



Centraal Diergeneeskundig Instituut

1985

Redactie: Drs. P. W. van Olm
Foto's en grafische illustraties: F. Propsma
Tekeningen: J. IJzerman
Druk: Van Haeringen B.V., Den Haag

© CDI, Lelystad

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

Inhoud

Bestuur en directie	4
Organisatie	5
1985	7
Diagnostiek, epizoötiologie en bestrijding van varkenspest	11
Milieucontaminatie door zware metalen op het Verdrongen Land van Saeftinge en het effect ervan op schapen	21
Mucosale immuniteit	29
Mycoplasma infecties	37
Elektronenmicroscopie	43
Publicaties	52
Projectenlijst	107
Productenlijst	113

Bestuur en directie

In 1985 was de samenstelling van het bestuur van de Stichting Centraal Diergeneeskundig Instituut als volgt:

W. J. Lokhorst	– voorzitter
Prof. drs. D. J. Vervoorn	– ondervoorzitter
Drs. J. Janssen	– secretaris
Prof. dr. S. G. van den Bergh	
Prof. dr. J. Huisman	
Ir. C. J. Janmaat	
Drs. C. D. W. König	
J. L. Nysingh	
K. P. A. J. Boonen	– adviserend bestuurslid
Dr. P. Leeftang	– adviserend bestuurslid
Ir. G. Wansink	– adviserend bestuurslid

De heer Dr. ir. A. P. Verkaik neemt aan de vergadering van het bestuur deel als vertegenwoordiger van Ir. G. Wansink, de secretaris van de N.R.L.O.

In het verslag over 1984 staat abusievelijk vermeld als secretaris drs. H. A. van den Berg en als lid ir. P. P. Koks, dit had dienen te zijn, drs. J. Janssen, secretaris en ir. C. J. Janmaat, lid.

De directie van het Centraal Diergeneeskundig Instituut bestond in 1985 uit:

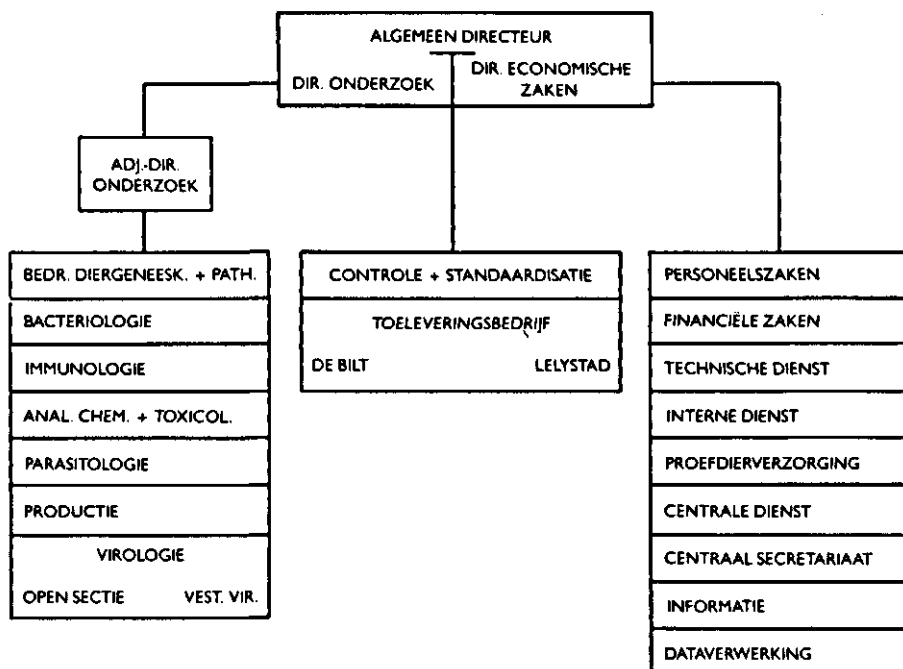
Drs. P. H. Bool	– algemeen directeur
Prof. dr. J. G. van Bakkum	– directeur onderzoek
Drs. C. F. van Nispen	– directeur economische zaken
Dr. J. M. van Leeuwen	– adjunct-directeur onderzoek

De secretaris-generaal van het Ministerie van Landbouw en Visserij heeft per besluit van 16 oktober 1985 de organisatie van het CDI op enkele onderdelen gewijzigd. Dit houdt onder meer in dat de directie zal gaan bestaan uit een directeur en een directeur onderzoek.

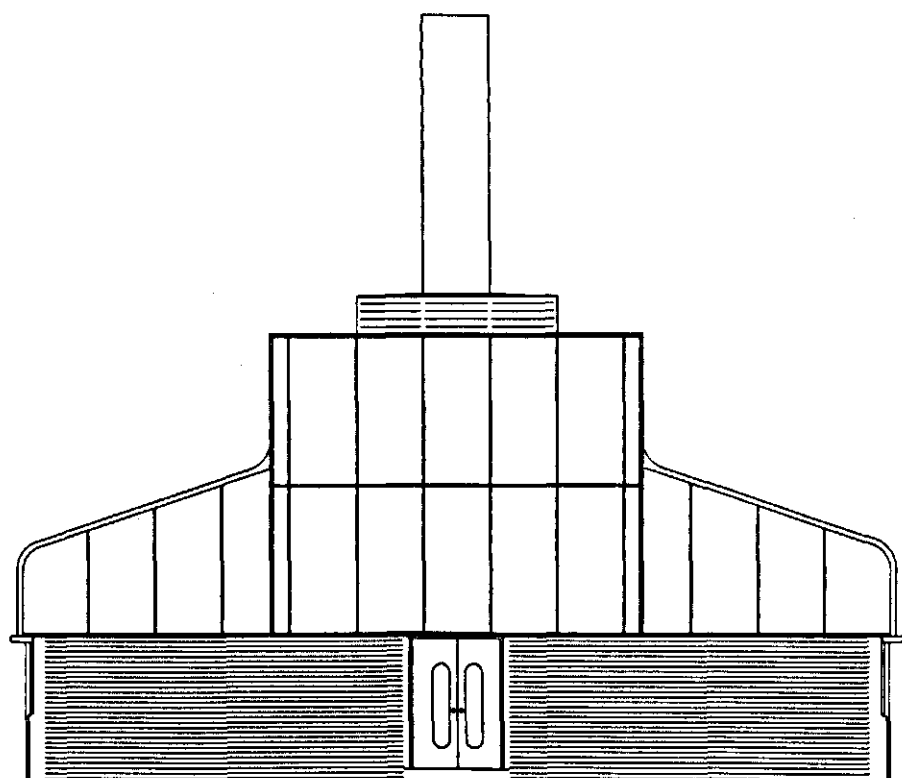
De functies van economisch directeur en adjunct-directeur onderzoek komen te vervallen.

