

Aan de hiervoor vermelde publikaties in gerefereerde wetenschappelijke tijdschriften werkten vanuit het CDI-DLO mee:

Afdeling aviaire virologie en tumorvirussen

W. Back
A. van Blaaderen
G.F. de Boer
E.M. Janse
S.H.M. Jeurissen
A. Kant
G. Koch
D.J. van Roozelaar
J.T. Siebinga
L. Vervelde

Afdeling bacteriologie

Z. Bercovich
G.C. Bijl
E. Boomsluiters
J. Bosch
R.A.M. Brouwers
T.C.E.M. Dekker-Nooren
R.P.J.W. Dieltjes
A. Eger
J. Haagsma
M.L. Jellema
E.M. Kamp
E.A. ter Laak
J.H. Noordergraaf
U. Vecht
E.R.M. Verheijen
M.H. Verschure
H.J. Wisselink
F.G. van Zijderveld
A.M. van Zijderveld-van Bommel

Afdeling bedrijfsdiergeneeskunde, pathologie en epidemiologie

F.H.M. Borgsteede
T.L.M. Crujisen
C.P.H. Gaasenbeek
J.E. van Dijk
O.L.M. Haenen
M.C.M. de Jong
L.A.M.G. van Leengoed
E.J. van der Molen †
J.M.A. Pol
F. Wagenaar

Afdeling biochemie en toxicologie

A.J. Baars
H. van Beek
H.M. van den Dungen
L.C.M.P. Hontelez
L.P. Jager

Afdeling immunologie

J. Anakotta
J.B.W.J. Cornelissen
P.J. van der Heijden
W.A. de Leeuw
H.W.M. Moonen-Leusen
W. Stok
R.J. Zwart

Laboratorium voor moleculaire immunologie

A. van Amerongen
N.J.C.M. Beekman
M. Hage-van Noort
D. Kuperus
J.P.M. Langedijk
J. Langeveld
H. Lankhof
R.H. Meloen
H.H. Plasman
W.P.A. Posthumus
W.C. Puijk
W.M.M. Schaaper

Afdeling moleculaire biologie

J. Briare
R. Broer
R.G.P. van Gennip
A.L.J. Gielkens
K. Glazenburg
B. Hooft van Iddekinge
M. Hooisma
M.M. Hulst
R. Jansen
E.J. de Meijer
R. Moormann
B. Peeters
P. van Rijn
H.E. Smith
M.A. Smits
J.L.B. van Wamel

Afdeling mond- en klauwzeer vaccinbank

J. Vreeswijk

Afdeling "open" virologie

F.J. Daus
J.T. van Oirschot
J. Post

Afdeling zoogdiervirologie

A. den Besten
M. Bloemraad
J. Boonstra
T.G. Kimman
E.P. de Kluyver
E.A. Luijze
C. van Maanen
A.P. van Nieuwstadt
N. Oei-Lie
C. Terpstra
G. Wensvoort
T. Zetstra

Andere afdelingen:

N. Noorman
H.J. Over
C.J.G. Wensing
D. van Zaane

Aan de hiervoor vermelde publikaties in gerefereerde wetenschappelijke tijdschriften werkten van buiten het instituut mee:

- R. Albrecht** Institute for anatomy, Joh. Gutenberg university, Mainz, Germany
- G. Almsa** Practitioner at Bergum, The Netherlands
- J.P. Arends** Academic medical center, Amsterdam, The Netherlands
- A.J. Baars** DLO-State Institute for quality control of agricultural products, RIKILT-DLO, Wageningen, The Netherlands
- N.K.T. Back** Human retrovirus laboratory, Academic medical center, Amsterdam, The Netherlands
- D. Bakker** Department of molecular microbiology, Faculty of biology, Free university, Amsterdam, The Netherlands
- M.H. Bakker** Central animal health laboratory, Catholic university Nijmegen, The Netherlands
- C. Bauer** Institut für Parasitologie, Justus-Liebig-Universität, Giessen, Germany
- P.J.A. Beckers** Institute of medical parasitology, University of Nijmegen, The Netherlands
- C. Belpaire** Zoological institute, Leuven, Belgium
- A.J.M. Berns** Netherlands cancer institute, Amsterdam, The Netherlands
- A.C. Beynen** Department of human nutrition, Agricultural university of Wageningen and Department of laboratory animal science, State university of Utrecht, The Netherlands
- B.M.E. von Blomberg** Department of pathology, Free university hospital, Amsterdam, The Netherlands
- G.F. de Boer** Serendip BV, Research in biotechnology, Lelystad, The Netherlands
- J.H. Boersema** Department of infectious diseases and immunology, University of Utrecht, The Netherlands
- D.P. Bolognesi** Duke university medical school, Durham, England
- E.F.H. van Bommel** Department of intensive care, St. Clara hospital, Rotterdam, The Netherlands
- J.M. Bové** Laboratoire de biologie cellulaire et moléculaire, Institut national de la recherche agronomique, Pont-de-la-Maye, France
- J. Brandt** Institute of tropical medicine, Antwerpen, Belgium
- M.E. van den Brink** Central animal health laboratory, Catholic university Nijmegen, The Netherlands
- C.S. Brown** Department of virology, Institute of medical microbiology, Faculty of medicine, Leiden university, The Netherlands
- C. Bruck Smith** Kline biologicals, Rixensart, Belgium
- G. Bruin** Research station for cattle, sheep and horse husbandry, Lelystad, The Netherlands
- B. (JZN) Bruins** Ministry of welfare, public health and cultural affairs, Regional veterinary inspectorate, Groningen, The Netherlands
- D.P.W. Burns** New England regional primate center, Southborough, England
- P. Carle** Laboratoire de biologie cellulaire et moléculaire, Institut national de la recherche agronomique, Pont-de-la-Maye, France
- N. Cates** Duke university medical school, Durham, England
- D. Cavanagh** AFRC Institute for animal health, Houghton laboratory, Houghton, Huntingdon, England
- D. de Charleroy** Zoological institute, Leuven, Belgium
- D. Chladek** Boehringer Ingelheim animal health, St. Joseph, Germany
- W.T. Christianson** Clinical and population sciences, University of Minnesota, St. Paul, USA
- E. Claassen** Department of immunology and medical microbiology, TNO medical biological laboratory, Rijswijk, The Netherlands
- G.C. Coles** Department of parasitology, Central veterinary laboratory, New Haw, Weybridge United Kingdom
- J.E. Collins** Department of veterinary diagnostic medicine, University of Minnesota, St. Paul, USA
- J.K.A. Cook** AFRC Institute for animal health, Houghton laboratory, Houghton, Huntingdon, England
- I. Correa** Centro de biología molecular, universidad autónoma, Madrid, Spain
- P.A. de Lezanne Coulenders** Ministry of welfare, public health and cultural affairs, Regional public health inspectorate, Leeuwarden, The Netherlands
- E.E. Daniel** Department of biomedical sciences, McMaster university health science centre, Hamilton, Ontario, Canada
- P.J. Davis** AFRC Institute for animal health, Houghton laboratory, Houghton, Huntingdon, England
- R. de Deken** Institute of tropical medicine, Antwerpen, Belgium
- W. van Delft** DLO-State Institute for quality control of agricultural products, Wageningen, The Netherlands
- R.C. Desrosiers** New England regional primate center, Southborough, England
- H.W. Dickerson** Department of medical microbiology, College of veterinary medicine, University of Georgia, Athens
- O. Diekmann** Centre for mathematics and computer science, Amsterdam, and Institute of theoretical biology, University of Leiden, The Netherlands
- Th. Dijkstra** Animal health service in Northern-Netherlands, Drachten
- P. Dom** Laboratory of veterinary bacteriology, Faculty of veterinary medicine, university of Ghent, Belgium
- J.W. Drijfhout** Department of immunohematology and blood bank, University hospital, Leiden, The Netherlands
- M. Duchet-Suchaux** Unite de pathologie infectieuse et immunologie, Institut national de la recherche agronomique, Nouzilly, France
- A.J. van der Eb** Laboratory for molecular carcinogenesis, Sylvius laboratory, University of Leiden, The Netherlands
- W.M.C. Eling** Department of medical microbiology, Catholic university of Nijmegen, The Netherlands
- M. Eloit** Laboratoire national de référence pour la maladie d'Aujeszky, Ecole nationale vétérinaire, Maisons-Alfort, France
- L. Enjuanes** Centro de biología molecular,