Organisatie

De CDI organisatie is weergegeven in onderstaand schema



Het eerdergenoemde Beleidsbesluit beoogt naast de genoemde wijziging in de directiestructuur een andere organisatie van met name de ondersteunende afdelingen. Aan de uitvoering van het besluit wordt thans gewerkt.



Sinds maart 1985 ressorteert het instituut onder de Directie Landbouwkundig Onderzoek. Daarmede is een einde gekomen aan een beheers- en beleidsrelatie met de Directie Veterinaire Dienst, die in het verleden door een nauwe en effectieve samenwerking werd gekenmerkt.

Deze overgang naar een andere beleidsdirectie vormde de bevestiging van een Beleidsvoornemen van het Ministerie van Landbouw en Visserij, augustus 1983: "Heropstelling van het Landbouwkundig Onderzoek".

Andere Beleidsvoornemens kwamen in het afgelopen jaar eveneens tot besluiten. De voorgenomen 10%-inkrimping van de personeelsformatie van het instituut, reeds sinds 1982 in discussie, werd vastgesteld, met dien verstande dat de formatie van 347 dient te worden teruggebracht tot 313, waarvan 11 formatieplaatsen worden toegevoegd ten behoeve van het onderzoek voortvloeiende uit de invoering van de Diergeneesmiddelenwet.

In deze formatie is tevens begrepen de uitbreiding van het immunologisch onderzoek met een drietal plaatsen, zoals aangegeven in het Masterplan van de NRLO-coördinatiecommissie Immunologie.

Dit laatste betekent dat, niettegenstaande de uitbreiding die in de afgelopen jaren aan het immunologisch onderzoek binnen het instituut was gegeven uit de beschikbare formatie een additionele inzet voor dit aandachtsveld werd verlangd.

De teruggang in de personeelsformatie zal uiteraard tot gevolg hebben dat taken moeten worden afgestoten; in het overleg met de beleidsdirectie werden echter nog geen formele conclusies bereikt. Door uitbreidingen in de Z-formatie kon aan lopende verplichtingen worden voldaan.

Een derde Beleidsbesluit van de secretaris-generaal van het Ministerie van Landbouw en Visserij betrof de organisatiestructuur van het CDI.

Op basis van een onderzoek van de Directie Organisatie en Efficiency van het Ministerie werd besloten een aantal functies op te heffen, nl. Directeur Economische Zaken, Adjunct-Directeur Onderzoek, Coördinator Materiële Zaken, Coördinerend Afdelingshoofd vestiging Virologie en PMF-Coördinator vestiging Virologie.

Dit betekende onder andere dat na het afscheid van drs. C.F. van Nispen op 11 juli als Directeur Economische Zaken geen opvolger kon worden aangesteld. Bij de afscheidsreceptie bleek nogmaals welke belangrijke rol de heer Van Nispen in de afgelopen tien jaar heeft gespeeld, een periode die werd gekenmerkt door bouwen, nieuwe organisatie en centralisatie in de polder.

Aangezien de nieuw geïntroduceerde functie Hoofd Financiële, Materiële en

Algemene Zaken nog niet kan worden vervuld, moet met de beschikbare mankracht een moeilijke interimperiode worden overbrugd.

Dit klemte te meer aangezien enkele medewerkers die sinds lange tijd op sleutelposities werkten het instituut hebben verlaten, zoals de heer J.P. Moerman, hoofd interne dienst Virologie, die op 1 september 1985 vervroegd uit de dienst trad.

Genoemde Beleidsbesluiten hebben aldus in 1985 veel aandacht gevraagd, verwacht moet worden dat de implementatie van deze besluiten ook in het komende jaar intensief overleg zullen vergen.

De in het vorig verslagjaar reeds gesignaleerde trend meer en meer een beroep te doen op extern geld om bepaalde activiteiten te financieren zette zich door. In het kader van twee wetenschappelijke projecten, te weten het wrangonderzoek en Atrofische rhinitis werden bijdragen ontvangen van de Stichting Gezondheidszorg voor Dieren. Deze worden met name gebruikt om externe expertise te recruteren ten einde uit lopend onderzoek sneller resultaten te verkrijgen.

Van de Stichting Technische Wetenschappen wordt steun ontvangen voor het in het verslag 1984 al genoemde Aujeszkyprojekt, gericht op de ontwikkeling van een recombinant DNA-vaccin. Een hierbij aansluitend onderzoek betreffende de lokale immuniteit tegen deze virusinfectie wordt gesteund door de EG.