- universidad autónoma, Madrid, Spain
- J.H.F. Erkens** Research institute for animal production IVO-DLO Zeist, and Institute of infectious diseases and immunology, Faculty of veterinary medicine, Utrecht, The Netherlands
- M. Eysker** Department of infectious diseases and immunology, University of Utrecht, The Netherlands
- G. Fennema** Ministry of agriculture, nature management and fisheries, veterinary service, Den Haag, The Netherlands
- E. Folkers** Department of dermatology, Hospital 'de Heel', Zaandam, The Netherlands
- M. Franchotte** Smith Kline biologicals, Rixensart, Belgium
- W. Gaastra** Department of bacteriology, Faculty of veterinary medicine, University of Utrecht, The Netherlands
- F. Gebauer** Centro de biología molecular, universidad autónoma, Madrid, Spain
- S. Goerts** Institute of tropical medicine, Antwerpen, Belgium
- A. Geluk** Department of immunohematology and blood bank, University hospital, Leiden, The Netherlands
- J.W. van der Giessen** Department of bacteriology, Faculty of veterinary medicine, University of Utrecht, The Netherlands
- J. Goudsmit** Human retrovirus laboratory, Academic medical center, Amsterdam, The Netherlands
- F.K. de Graaf** Department of molecular microbiology, Faculty of biology, Vrije universiteit, Amsterdam, The Netherlands
- L. Grisez** Zoological institute, Leuven, Belgium
- J.A. Grootegoed** Department of endocrinology & reproduction, Erasmus university, Rotterdam, The Netherlands
- A.F. Grootendorst** Department of intensive care, St. Clara hospital, Rotterdam, The Netherlands
- E. Gruys** Department of pathology, Faculty of veterinary medicine, University of Utrecht, The Netherlands
- G. van de Haar** Ministry of welfare, public health and cultural affairs, Central public health inspectorate, Rijswijk, The Netherlands
- F. Haesebrouck** Laboratory of veterinary bacteriology, Faculty of veterinary medicine, university of Ghent, Belgium
- R.M. Haring** Department of bacteriology, Faculty of veterinary medicine, University of Utrecht, The Netherlands
- L. Harris** Boehringer Ingelheim animal health, St. Joseph, Germany
- H.J.F. van der Heijden** Animal health service in Southern-Netherlands, Boxtel, The Netherlands
- E.J. Hensen** Department of infectious diseases and immunology, Faculty of veterinary medicine, State university of Utrecht, The Netherlands
- M.J.C. Hessing** Department of animal husbandry, section ethiology, Agricultural university of Wageningen, The Netherlands
- B. van der Hoven** Department of intensive care, St. Clara hospital, Rotterdam, The Netherlands
- H.J. Hulstbosch** Department of dermatology, University of Amsterdam, The Netherlands
- A.A.M. Janson** Department of immuno-hematology and blood bank, University hospital, Leiden, The Netherlands
- K. Javaherian** Repligen Corporation, Cambridge, England
- T. Jensen** Department of microbiology, DAKO A/S, Glostrup, Denmark
- M.A.C. de Jong** Department of immunology, Institute of infectious diseases and immunology, Faculty of veterinary medicine, University of Utrecht, The Netherlands
- J.M.B.V. de Jong** Department of neurology, Academic medical center, Amsterdam, The Netherlands
- A. Joosten** Department of pathology, Faculty of veterinary medicine, University of Utrecht, The Netherlands
- Tj. Jorna** Royal Netherlands veterinary association, Utrecht, The Netherlands
- J. Jury** Department of biomedical sciences, McMaster university health science centre, Hamilton, Ontario, Canada
- J.G. Kapsenberg** Laboratory for virology, national institute of public health and environmental protection, Bilthoven, The Netherlands
- Y. Karabinis** Department of experimental animal morphology and cell biology, Wageningen Agricultural university, The Netherlands
- M. Kaufmann** Repligen Corporation, Cambridge, England
- E. Kinney-Thomas** Oncogen, Seattle, Washington, USA
- H.L.B.M. Klaassen** Central animal health laboratory, Catholic university Nijmegen, The Netherlands
- T.R. Klei** Department of veterinary science, Louisiana state university agricultural center, USA
- F.R. van der Kolk** Practitioner at Zuidhorn, The Netherlands
- J.P. Koopman** Central animal health laboratory, Catholic university Nijmegen, The Netherlands
- F.N.J. Kooyman** Department of infectious diseases and immunology, University of Utrecht, The Netherlands
- O. Kranenburg** Laboratory for molecular carcinogenesis, Sylvius laboratory, University of Leiden, The Netherlands
- V. Kumar** Institute of tropical medicine, Antwerpen, Belgium
- J.G. Kusters** Institute of infectious diseases and immunology, Faculty of veterinary medicine, University of Utrecht, The Netherlands
- A.J. Langlois** Duke university medical school, Durham, England
- G.J. LaRosa** Repligen Corporation, Cambridge, England
- K. Lautenbag** Ministry of agriculture, nature management and fisheries, General inspectorate, Division East, Zwolle, The Netherlands
- J.A. Lenstra** Institute of infectious diseases and immunology, Faculty of veterinary medicine, Utrecht, The Netherlands
- D. Li** Harbin veterinary research institute, Harbin, Heilongjiang, People's Republic of China
- G.W. Lieben** Animal health service in North Netherlands, Drachten, The Netherlands
- M.-J.C. van Lierop** Department of immunology, Institute of infectious diseases and immunology, Faculty of veterinary medicine, University of Utrecht, The Netherlands
- J.H.H. van Lipzig** Animal health service,

Heythuysen, The Netherlands

B. Lomnici Veterinary medical research institute of the Hungarian academy of sciences, Budapest, Hungary

S. Louwerse Department of neurology, Academic medical center, Amsterdam, The Netherlands

J.C. Meijer Department of functional morphology, Veterinary faculty, University of Utrecht, The Netherlands

K.E. van Meijgaarden Department of immunohematology and blood bank, University hospital, Leiden, The Netherlands

P. Menanteau Unite de pathologie infectieuse et immunologie, Institut national de la recherche agronomique, Nouzilly, France

J.H.E.Th. Meuwissen Institute of medical parasitology, University of Nijmegen, The Netherlands

J.H.M. Nieuwenhuijs Ministry of welfare, public health and cultural affairs, Central veterinary public health chief inspectorate, Rijswijk, The Netherlands

D. Nohr Institute for anatomy, Joh. Gutenberg university, Mainz, Germany

M.H.M. Notelborn Laboratory for molecular carcinogenesis, Sylvius laboratory, University of Leiden, The Netherlands

S.H.W. Notermans National institute of public health and environmental protection, Bilthoven, The Netherlands

F. Ollevier Zoological institute, Leuven, Belgium

R.A.J. Oostendorp Department of pathology, Free university hospital, Amsterdam, The Netherlands

A.P. Oranje Department of dermatology and venereology, Erasmus university, Rotterdam, The Netherlands

A.L.M. van Osta TNO-Agricultural mathematics group, Wageningen, The Netherlands

T.H.M. Ottenhoff Department of immunohematology and blood bank, University hospital, Leiden, The Netherlands

H. Peeters Department of pathology, Faculty of veterinary medicine, University of Utrecht, The Netherlands

M. Pensaert Laboratory of virology and immunology, Faculty of veterinary medicine, Gent, Belgium

N.H.M.T. Paperkamp Animal health service, Gouda, The Netherlands

F.H. Plummers State service for cattle and meat inspection, Den Haag, The Netherlands

F.G.J. Poelma Central animal health laboratory, Catholic university Nijmegen, The Netherlands

F.A.J. Poelwijk Institute of infectious diseases and immunology, Faculty of veterinary medicine, University of Utrecht, The Netherlands

J. Post Department of pathology, Free university hospital, Amsterdam, The Netherlands

S.D. Putney Repligen Corporation, Cambridge, England

J.H.W.M. Rombout Department of experimental animal morphology and cell biology, Wageningen Agricultural university, The Netherlands

F.F.G. Rommerts Institute of endocrinology and reproduction, Medical school, Erasmus university Rotterdam, The Netherlands

D.G. Rooij Department of cell biology, medical school, Utrecht university, The Netherlands

D.L. Rose Mycoplasma section, Laboratory of

molecular microbiology, National institute of allergy and infectious diseases, Frederick cancer research facility, Frederick, Maryland, U.S.A.

V.P.M.G. Rutten Department of immunology, Institute of infectious diseases and immunology, Faculty of veterinary medicine, University of Utrecht, The Netherlands

H. Sato Clinical laboratory, Kyushu university hospital, Fukuoka, Japan

R.W. Sauerwein Institute of medical parasitology, University of Nijmegen, The Netherlands

C.J.M. Scheepens Department of herd health and reproduction, Faculty of veterinary medicine, State university of Utrecht, The Netherlands

R.J. Schaper Department of pathology, Free university hospital, Amsterdam, The Netherlands

S. Schmidt Repligen Corporation, Cambridge, England

E.J. Schoevers Department of herd health and reproduction, Faculty of veterinary medicine, University of Utrecht, The Netherlands

R. Serio Laboratorio fisiologia generale, Dipartimento di biologia cellulare e dello sviluppo, universita di Palermo, Italia

S.R. Sijsma Department of experimental animal morphology and cell biology, Department of animal husbandry, and Department of human nutrition, Wageningen agricultural university, The Netherlands

O.K.W. Sijsma Department of experimental animal morphology and cell biology, Wageningen Agricultural university, The Netherlands

P.A.E. Sillevs-Smitt Department of neurology, Academic medical center, Amsterdam, The Netherlands

L.H. Simons Department of molecular microbiology, Faculty of biology, Free university, Amsterdam, The Netherlands

G. Smolders Research station for cattle, sheep and horse husbandry, Lelystad, The Netherlands

K.K. Stanley European molecular biology laboratory, Heidelberg, Germany

K. Sugamura Department of microbiology, Tohoku university school of medicine, Sendai, Miyagi, Japan

J. Sybesma Department of pathology, Faculty of veterinary medicine, University of Utrecht, The Netherlands

K.J. Teerds Department of functional morphology, Division of cell biology and histology, School of veterinary medicine, Utrecht university, The Netherlands

M.J.M. Tielen Department of herd health and reproduction, Faculty of veterinary medicine, State university of Utrecht, and Animal health service in Southern-Netherlands, Bostel, The Netherlands

D. Troost Department of neuropathology, Academic medical center, Amsterdam, The Netherlands

V.L. Trudeau Department of functional morphology, Veterinary faculty, University of Utrecht, The Netherlands

L.G.M.Th. Tuinstra DLO-State Institute for quality control of agricultural products, RIKILT-DLO, Wageningen, The Netherlands

J.G. Tully Mycoplasma section, Laboratory of molecular microbiology, National institute of allergy and infectious diseases, Frederick cancer research facility, Frederick, Maryland, U.S.A.