Commerciële activiteiten gericht op de exploitatie van een nieuwe entstof tegen de ziekte van Marek en ten aanzien van de binnen het CDI ontwikkelde immuomodulator Specol werden verder uitgebreid.

Het gebouwencomplex van de vestiging Virologie, daterend uit de periode 1967-1972 vroeg de afgelopen jaren in toenemende mate onderhoud, met name voor wat betreft het oudste gedeelte, de proefdier-isolatiestallen.

Een goede instandhouding hiervan is noodzakelijk vanuit het oogpunt van de externe veiligheid.

Sterke corrosie van stalen raam- en deurkozijnen en van de deuren zelf bedreigt echter de "dichtheid".

In de loop van het verslagjaar zijn de problemen geïnventariseerd en zijn prioriteiten aangegeven.

Verwacht mag worden dat in de loop van 1986 een begin gemaakt kan worden met een systematische renovatie van het complex, te beginnen met het stalgedeelte.

Na jaren van overleg tussen Veterinaire Dienst, Directie Visserijen, de Landbouwhogeschool, de Faculteit der Diergeneeskunde, het bedrijfsleven en het

CDI werd een begin gemaakt met de realisatie van een visziekteunit. Het visziekte-onderzoek, lange tijd ondergebracht bij de Faculteit der Diergeneeskunde, werd daar slachtoffer van de bezuiniging. De activiteiten binnen het CDI zullen in eerste instantie een zeer bescheiden omvang hebben. Er is één medewerkster aangetrokken, die voor ondersteuning aangewezen zal zijn op een met extern geld gefinancierde hulpkracht. De visziekte-unit gaat functioneren in het kader van de afdeling Bedrijfsdiergeneeskunde en Pathologie. De noodzakelijke technische voorzieningen, onder meer aquaria, moesten in 1986 gerealiseerd worden. De werkzaamheden zullen zich voorlopig beperken tot het op gang brengen van het diagnostisch onderzoek.

Het onderzoek op het gebied van de recombinant-DNA technieken ontwikkelt zich snel. Door de aard van zijn faciliteiten is de vestiging Virologie de aangewezen plaats voor het nemen van proeven met grote huisdieren, wanneer die speciale veiligheidsmaatregelen eisen, bijv. op C I- of C II-niveau.

De eerste proeven op C II-niveau vonden inmiddels plaats. Enige improvisatie was hierbij nodig omdat het recombinant-DNA onderzoek, onder meer met het oog op bescherming van de mens, toch weer andere veiligheidseisen stelt dan die routinematig bij Virologie worden gehanteerd.

Ook in eigen huis kwam het recombinant-DNA onderzoek verder tot ontwikkeling, door personeelstekort blijft het echter op te beperkte schaal. Aanpak in de noodzakelijk geachte omvang zal alleen mogelijk zijn met extern geld. Voor zover niet rechtstreeks van de industrie afkomstig worden de voor dit onderzoek bestemde middelen gekanaliseerd via een aantal commissies die "biotechnologie" in hun vaandel voeren. Onduidelijkheden, onder andere voor wat betreft taakafbakening, kwamen tot nu toe de vooruitgang niet ten goede. De instelling van een aparte groep "Biotechnologisch onderzoek ten behoeve van de dierlijke produktie" in het kader van de NRLO zal hier hopelijk verbetering in brengen.

In 1985 lag de nadruk voor wat betreft het recombinant-DNA onderzoek binnen het CDI op de karakterisering van het genoom van de belangrijkste non-arbo togavirussen, te weten varkenspest- en BVD-virus. Deze lijn van onderzoek betekent een belangrijke aanvulling van de parallel lopende ontwikkeling, gericht op karakterisering van isolaten met behulp van monoclonale antilichamen.

De situatie op het terrein van de Veewetziekten ontwikkelde zich in het algemeen in gunstige zin. De rabiësinvasie in Zuid-Limburg lijkt tot staan gekomen, er zijn uiteindelijk geen aanwijzingen dat het virus vaste voet heeft gekregen. Ook de varkenspestepizoötie kwam tot staan, na 26 juni werden geen besmette bedrijven meer aangetroffen. In de omringende landen komt de ziekte echter nog steeds voor, terwijl het ook niet uitgesloten moet worden dat

in Nederland zelf nog virus aanwezig is. Met name de na intrauteriene infectie met weinig virulent virus geboren immuuntolerante dieren vormen een gevaar.

In maart werd de varkenshouderij opgeschrikt door een aantal gevallen van Afrikaanse varkenspest (AVP) in België. De dreiging van een dergelijke import, ergens in Europa, was aanwezig sedert de ziekte tegen het einde van de jaren vijftig enzoötisch werd in Spanje en Portugal. Gezien het toegenomen toeristenverkeer is het verbazingwekkend dat 25 jaar verstreek voor een ongeluk gebeurde.

Mede omdat het waarschijnlijk was dat AVP-virus in vlees via abattoirs verspreid kon zijn was het noodzakelijk ook in ons land de diagnostische faciliteiten, die al meer dan twintig jaar gereed liggen, te mobiliseren. Ondermeer werden enkele varkens besmet met uit België afkomstig virus. De Belgische ervaring, dat de infectie op sommige bedrijven slechts door serologisch onderzoek was op te sporen, was reden om een relatief eenvoudige techniek voor onderzoek van grote aantallen sera te ontwikkelen. Deze test, op basis van geïnfecteerde celcultures, werd bedrijfsklaar gemaakt.