- O. Vainio** Department of medical microbiology, Turku university, Turku, Finland
- P. Vannier** Laboratoire central de recherches avicole et porcine, Ploufragan, France
- E. Vaudara** Department of bacteriology, School of veterinary medicine, University of Utrecht, The Netherlands
- J.H.M. Verheijden** Department of herd health and reproduction, Faculty of veterinary medicine, University of Utrecht, The Netherlands
- A.N. Vermeulen** Intervet, Boxmeer, The Netherlands
- C.A.J. Verschuuren** Laboratory for molecular carcinogenesis, Sylvius laboratory, University of Leiden, The Netherlands
- M.W.A. Verstegen** Department of animal nutrition agricultural university, Wageningen, The Netherlands
- I.J.R. Visser** Animal health service in North Netherlands, Drachten, The Netherlands
- G. Vos** Ministry of agriculture, nature management and fisheries, Department for the environment, quality and nutrition, Den Haag, The Netherlands
- R.R.P. de Vries** Department of immunohematology and blood bank, University hospital, Leiden, The Netherlands
- W. de Vries** Practitioner at Harkema, The Netherlands
- P.J. Waller** McMaster Laboratory, CSIRO, Australia
- E. Weihe** Institute for anatomy, Joh. Gutenberg university, Mainz, Germany
- G.H. Wentink** Department for large animal medicine and nutrition, Veterinary faculty, University of Utrecht, The Netherlands
- C.E. West** Department of human nutrition, Wageningen agricultural university, The Netherlands
- D.F.M. van de Wiel** Research institute for animal production IVO-DLO Zeist, The Netherlands
- A. Wijbenga** Service Water and the environment, Den Haag, The Netherlands
- P.T.J. Willemsen** Department of molecular microbiology, Faculty of biology, Free university, Amsterdam, The Netherlands
- N. de Wind** Netherlands cancer institute, Amsterdam, The Netherlands
- P.A.M. van Woensel** Department of virological research, Intervet International BV, The Netherlands
- F.A.S. de Wolff** Department of occupational and environmental health, Academic medical center, Amsterdam, The Netherlands
- P. Zandstra** Animal health service in North Netherlands, Drachten, The Netherlands
- A. Zanen** Laboratory for molecular carcinogenesis, Sylvius laboratory, University of Leiden, The Netherlands
- B.A. van der Zeijst** Department of bacteriology, School of veterinary medicine, University of Utrecht, The Netherlands
- H.J. Zentel** Institute for anatomy, Joh. Gutenberg university, Mainz, Germany
- A.J. van der Zijp** Research institute for animal production, IVO-DLO, Zeist and Department of animal husbandry, Wageningen Agricultural university, The Netherlands
- G.M. Zimmer** Animal health service, Bostel, The Netherlands

Baars A.J.

Coördinatie in de veterinaire milieuproblematiek.

Tijdschrift voor diergeneeskunde 117, 1992, 589-590 : Milieu-dier-mens, een keten die aandacht vraagt, vergadering 19 mei 1992 den Haag.

Barteling S.J.

The Community Coordinating Institute, the European vaccine bank, and the application of foot-and-mouth disease (FMD) vaccines.

EC workshop on the control of foot-and-mouth disease, Pirbright (U.K.), May 11-15, 1992.

Bercovich Z., E.A. ter Laak, J. Haagsma.

Use of the skin delayed-type hypersensitivity test for the detection of brucellosis in suspect or infected herds.

In: Brucella and brucellosis in man and animals / Edited by Emel Tümbay, Süleyha Hilmi, Özdem Ang. - Proceedings of a symposium held under the auspices of the federation of European microbiological societies, September 24-26, 1991, Izmir, Turkey, p. 145. - (Publication of the Turkish microbiological society ; no. 16). - ISBN975-95460-1-0

Bianchi A.T.J., P.J. van der Heijden.

Comment on the 44th Forum in immunology.

Research in immunology 143, 1992, 576-577.

Bianchi A.T.J., J.W. Scholten, B. Moonen-Leusen, A.M. van Zijderveld - van Bemmelen, F.G. van Zijderveld.

Parenteral vaccination of piglets with *E. coli* K-88 suppresses the enteric anti-K88 response upon oral infection shortly after weaning.

Third international veterinary immunology symposium, Budapest, Hungary, August 17-20, 1992 p. 38. Veterinary immunology and immunopathology 35 supplement, 1993, p. 41.

Bokhout B.A.

Meerjarenplan 1992-1997.

Jaarverslag DLO-Centraal Diergeneeskundig Instituut, 1991, pp. 51-55.

Borgsteede F.H.M., M.O. Makinde, F.W.G. Hill.

Endoparasites of pigs in Zimbabwe.

Zimbabwe veterinary journal 22, 1991, 127-131.

Borgsteede F.H.M.

Wormbolus veilig middel in preventie worminfecties bij rundvee.

Veehouder en dierenarts 6, 1992, 7-9.

Borgsteede F.H.M.

Spoelwormen bij schapen. Een onbekend probleem.

Het schaap 1992, 8, p. 13.

Borgsteede F.H.M.

Long-acting preparaten.

Syllabus PAO-diergeneeskunde Preventie worminfecties rundvee, 17 maart 1992, 8 pp.

Borgsteede F.H.M., J.N. van der Linden, C.P.H. Gaasenbeek.

Resistance of the abomasal cattle nematode *Ostertagia ostertagi* to levamisole.

Abstract 161, VIth European multicolloquium of parasitology, The Hague, 1992, p. 107.

Bouwkamp F.T., J.A. Stegeman, T.G. Kimman.

The use of colostrum to detect antibodies directed against glycoprotein (gl) of Aujeszky disease virus.

Proceedings of the 12th international pig veterinary society congress, The Hague, The Netherlands, August 17-20, 1992, p. 81. - ISBN 90-900-1814-X.

Cornelissen J.B.W.J., W.A. de Leeuw.

Production and characterization of monoclonal antibodies directed against *Dictyocaulus viviparus* antigens.

Abstracts VIth European multicolloquium of parasitology, The Hague 1992, no 194, p. 205.

Crujisen A.L.M., L.A.M.G. van Leengoed, E.M. Kamp, K. Riepema, A. Bartelse, J.H.M. Verheijden.

Sero-epidemiological survey of a herd endemically infected with *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

Proceedings of the 12th international pig veterinary society congress, The Hague, The Netherlands, August, 17-20, 1992, p. 227.

Crujisen T., L. van Leengoed, P. Kroon, J. Verheijden.

Protective immunity against *Actinobacillus pleuropneumoniae* in convalescent pigs.

Proceedings of the 12th international pig veterinary society congress, The Hague, The Netherlands, August, 17-20, 1992.

Dijkman J.H., J.A. Kramps.

Rol van proteasen, antiproteasen en zuurstofradicalen bij de pathogenese van longemfyseem.

Pharmaceutisch weekblad 127, 1992, 609-612.

Dijl J.M. van, A. de Jong, H. Smith, G. Venema, S. Bron.

Protein secretion in *Bacillus subtilis*.

11th European meeting on genetic transformation, 1992, p. 119.

Dijl J.M. van, A. de Jong, R. Meima, M. Sulter, G. Venema, H. Smith, S. Bron.

Rate-limited steps in the export of hybrid secretory proteins in *Bacillus subtilis*.

The 4th Netherlands biotechnology congress, 1992.

Dykhuizen A.A., E.H.P. Houben, M.C.M. de Jong.

Epidemiological and economic simulation of Aujeszky's disease control.

Proceedings of the 6th international symposium on veterinary epidemiology and economics / Edited by S. Wayne Martin. - Ottawa, 12-16 August, 1991, pp 547-549.

Engelenburg F.A.C. van, M.J. Kaashoek, F.A.M. Rijsewijk, L. van den Burg, A. Moerman, A.L.J. Gielkens, J.T. van Oirschot.

Deletion of the glycoprotein E gene or thymidine kinase gene of bovine herpesvirus type 1 produces attenuated vaccine strains.

Proceedings 17th international herpesvirus workshop. - Edinburgh, August 1-7, 1992, p. 379.

Engvall A., E. Olsson, N. Bleumink-Pluym, E.A. ter Laak, B.A.M. vander Zeijst.

Epidemiology and control of contagious equine metritis in Sweden.

In: Equine infectious diseases : Sixth international conference on equine infectious diseases, Cambridge, England, 7th-11th July 1991, 1992, pp. 89-93.

Gaasenbeek C.P.H.

Leverbotpreventie bij rundvee.

Syllabus PAO-diergeneeskunde Preventie worminfecties rundvee, 17 maart 1992, 10 pp.

Gaasenbeek C.P.H., F.H.M. Borgsteede.

The influence of cattle and pig slurry on the viability of *Ascaris suum* eggs in the Netherlands.

Abstract 18, VIth European multicolloquium of parasitology, the Hague, 1992, p. 49.

Gielkens A.L.J.

Nieuwe strategieën voor de ontwikkeling van veterinaire vaccins.

In: Biotechnologie in de veehouderij / E. Egberts, T. van der Lende, A.J. van der Zijpp (Editors). - Wageningen : Pudoc, 1991, p. 126-131.

Glazenburg K., A. Gielkens, R.J.M. Moormann.

Control of pseudorabies virus replication by replacing the immediate early gene promoter with the heat-shock promoter HSP70.

2nd Congress of the European society for veterinary virology. Uppsala, 1991, p. 38.

Haenen O.L.M.

"Europees Paling Virus" een nieuwe bedreiging voor de palingsector.

Aquacultuurnieuws januari 1992, 9.

Haenen O.L.M.

Visziekten in Nederland en behandelingsmethoden.

Aquacultuur aug., 1992, 9-11.

Haesebrouck F., P. Dom, E. Kamp.

Bacteria-host interactions of a NAD-dependent *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2 strain.

Proceedings of the 12th international pig veterinary society congress, The Hague, The Netherlands, August 17-20, 1992, p. 204. - ISBN 90-900-1814-X.

Hage-van Noort M., W.C. Puijk, W.M.M. Schaaper, D. Kuperus, N.J.C.M. Beekman, H.H. Plasman, J.A. Grootegoed, R.H. Meloen.

Development of antagonists and agonists of follicle stimulating hormone.

In: Spermatogenesis - fertilization - contraception : Molecular, cellular and endocrine events in male reproduction / E. Nieschlag, U.-F. Habenicht, Editors. - Berlin [etc.] : Springer Verlag, 1992, pp. 35-55. - (Schering foundation workshop 4). - ISBN 3-540-55436-X.

Hage-van Noort M., W.C. Puijk, H.H. Plasman, D. Kuperus, W.M.M. Schaaper, N.C.J.M. Beekman, J.A. Grootegoed, R.H. Meloen.

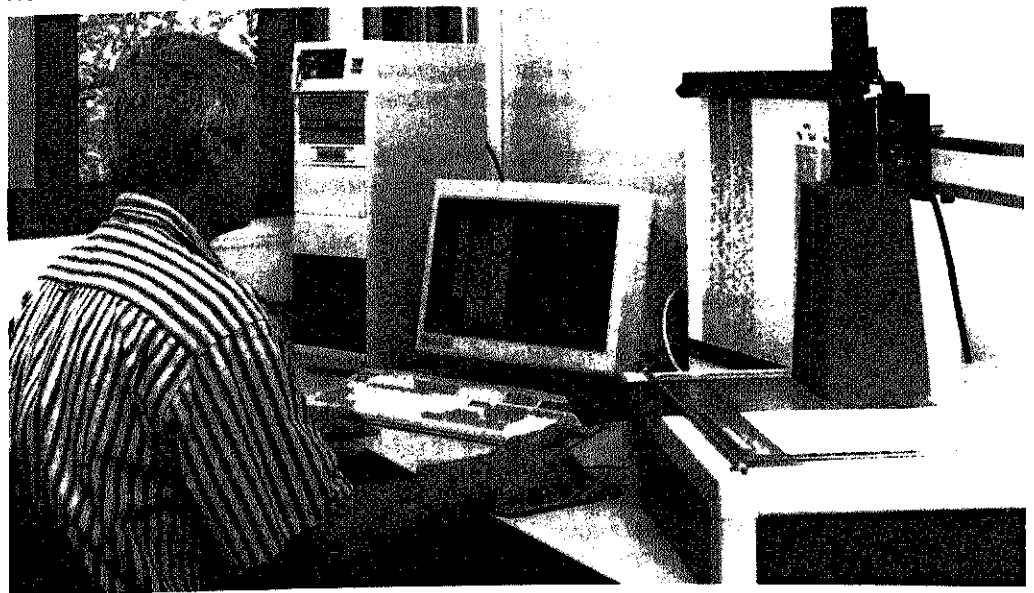
Peptiden met hoge biologische activiteiten.

Jaarverslag DLO-Centraal Diergeneeskundig Instituut 1991, pp. 23-25.

Jager L.P., H.M. van den Dungen, G.J. de Graaf, C.C.F. Accord, N.B. Lucas Luyckx, A.J. Baars.

Drug-induced inhibition of aldosterone by porcine adrenal cells *in vitro*.

Proceedings of the 12th international pig veterinary society congress, The Hague, The Netherlands, August 17-20, 1992, p. 670. ISBN 90-900-1814-X.



Semi-automatische
DNA-sequentie analyse van
genen van App.

Jansen R., J. Briare, E.M. Kamp, M.A. Smits.

Cloning and characterization of the *Actinobacillus pleuropneumoniae* cytolysin genes.

72nd Annual meeting of the conference of research workers in animal disease. - Chicago, 1991, p. 53.

Jansen R., J. Briaire, E. Kamp, M. Smits.

The cytolyisin genes of *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

Proceedings of the 12th international pig veterinary society congress, The Hague, The Netherlands, August 17-20, 1992, p. 197. - ISBN 90-900-1814-X.

Jansen R., J. Briaire, E. Kamp, M. Smits.

Cytolysinen van *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

Jaarverslag DLO-Centraal Diergeneeskundig Instituut, 1991, pp. 37-41.

Jeurissen S.H.M., E.M. Janse, F. Wagenaar, G.F. de Boer.