De uitbouw van de virologische diagnostiek bij de Gezondheidsdiensten voor Dieren kon verder ondersteund worden. In de loop van het jaar kwamen gestandaardiseerde haemagglutinatie en haemagglutinatie-inhibitietests voor para-influenza type 3 ter beschikking en werd een ELISA voor het aantonen van antilichamen tegen respiratory syncytial, i.c. pinkengriepvirus gebruiksklaar gemaakt en geïntroduceerd. Een ELISA voor het aantonen van BVDV-antistoffen zal in 1986 het programma voor wat betreft de diagnostiek van belangrijke virusziekten van runderen completeren.

Diagnostiek, epizootiologie en bestrijding van varkenspest

In de jaren 1981–1985 is de Nederlandse varkenshouderij geplaagd door een bij tijd en wijle explosief verlopende varkenspest-epizootie. De toename in het aantal uitbraken ging gepaard met een enorme uitbreiding van het diagnostisch onderzoek. In 1981 is de ziekte in Zeeland tot staan gebracht door een intensieve screening van de bedrijven in het besmette gebied. Deze aanpak had in 1982 en de daaropvolgende jaren toen de uitbraken vooral plaatsvonden in gebieden met een hoge varkensdichtheid minder succes. De uitbraken begonnen in de provincie Noord-Brabant, waarna de epizootie zich naar Limburg, Gelderland en Overijssel uitbreidde. Ook in de provincies Utrecht, Zuid- en Noord-Holland deden zich – in mindere mate – gevallen voor. In tegenstelling tot de epizootie van 1977 waren de uitbraken veelal het gevolg van infecties met laag-virulente varkenspest-virus (VPV) stammen. Relatief veel gevallen van varkenspest werden gevonden in materiaal dat slechts ter screening naar het CDI werd opgestuurd, zonder dat de anamnese aanleiding gaf tot een duidelijke verdenking van een infectie met dit virus. In het voorjaar van 1983 is men begonnen met het instellen van noodentingsgebieden. Daarvan zijn er nu 23. In deze gebieden werden alle varkens ouder dan 2 weken geënt, gevolgd door een na-enting van de biggenstroom op een leeftijd van 5–9 weken. Eind 1985 werd ongeveer 85% van de Nederlandse varkensstapel geënt. Het hoge entingspercentage heeft de vraag naar serologisch onderzoek sterk doen toenemen. Vooral bij topfokbedrijven in de entgebieden leeft de behoefte ongeënt fokmateriaal buiten een entgebied te kunnen brengen en te exporteren. Hiertoe moeten grote groepen ongeënte fokgeltjes onderzocht worden op afwezigheid van antilichamen tegen varkenspest. Behalve dat de epizootie een groot beslag heeft gelegd op de onderzoekscapaciteit van de afdeling werd deze ook geconfronteerd met diverse problemen met betrekking tot de diagnostiek en de bestrijding van varkenspest. Dit verslag zal ingaan op deze problemen en aangeven welk onderzoek hiervoor is verricht.

Diagnostiek

Aantonen van het antigeen

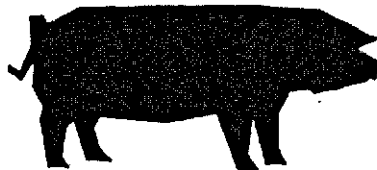
Het virusantigeen wordt in orgaancoupees aangetoond met de immunofluorescentietest (IFT). Deze test detecteert niet alleen infecties met een veldstam van het VPV doch kan ook positief zijn wanneer het varken 5–15 dagen tevoren geënt is met virus van de Chinese (C)vaccinstam. Tevens toont de IFT een infectie met het nauw verwante en ook tot de Pestivirussen behorende bovine-virus diarreevirus (BVDV) aan. BVDV-infecties komen af en toe bij varkens

voor. Zowel een positieve IFT door een enting als na een infectie met BVDV mag niet leiden tot ruiming van het betreffende bedrijf. Meestal is in gevallen van C-virus alleen de tonsil positief in de IFT, terwijl bij varkenspest ook nier, milt en ileum in wisselende mate positief zijn. Tezamen met de anamnese geven deze bevindingen voldoende aanleiding tot differentieel diagnostisch onderzoek, doch dit duurt in het geval van een enting circa 5 dagen en bij een mogelijke BVDV-infectie tot ongeveer 6 weken. Dit is niet verenigbaar met de noodzaak van een snelle ruiming van een met varkenspest besmet bedrijf. Er is behoefte deze differentieeldiagnostiek te versnellen.

Aantonen van antilichamen

Dit gebeurt met de "Neutralising-Peroxidase-Linked Assay" (NPLA). Deze neutralisatietest duurt 4 dagen. Eventuele positieve sera worden hertest waardoor een positieve uitslag minstens 8 dagen op zich laat wachten. Het voordeel van deze neutralisatietest is dat titers tegen BVDV niet aangetoond worden en dat de test zeer betrouwbaar is.

Gezien de lange duur van de NPLA en de sterke toename van het aantal te onderzoeken sera is er echter behoefte aan een snellere test. Dit zou een ELISA kunnen zijn. Deze moet echter wel net zo discriminatief zijn als de NPLA.