The role of splenic ellipsoid-associated reticulum cells in the pathogenesis of Marek's disease.

Proceedings of the 4th international symposium on Marek's disease 1992.

Jong M.C.M. de

The basic reproduction ratio as measure for the expected effects of control strategies.

Proceedings of the 6th international symposium on veterinary epidemiology and economics / Edited by S. Wayne Martin. - Ottawa, 12-16 August, 1991, p. 614.

Kaashoek M.J., A. Moerman, J. Madic, F.A.M. Rijsewijk, J. Quak, J.T. van Oirschot.

Evaluation of immunogenicity of a glycoprotein gE-negative strain of bovine herpesvirus type 1.

Proceedings 73rd CRWAD meeting, Chicago, November 9-10, 1992.

Kamp E.M., M.A. Smits.

Recombinant vaccine for prevention and/or treatment of pleuropneumonia infections.

Patent nr. 722,971 Amerikaanse octrooiraad, 1991

Kamp E.M., T.M.M. Vermeulen, M.A. Smits.

Production of cytolyisins (clys) of *Actinobacillus pleuropneumoniae* field isolates.

72nd Annual meeting of the conference of research workers in animal disease. - Chicago, 1991, p. 52.

Kamp E.M., T.M.M. Vermeulen, T. Cruisen, J.E. van Dijk, K. Riepema, M.A. Smits, J.M. van Leeuwen.

***Actinobacillus pleuropneumoniae* cytolyisins: cross protective effect of a crude cytolyisin-vaccine.**

Proceedings of the 12th international pig veterinary society congress, The Hague, The Netherlands, August 17-20, 1992, p. 209. ISBN 90-900-1814-X.

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.

2nd Congress of the European society for veterinary virology. Uppsala, 1991, p. 37.

Kimman T.G.

Acceptability of Aujeszky's disease vaccines.

Symposium on the first steps towards an international harmonization of veterinary biologicals: 1993 and free circulation of vaccines within the E.E.C. - Ploufragan, France, 1992.

Developments in biological standardization 79, 1992, 129-136.

Kimman T.G., A.T.J. Bianchi, M.G.M. de Bruin, F. Daus.

Primary and secondary band T-cell responses against Aujeszky's disease virus.

Proceedings of the 12th international pig veterinary society congress, The Hague, The Netherlands, August 17-20, 1992, p. 64. - ISBN 90-900-1814-X.

Kimman T.G.

Wering en eliminatie: de ziekte van Aujeszky als voorbeeld.

In: Proceedings symposium "Varkenshouderij en gezondheid", Rosmalen, The Netherlands, 30 oktober 1992.

Kimman T.G.

Pseudorabies virus as a vaccine vector.

Proceedings 12th symposium world association of veterinary microbiology and immunologists.- Davis, California, Sept. 1992, pp. 201-206.

Kimman T.G.

Control and eradication of Aujeszky's disease.

Proceedings symposium sobre enfermedades del cerdo con implicaciones en el comercio internacional / Morilla, A. & Lopez, J. (eds.). Mexico, April 1992, pp. 32-47.

Kimman T.G.

Intervet workshop "Ziekte van Aujeszky", Nijkerk 16 oktober 1992.

Tijdschrift voor diergeneeskunde 117, 1992, 700-705.

Kimman T.G.

Safety of genetically engineered vaccines.

In: ETC course : Introduction of genetically modified organisms into the environment : Biosafety aspects, Wageningen, The Netherlands, December 10-18, 1992.

Koch G., A. Kant, J.K.A. Cook, D. Cavanagh.

Epitopes of neutralizing antibodies are localized within three regions of the S1 spike protein of infectious bronchitis virus.

Proceedings of the 2nd international symposium on infectious bronchitis, WIPA and WPSA. - Rauschholzhausen, Germany, 1992.

Koch G., A. Kant, J.G. Vos, G.G. de Boer.

Rapid detection of infectious bronchitis by nucleoprotein specific antigen capture assay.

Proceedings of the 2nd international symposium on infectious bronchitis, WIPA and WPSA. - Rauschholzhausen, Germany, 1992.

Kramps J.A., J. Stolk, A. Rudolphus, J.H. Dijkman.

Antileukoprotease (Secretory Leucocyte Proteinase Inhibitor), a major proteinase inhibitor in the human lung.

In: Biochemistry of pulmonary emphysema / Editor C. Grassi [et al.]. London : Springer, 1992, Chapter 9, pp. 112-121. - (Current topics in rehabilitation biochemistry of pulmonary emphysema). - ISBN 0-387-19775-3

Laak E.A. ter, J.E. van Dijk, J.H. Noordergraaf.

Effects of endobronchial inoculation of *Ureaplasma diversum* or *Mycoplasma canis* into specific-pathogen-free calves.

IOI Letters Vol. 2. Abstracts of the 9th international congress of the international organization for mycoplasmaology, Ames, Iowa, USA, August 2-7, 1992, p. 164.

Langedijk J.P.M., W.F.H.M. Vos, G.J.J. van Doornum, H.A.J. Rotman, R.H. Melen, J.G. Huisman.

Identification of cross-reactive epitopes recognized by HIV-1 false-positive sera.

Correspondence AIDS 6, 1992, 1547-1548.

Leengoed L. van, J. van Dijk, M. Ham, J. Verheijden.

Nonhemolytic anemia (NHA) in sows.

Proceedings of the 12th international pig veterinary society congress, The Hague, The Netherlands, August, 17-20, 1992, p. 394.

Lensing H.H.

Some remarks on the efficacy of vaccines for veterinary use.

Symposium on the first steps towards an international harmonization of veterinary biologicals: 1993 and free circulation of vaccines within the E.E.C. - Ploufragan, France, 1992. - Developments in biological standardization 79, 1992, 43-45.

Linden J.N. van der, G. Thomas.

Myiasis in the Netherlands.

Abstract 197/198, VIth European multicolloquium of parasitology, The Hague, The Netherlands, 7-11 September 1992, p. 121.

Linden J.N. van der, G. Thomas.

Myiasis by *Lucilia sericata*: An increasing problem.

XIX International congress of entomology, Beijing, China, June 28-July 4, 1992.

Meloen R.H.

Voorkomen van beregeur door middel van vaccinatie tegen LHRH.

Dier en arts 1992, 55-56.

Meloen R.H.

Schweine mit der Spritze kastrieren?

DLG-Mitteilungen 3, 1992, 62-63.

Meloen R.H., J.A. Lenstra.

Nieuwe methode versnelt ontwikkeling van vaccins en geneesmiddelen.

Jaarverslag DLO-Centraal Diergeneeskundig Instituut, 1991, pp. 27-28.

Meulen J. van der, J.G.M. Bakker, L.P. Jager.

The relative bioavailability of synthetic methionine and cysteine in the pig quantified by pharmacokinetic analysis of systemic plasma concentrations.