Onderzoek ten behoeve van de diagnostiek

Zowel voor het verbeteren van de differentieeldiagnostiek als voor het maken van snelle serologische tests leek het ontwikkelen van monoclonale antilichamen (MCA's) tegen zowel VPV als BVDV grote mogelijkheden te bieden. MCA's zijn in tegenstelling tot hyperimmunsera specifiek voor slechts een antigene determinant (= epitoom) van het te onderzoeken antigeen en in theorie in ongelimiteerde hoeveelheden te maken. Deze monospecificiteit en de eenvoudige productie als eenmaal de MCA producerende cellen gemaakt zijn, maken deze MCA's tot ideale gereedschappen voor diagnostisch onderzoek. Na enige aanloopproblemen kan nu worden beschikt over 13 MCA's geproduceerd tegen VPV-stam Brescia en 13 gemaakt tegen BVDV-stam 1138. Deze 26 MCA's zijn gekarakteriseerd met in monolayers groeiende VPV- en BVDV-stammen. Ondanks de grote verwantschap die er bestaat tussen VPV

en BVDV is er slechts één MCA dat alle virusstammen herkent. 8 MCA's geproduceerd tegen VPV-stam Brescia herkennen alle geteste VPV-stammen terwijl de overige 5 dit in wisselende mate doen. Het vaccinvirus wordt niet door deze 5 herkend. Deze 13 tegen VPV gerichte MCA's zien geen BVDV-stammen. Onder de 13 MCA's gericht tegen BVDV-stam 1138 is er één (MCA-14) die alle geteste Pestivirus-stammen herkent. Verder onderzoek is nog noodzakelijk om deze MCA's volledig te karakteriseren. Het lijkt dat er een groep is die alle runder BVDV-stammen herkent en een groep die dit in wisselende mate doet. BVDV-stammen die uit varkens geïsoleerd zijn worden slechts door MCA-14 en niet door de andere 25 MCA's gezien.

Versnelde differentieeldiagnostiek

De hoge specificiteit van de MCA's biedt voldoende mogelijkheden om de differentieeldiagnostiek tussen VPV-, C-virus en BVDV-infecties te versnellen. Hiertoe is een immunoperoxidasetest ontwikkeld (IPT), die, uitgevoerd op cryostaatcoupes van verdacht materiaal, nog dezelfde dag uitsluitsel kan geven of verder onderzoek noodzakelijk is of dat onmiddellijk kan worden besloten tot de diagnose varkenspest. Deze test wordt uitgevoerd met twee verschillende MCA's tegen VPV, MCA-1 en MCA-2. Herkenning van het virus door beide MCA's geeft ondubbelzinnig aan dat het een infectie met VPV betreft. Wanneer alleen MCA-2 het virus herkent dient verder onderzoek op de aanwezigheid van C-virus plaats te vinden. Tot nu toe bleek met behulp van een konijnproef in al deze gevallen inderdaad het entvirus aanwezig te zijn. Wanneer beide MCA's het virus niet herkennen betreft het vrijwel zeker een infectie met BVDV. Dan wordt het betreffende bedrijf niet geruimd maar ingesloten tot de uiteindelijke diagnose door middel van serologisch onderzoek is gesteld. Het onderzoek betreffende deze niet door MCA-1 en MCA-2 herkende isolaten is nog niet volledig afgesloten doch het lijkt hier in alle gevallen te gaan om infecties met BVDV. Toepassing van de MCA's geproduceerd tegen BVDV zal het zeker mogelijk maken ook deze diagnose in korte tijd af te ronden. Het gebruik van de IPT is erg succesvol geweest. Gevallen van C-virusinfecties en een enkele BVDV-infectie kwamen aan het licht welke niet als zodanig uit de anamnese bleken, terwijl veel gevallen van varkenspest onmiddellijk als zodanig herkend werden zonder dat verder onderzoek noodzakelijk was.

Serologie

Met de MCA's tegen VPV is ook een serologische test ontwikkeld, analoog aan de voor zwoegerziekte gebruikte complex-trapping-blocking CTB-ELISA. Voor deze test wordt een MCA tegen VPV gecoat aan de wand van een ELISA-plaatje, terwijl een ander MCA, dat een andere epitop van het virus herkent, wordt gebruikt als conjugaat. Wanneer hier virusantigeen aan wordt toege-

voegd zullen beide MCA's zich aan hun epitoom op het virus binden en ontstaat er een signaal. Wanneer nu het antigeen eerst wordt geïncubeerd met een te onderzoeken serum en dan wordt toegevoegd aan het ELISA-plaatje met de twee MCA's zullen, in het geval van een positief serum, beide of één van de betreffende epitopen afgeschermd worden door de antilichamen van het onderzochte varken en zal er geen of slechts een gering signaal ontstaan. De gevonden remming wordt uitgedrukt in het percentage inhibitie ten opzichte van een negatief serum. Deze test blijkt zeer snel en gevoelig te zijn, is specifiek voor VPV, en zal in 1986 de NPLA gaan vervangen voor het uitvoeren van de massa-serologie.

Bestrijding en onderzoek

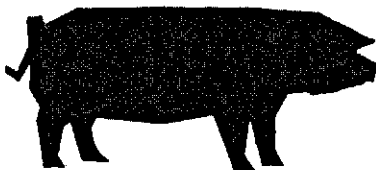
Verspreiding van het virus

Er zijn in de afgelopen 5 jaar 450 uitbraken van varkenspest geweest. De grootte en de aard van het bedrijf hebben beide invloed op het aantal uitbraken in relatie tot het aantal bedrijven in Nederland (tabel 1).

Tabel 1. Aantal uitbraken in de epizootie 1981-1985 per bedrijfstype in relatie tot het aantal aanwezige bedrijven van dat type in 1984.

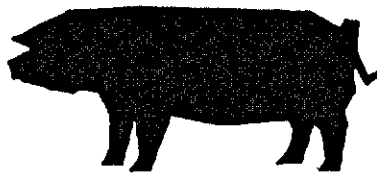
Fok- en gemengde bedrijven			Mestbedrijven		
Aantal zeugen	Positief/ aanwezig*	(%)	Aantal mestvarkens	Positief/ aanwezig	(%)
≤ 50	48/10740	(0,4)	≤ 500	129/14723	(0,9)
> 50	169/8401	(2,0)	> 500	104/2315	(4,5)
Totaal	217/19141	(1,1)		233/17038	(1,4)

* Bron voor het aantal aanwezige bedrijven: Landbouwcijfers 1985, LEI.