In: Proceedings of the 6th international symposium on protein metabolism and nutrition / Editors B.O. Eggum [et al.]. - Research Centre Foulum, National Institute of Animal Science, 1991, Vol. 2, pp. 27-29.

Meulen J. van der, J.G.M. Bakker, L.P. Jager.

Farmacokinetische analyse van plasmaconcentraties na intraveneuze en orale toediening van synthetische methionine en threonine aan het varken.

In: Proceedings 16e studiedag Nederlandstalige voedingsonderzoekers, Industriële Hogeschool Gent 1991, pp. 63-64.

Meulen J. van der, J.G.M. Bakker, L.P. Jager.

Bioavailability and pharmacokinetics of synthetic lysine (LYS) and methionine (MET) in pigs.

Proceedings of the first Anglo-French symposium on human and animal nutrition, Rennes, 9-11 septembre 1992, p. 125.

Meulen J. van der, J.G.M. Bakker, L.P. Jager.

Bioavailability and pharmacokinetics of synthetic amino acids in pigs.

Proceedings of the 12th international pig veterinary society congress, The Hague, The Netherlands, August 17-20, 1992, p. 609. - ISBN 90-900-1814-X.

Meulenberg J.M.M., M.M. Hulst, E. de Meijer, P.L.J.M. Moonen, A. den Besten, E.P. de Kluijver, G. Wensvoort, R.J.M. Moormann.

Lalystad virus: a new member of the Arteriviridae family.

Proceedings of the third international symposium on positive strand RNA viruses, Clearwater, Florida, USA, Sept. 19-24, 1992, p. 22.

Moormann R.J.M., M.M. Hulst, D. Westra, P. Boender, P. Oudshoorn, G. Wensvoort.

Glycoprotein E1 of hog cholera virus expressed by insect cells protects swine from hog cholera.

Third international symposium on positive strand RNA viruses, Clearwater, Florida, USA, September 19-24, 1992, p. 53.

Mulder W., K. Glazenburg, B. Peeters, L. Jacobs, A. Gielkens, T. Kimman.

Pseudorabies virus which expresses heterologous genes as vaccine vector.

First sectorial BRIDGE meeting on biosafety, Wageningen, The Netherlands, December 6-9, 1992, p. 72.

Mulder W.A.M., J. Priem, K.L. Glazenburg, J.M.A. Pol, A.L.J. Gielkens, T.G. Kimman.
Virulence and pathogenesis of an attenuated and a virulent strain of Aujeszky's disease virus expressing glycoprotein E1 of hog cholera virus.
Abstract 17th international herpesvirus workshop, Edinburgh, August 1-7, 1992, p. 384.

Nabuurs M.J.A.
Onderzoek naar aetiologie en pathogenese van diarree bij gespeende biggen.
Jaarverslag DLO-Centraal Diergeneeskundig Instituut, 1991, pp. 42-50.

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. - 1992, p. 13.

Oirschot J.T. van.
Vaccine efficacy.
Proceedings of the 12th international pig veterinary society congress, The Hague, The Netherlands, August, 17-20, 1992, p. 15-18.

Oirschot J.T. van.
Hog cholera virus.
In: Encyclopedia of virology / Webster, R.G. & A. Granoff [eds.]. Orlando [Florida] : Saunders, 1992

Oirschot J.T. van.
Hog cholera.
In: Diseases of swine / A.D. Leman ... [et al.] eds. - VII edition. Ames : Iowa State University Press, 1992. - pp. 274-285.

Oirschot J.T. van.
Vaccines and diagnostics.
In: Biotechnological innovations in animal productivity. - Oxford : Butterworth-Heinemann, 1992. - Biotechnol. series. - pp. 105-143.

Olyhoek A.J.M.
Leptospirose
Jaarverslag DLO-Centraal Diergeneeskundig Instituut, 1991, pp. 29-36.

Peeters B., N. de Wind, A.L.J. Gielkens, R.J.M. Moormann.
Construction and properties of pseudorabies viruses containing mutations in the essential envelope glycoprotein gp50, gH and gL.
16th International herpesvirus workshop, Monterey, 1991, p. 243.

Peeters B., N. de Wind, A. Gielkens, R. Moormann.
Construction and properties of pseudorabies viruses containing mutations in the essential envelope glycoproteins gp50, gH and gL.
2nd Congress of the European society for veterinary virology. Uppsala, 1991, p. 76.

Peeters B., J. Pol, A. Gielkens, R. Moormann.
Neurovirulence of pseudorabies virus gp50 and gp50+gp63 null mutants indicates that cell-cell fusion is a major mechanism of viral spread.
Abstract 17th international herpesvirus workshop, Edinburgh, August 1-7 1992, p. 28.

Peeters B., J.M.A. Pol, A.L.J. Gielkens, R.J.M. Moormann.
Vaccines against Aujeszky's disease and other animal diseases containing pseudorabies virus mutants.
Europese octrooiaanvraag 1992, nr. 92202096.1

Pijpers A., G. Prenen, E.J. Schoevers, J.W. Seinhorst, L. Jager, J.H.M. Verheijden.

Distribution of oxytetracycline in tissues of the respiratory tract in pigs.

Proceedings of the 12th international pig veterinary society congress, The Hague, The Netherlands, August 17-20, 1992, p. 640. ISBN 90-900-1814-X.

Pol J., F. Wagenaar, J. Broekhuijsen-Davies, G. Wensvoort.

The morphogenesis of Lelystad virus in porcine lung alveolar macrophages.

Proceedings of the 12th international pig veterinary society congress, The Hague, The Netherlands, August, 17-20, 1992.

Pol J., G. Kok, H. Kroes, T. Kimman.

Intravenous inoculation of Aujeszky's disease virus causes necrosis of the corpus luteum.

Proceedings of the 12th international pig veterinary society congress, The Hague, The Netherlands, August, 17-20, 1992, p. 89.

Ramos F.J. dos, I.N. da Silveira, G.J. de Graaf.

Column liquid chromatographic determination of carbadox and olaquinox in feed.

Journal of chromatography 558, 1991, 125-130.

Reek F.H., U. Vecht, H.J. Wisselink, H.E. Smith.

Differentiation between virulent and environmental strains of *Streptococcus suis* type 2 by hybridization and polymerase chain reaction.

Proceedings of the 12th international pig veterinary society congress, The Hague, the Netherlands, August, 17-20, 1992, p. 235.

Rijn P.A. van, E.J. de Meyer, R.J.M. Moormann.

A preliminary map of epitopes on envelope glycoprotein E1 of HCV strain Brescia.

2nd Congress of the European society for veterinary virology. Uppsala, 1991, p. 61.

Rijn P.A. van, E.J. de Meijer, H.G.P. van Gennip, R.J.M. Moormann.

Antigenic domains on envelope glycoprotein E1 of hog cholera virus.

Third international symposium on positive strand RNA viruses, September 19-24, 1992, Clearwater, Florida, USA

Rijn P.A. van, G.K.W. Miedema, H.G.P. van Gennip, R.J.M. Moormann.

Antigenic structure of envelope glycoprotein E1 of hog cholera virus.

Third international symposium on positive strand RNA viruses, September 19-24, 1992, Clearwater, Florida, USA.

Rijsewijk F.A.M., J. Magdalena, J. Moedt, M.J. Kaashoek, M.A. Maris-Veldhuis, A.L.J. Gielkens, J.T. van Oirschot.

Identification and functional analysis of glycoprotein E (gE) of bovine herpesvirus type 1.

Proceedings 17th international herpesvirus workshop. - Edinburgh, August 1-7, 1992, p. 245.

Rijsewijk F.A.M., M.J. Kaashoek, J. Magdalena, M. Maris-Veldhuis, J. Moedt, A. Moerman, J.T. van Oirschot.

Identification of the glycoprotein gE of bovine herpesvirus type 1 (BHV-1) and the vaccine properties of a BHV-1 gE deletion mutant.

Proceedings 2nd ELWW meeting. - Stege, Denmark, November 1992.

Schaaper W.M.M., N.J.C.M. Beekman, M. Hage-van Noort, P. Briel, D. Kuperus, R.H. Melen.

Synthesis of large numbers of peptides for rapid screening of bioactive sequences.

In: Peptides : Proceedings of the 12th American peptide symposium June 16-21, 1991, Cambridge, Massachusetts, U.S.A. / Edited by John A. Smith and Jean E. Rivier. - Leiden : Escom, 1992, pp. 651-652.

Schreuder B.E.C.

Scrapie komt meer voor dan we dachten.

Oogst 8 januari 1992, p. 32.

Schreuder B.E.C.

BSE agent hypotheses.

Abstracts 43rd annual meeting of the European association of animal production (EAAP).
Madrid, 14-17 September 1992, p. 606.

Schreuder B.E.C.

Onderzoek naar scrapie en BSE in Nederland.

Symposium schapengezondheidszorg, Stichting gezondheidsdienst voor dieren in
Oost-Nederland, Rheden, 21 september 1992, pp. 15-26.

Siebenga S., J.E. van Dijk.

European brown hare syndrome in the Netherlands.

XXth Congress of the international union of game biologists, Gödöllő, Hungary, August 21-26,
1991, 763-

Smith H.E., U. Vecht.

DNA sequenties die coderen voor kenmerken van virulentie van *Streptococcus suis* en delen daarvan, daarvan afgeleide polypeptiden antilichamen, alsmede toepassing daarvan bij de diagnose van en de bescherming tegen infecties met *Streptococcus suis* bij zoogdieren, waaronder de mens.

Patent nr O.A. 91.00510, 1991

Smits M., E. Kamp, J. Briaire, R. Jansen, L. van Leengoed, J. van Dijk.

Induction of pneumonic lesions by recombinant cytotoxins of *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

Proceedings of the 12th international pig veterinary society congress, The Hague, The Netherlands, August, 17-20, 1992, p. 187.

Stegeman J.A., T.G. Kimman.

Sporadic spread of Aujeszky's disease virus in pig herds in a region where intensive vaccination is applied.

Proceedings of the 12th international pig veterinary society congress, The Hague, The Netherlands, August 17-20, 1992, p. 64. - ISBN 90-900-1814-X.

Terpstra C.

Control and eradication programmes of Aujeszky's disease in EEC-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. Sing veterinary journal 14, 1990, 1-7.

Terpstra C., G. Wensvoort, L.A.M.G. van Leengoed.

Persistence of Lelystad virus in herds affected by porcine epidemic abortion and respiratory syndrome.

Proceedings of the 12th international pig veterinary society congress, The Hague, The Netherlands, August, 17-20, 1992, p. 118.

Terpstra C., G. Wensvoort, J.M.A. Pol.

Lelystad virus, de verwekker van abortus blauw.

Jaarverslag DLO-Centraal Diergeneeskundig Instituut, 1991, pp. 13-22.

Thomas G.

Vliegenbestrijding in de veehouderij.

VPI juli 1992, pp. 7-9.

Thomas G., J.J. Trapman.

Intra-specific variability in odour and host selection in haematophagous insects.

XIX International congress of entomology, Beijing, China, June 28-July 4, 1992.

Vecht U., H.J. Wisselink, J.E. van Dijk, F.H. Reek, H.E. Smith.

The identification of phenotype of *Streptococcus suis* type 2, associated with virulence in newborn germfree pigs.

Proceedings of the 12th international pig veterinary society congress, The Hague, The Netherlands, August, 17-20, 1992, p. 234.

Vecht U., H.J. Wisselink, J.E. van Dijk, H.E. Smith.

The identification of three new phenotypes of *Streptococcus suis* type 2 associated with virulence in newborn germfree pigs.

Tagung der Deutschen Veterinär-Medizinische Gesellschaft, Rauischolzhausen Germany, June, 3-5, 1992.

Vervelde L., A.N. Vermeulen, S.H.M. Jeurissen.

The role of intra-epithelial and lamina propria leucocytes in the migration of *Eimeria tenella* sporozoites from the villi to the crypts.

Proceedings meeting Avian immunology research group (INRA), Tours, 1992, 8 p.

Wensvoort G., E.P. de Kluijver, E.A. Luijze, A. den Besten.

Antigenic comparison of Lelystad virus from Europe and North America.

Proceedings of the 12th international pig veterinary society congress, The Hague, The Netherlands, August, 17-20, 1992.

Wensvoort G., C. Terpstra, J.M.A. Pol, R.J.M. Moormann, J.J.M. Meulenbergh.

Lelystad agent 2.

Europese octrooiaanvraag 1992, nr. 92200781.0

Wensvoort G.

Swine infertility and respiratory syndrome (SIRS) in the Netherlands.

AASP 4, 1992, 27.

Wensvoort G.

Antigenic comparison of LV from Europe and United States and persistence in affected herds.

AASP 4, 1992, 46.

Wensvoort G.

Taxonomy of pestiviruses based on neutralization tests.

EC report VI/4059/92-EN, 1992, p. 59-60.

Wisselink H.J.

De serologische diagnostiek van *Streptococcus suis* type 2 infecties bij varkens met behulp van een set enzyme-linked immuno sorbent assays.

Scriptie Hogeschool Utrecht, [1992]

Zoun P.E.F., R.S. Boshuizen.

Gannets victim to spillage of lubricating oil and dodecylphenol in the North Sea, winter 1990.

Sula 6, 1992, 29-30.