Duidelijk blijkt dat grote bedrijven een veel groter risico lopen besmet te raken dan de kleinere; mestbedrijven zijn iets gevoeliger dan fok- en gemengde bedrijven. Dit laatste is gemakkelijk te begrijpen uit het gegeven dat mestbedrijven veel varkens van diverse bronnen aankopen en zo het virus kunnen binnenslepen. Dit blijkt ook uit verdere gegevens verkregen uit het epizootiolo-

gisch onderzoek. Bij de mestbedrijven was 44% van de uitbraken in verband te brengen met aankoop van biggen van besmette fokbedrijven, terwijl dit bij slechts 13% van de fokbedrijven het geval was. Uitbraken waarvan de oorzaak onbekend was of toegeschreven werd aan een buurtinfectie werden bij 52% van de mestbedrijven en bij 87% van de fokbedrijven gevonden. Het voederen van kliek werd op 4% van de mestbedrijven als oorzaak gemeld. Vooral bij de fokbedrijven, en in iets mindere mate ook bij de mestbedrijven, zijn onbekende factoren verantwoordelijk voor de besmetting. Onderzoek is uitgevoerd naar de rol die ratten kunnen spelen bij de overbrenging. Hieruit kon worden geconcludeerd dat dit waarschijnlijk niet het geval is.



Ook het inslepen van virus in varkensstallen na het uitrijden van besmette mest op naburige percelen is hoogst onwaarschijnlijk. Het blijkt dat het virus niet bestand is tegen de omstandigheden die dan heersen.

In de gevallen, waarbij verplaatsing van besmette dieren kan worden uitgesloten moet vooral worden gedacht aan overbrenging via de mens. Veel contacten bestaan tussen varkenshouders onderling of via personen die beroepsmatig bij de varkenshouders komen. Castreurs, voorlichters, vaccinatieploegen, blikkers, dierenartsen en de varkenshouders kunnen het virus door middel van besmette kleding, schoeisel, instrumentarium en geneesmiddelen overbrengen. Het is veelal gebruik in de diergeneeskundige praktijk dat naalden en spuitjes op meer dan een bedrijf gebruikt worden zonder deugdelijk ontsmet te zijn. Uit het oogpunt van de bestrijding van besmettelijke dierziekten is dit een absolute kunstfout. Grote bedrijven zullen meer van deze via de mens lopende contacten hebben en het is dan ook begrijpelijk dat op zowel de grote fok- en fokmestbedrijven als op de grote mestbedrijven in de afgelopen epizootie relatief 5 maal zoveel uitbraken voorkwamen dan op de kleine bedrijven.

Effectiviteit van de entingen

De entingen hebben uiteindelijk effect gesorteerd, sinds eind juni 1985 zijn er in de geënte gebieden geen uitbraken meer geweest. Wanneer men kijkt naar het aantal uitbraken in een entgebied voor dat een enting de varkensstapel in

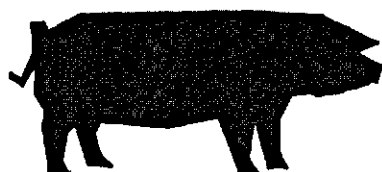
theorie volledig beschermd heeft (30 dagen na het begin van de massa-enting) en daarna, dan is in de meeste gebieden een snelle daling te zien. Echter in sommige entgebieden vonden nog uitbraken plaats 9 tot 13 maanden na het begin van de massa-enting of voordat de varkens door entingen voldoende beschermd konden zijn. Drieënzestig maal werden nog positieve bedrijven gevonden 30 dagen na het begin van de massa-enting (tabel 2). Veertien uitbraken vonden plaats in gebieden waar geen enting is ingesteld.

Tabel 2. Aantal en percentage uitbraken per bedrijfstype voor en na het tijdstip van 30 dagen na het begin van de massa-enting.

	Aantal		Percentage	
	voor	na	voor	na
<i>Fok- en gemengde bedrijven</i>				
≤ 50 zeugen	44	4	11	6
> 50 zeugen	131	38	34	60
<i>Mestbedrijven</i>				
≤ 500 mestvarkens	121	8	31	13
> 500 mestvarkens	91	13	24	21
Totalen	387	63	100	100

Het relatieve aandeel van de kleine bedrijven in het aantal uitbraken neemt na vaccinatie sterk af. Eénentachtig percent van de uitbraken in reeds langer dan 30 dagen geënte populaties had betrekking op grote bedrijven met meer dan 50 zeugen en/of meer dan 500 mestvarkens. In populaties die niet of nog niet zo lang geënt waren was dit slechts 58%.

Het blijkt mogelijk de effectiviteit van de enting nader te specificeren en in een getal uit te drukken. Wanneer men het aantal uitbraken voor het begin van de massa-enting (+ 30 dagen) vermindert met het aantal uitbraken daarna, en dit getal deelt door het totale aantal uitbraken wordt de effectiviteit van de enting uitgedrukt in een getal dat ligt tussen - 1 en + 1, waarbij + 1 volledige effectiviteit uitdrukt. Voor alle bedrijfstypen is dit uitgerekend (tabel 3).



Tabel 3. Effectiviteit van enting per bedrijfstype.

Bedrijfstype	Aantal bedrijven	Gem. aantal varkens			Effectiviteit
		Z*	B*	M*	
Klein fokbedrijf ≤ 50 Z	37	29	155	1	0,89
Klein fokmestbedrijf ≤ 50 Z en ≤ 500 M	11	21	222	124	0,64
Klein mestbedrijf ≤ 500 M	129	0	245	245	0,88
Middelgroot fokmestbedrijf > 50 Z en ≤ 500 M	39	100	821	303	0,79
Groot mestbedrijf > 500 M	104	0	1040	1040	0,75
Groot fokbedrijf > 50 Z	98	133	699	13	0,55
Groot fokmestbedrijf > 50 Z en > 500 M	32	193	1940	1060	0,25

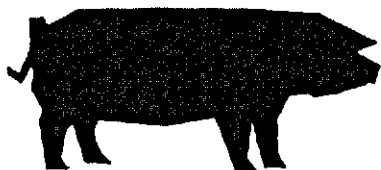
* Z = zeugen; B = biggen en opfok; M = mestvarkens.

Vooraf de sterke daling van de effectiviteit op de grote fok- en fokmestbedrijven is opvallend. Dit wijst op een persistentie van het virus in grote populaties, zonder dat dit direct met specifieke symptomen tot uiting komt. Verschillende verklaringen zijn hier voor aan te voeren. Op de grote fokbedrijven kunnen intrauterien geïnfecteerde zeugen (carrier sows) in ruime mate voorkomen. Op twee bedrijven is dit onderzocht en hier waren resp. 6% en 43% van de onderzochte zeugen intrauterien geïnfecteerd. Nakomelingen van deze zeugen kunnen het virus gedurende langere tijd met zich meedragen zonder dat zij symptomen van varkenspest vertonen. Het is mogelijk dat pas op het mestbedrijf problemen optreden.

Ook de aanwezigheid van grote aantallen onbeschermden of onvoldoende beschermden dieren op deze grote bedrijven kan een oorzaak zijn. Onderzoek naar de entstatus van in de massa-enting gevaccineerde zeugen liet zien dat 90-95% van deze dieren een titer had in de NPLA van ≥ 25 . Het percentage varkens dat in de na-entingen is geënt en dat een titer had van 25 of hoger was echter veel lager en varieerde van 30-55%. Onderzoek naar de waarde van titers van ≤ 25 door infectieproeven wees uit dat niet al deze dieren beschermd waren tegen varkenspest. Sommigen stierven na besmetting, sommigen werden niet of slechts gering ziek maar verspreidden het virus wel. Een van de oorzaken van het slechte resultaat van de na-entingen kan zijn dat biggen geënt worden terwijl ze nog maternale antilichamen bezitten afkomstig van het geënte moederdier. Deze biggen kunnen gehinderd worden in hun respons op de enting en geen of een onvoldoende actieve immuniteit

ontwikkelen. Uit onderzoek bleek dat de maternale immuniteit het slechte resultaat slechts voor een deel kan verklaren. In een praktijkproef zijn biggen geboren uit geënte zeugen op 5 – 6, 7 – 8 en 9 – 10 weken geënt. Acht weken na vaccinatie vertoonde resp. 5 – 10%, 35 – 40% en 70 – 75% een (positieve) immuunrespons.

De entvoorschriften van de Veterinaire Dienst zijn aan deze bevindingen aangepast. De na-entingen van biggen behoort nu pas op een leeftijd van 7 – 9 te worden verricht, terwijl de fokgelten populatie op 6 – 7 maanden herent wordt. Dit laatste brengt de entstatus van deze groep dieren die beslist voor de dracht al beschermd moet zijn op de beoogde 90 – 95% serologisch positief.



Er zijn echter in de praktijk grote groepen biggen gevonden die, alhoewel ze op 8 – 9 weken leeftijd geënt waren, niet het te verwachten resultaat lieten zien. Dit bleek gebonden aan bepaalde bedrijven. Er viel een groep "slechte" en een groep "goede" bedrijven te onderscheiden. Nagegaan is of er misschien goede en slechte partijen vaccin in omloop waren, dit bleek niet het geval te zijn. Alle 36 tot nu toe in varkens onderzochte partijen waren van een goede kwaliteit, met één, zeer specifieke, uitzondering (zie onder). Er moet derhalve zeker gedacht worden aan niet geheel lege artis uitgevoerde entingen. Door middel van een circulaire aan de praktiserende dierenartsen en door voorlichting in *de Boerderij* is de aandacht gevestigd op de juiste manier van enten.

Contaminatie van een VPV-vaccin met BVDV

In de herfst van 1984 werden wij geconfronteerd met 8 uitbraken in entgebied 12 die circa 3 – 4 maanden na het begin van de massa-enting optraden. Het betrof in alle gevallen congenitale infecties waarbij veel tomen van in het eerste derde deel van de dracht geënte zeugen betrokken waren. De symptomen waren specifiek voor die welke gevonden worden bij congenitale varkenspest infecties maar de karakterisering van het antigeen in de IPT met MCA-1 en MCA-2 wees evenwel in de richting van een infectie met BVDV. Bij navraag bleek dat alle betrokken bedrijven tijdens de massa-enting met één partij van een in lammerniercellen geproduceerd VPV-vaccin waren

geënt. Het vermoeden rees dat deze partij mogelijkerwijs met BVDV was gecontamineerd. In deze partij werd na onderzoek niet het verwachte C-virus aangetroffen maar een Pestvirus dat wel herkend werd door vier MCA's tegen BVDV en niet door de MCA's tegen VPV. Met behulp van dierproeven is dit virus inderdaad gekarakteriseerd als BVDV. Een van de 8 bedrijfsisolaten is ook gekarakteriseerd met MCA's en vertoonde hetzelfde patroon. Er zijn daarom gegronde redenen om aan te nemen dat de congenitale infecties op deze bedrijven veroorzaakt zijn door het gecontamineerde vaccin. Mogelijkerwijs zijn de lammerniercellen besmet geraakt met BVDV afkomstig uit het serum dat is gebruikt in het kweekmedium, of waren de lammerniercellen afkomstig van een met BVDV geïnfecteerd lam.

Uitmo 1985 was Nederland zes maanden vrij van varkenspest. Dit resultaat steekt gunstig af bij dat van de varkensrijke buurlanden en werd bereikt dankzij een op grote schaal doorgevoerde vaccinatie van de varkensstapel en een langdurige en systematische na-enting. Helaas vonden in het begin van 1986 twee uitbraken plaats in de provincie Groningen. Deze zijn waarschijnlijk veroorzaakt door het clandestien voederen van ongekookte kliek. Beide bedrijven zijn geruimd en de infectie lijkt in dit varkensarme gebied geen vaste grond onder de voeten te hebben gekregen. Eens te meer lijkt dit te bewijzen dat het voederen van kliek een zwakke schakel is in de bestrijding van varkenspest. Aangenomen dat het bij deze twee uitbraken zal blijven en dat het virus niet wordt overgebracht naar de varkensrijke gebieden in het zuiden van Nederland, zal in 1986 gedacht kunnen gaan worden aan het afbouwen van de vaccinatie. Gezien de snelle "turn-over rate" zal de varkensstapel in betrekkelijk korte tijd haar bescherming tegen herintroductie van het virus verliezen. Het zou mogelijk moeten zijn deze afbouw te begeleiden door in EEG-verband genomen maatregelen tegen de vrije invoer van varkens en producten van varkens uit besmette landen. De maatregelen zouden een tijdelijk karakter kunnen hebben en moeten gelden tot de officiële status "Vrij van varkenspest" wordt verkregen. De maatregelen kunnen uiteraard worden ingetrokken als zich een nieuwe reeks van uitbraken zou voordoen welke, zonder herinvoering van een massa-enting, niet onder controle is te krijgen. Volgens de richtlijnen van de EEG wordt de officieel varkenspest vrije status verkregen als er gedurende 12 maanden geen uitbraken van de ziekte zijn geweest, er niet geënt wordt en een breed opgezet onderzoek heeft aangetoond dat er geen specifieke antilichamen als gevolg van latente infecties in de varkensstapel voorkomen. Als de vaccinaties worden beëindigd zal de behoefte aan serologisch onderzoek derhalve sterk toenemen. De op het CDI ontwikkelde CTB-ELISA biedt hiervoor goede mogelijkheden.

De identificatie en differentiatie van varkenspestisolaten met behulp van MCA's zal worden voortgezet. Met de beschikbare MCA's is het in principe

mogelijk om de verwantschap van isolaten te bestuderen en langs deze weg micro-epizootologisch onderzoek te bedrijven.

Epitooop-analyse kan een belangrijke bijdrage leveren voor een groep- c.q. subgroepindeling van VPV- en BVDV-isolaten. MCA's scheppen eveneens de mogelijkheid voor onderzoek naar heterogeniteit van isolaten, hetgeen van belang is in verband met virulentie. Daarnaast zal met behulp van complementaire DNA-clonen onderzoek plaatsvinden naar de verschillen in het virale genoom van VPV en BVDV. Door het genoom van virulent-, zwak-virulente en vaccinstammen van VPV-clonen in kaart te brengen is het wellicht mogelijk verschillende biologische eigenschappen van deze clonen te relateren aan bepaalde delen van het genoom.

Aan het project werken mee:

F. E. van Alphen, M. Bloemraad, J. Boonstra, M. M. Hulst, E. P. de Kluyver, C. Kragten, dr. R. J. M. Moormann, dr. C. Terpstra en drs. G. Wensvoort.

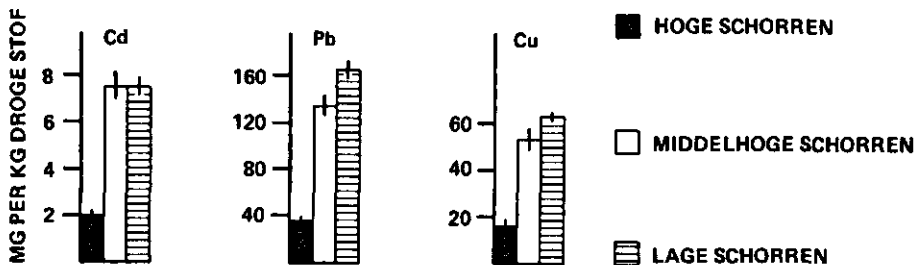
Milieucontaminatie door zware metalen op het Verdrongen Land van Saeftinge en het effect ervan op schapen

Het Verdrongen Land van Saeftinge (Zeeuws-Vlaanderen) is deel van het Schelde-estuarium en vormt één van de zeer zeldzame brakwater-getijdgebieden in West-Europa. Beweiding met schapen is onderdeel van het beheer van dit unieke ecosysteem. In dat kader vormt de contaminatie van de Westerschelde een potentiële bedreiging: deze rivier is sterk belast met (onder andere) zware metalen, en tot ca. 90% van deze belasting blijft in het estuarium achter.

In samenwerking met de Gezondheidsdienst voor Dieren in West- en Midden-Nederland (Gouda), het Delta Instituut voor Hydrobiologisch Onderzoek (Yerseke) en de schapenhouder werd daarom onderzoek verricht naar de milieu-belasting door een aantal zware metalen en de mogelijke gevolgen daarvan voor de gezondheidstoestand van de schapen. Daartoe werd in de periode mei 1983 tot juli 1984 maandelijks grond en vegetatie gemonsterd, terwijl van schapen die tijdens de onderzoeksperiode stierven, lever- en niermonsters werden genomen. De monsters werden door middel van atoomabsorptiespectrometrie geanalyseerd met betrekking tot het gehalte van een aantal zware metalen.

Grondmonsters

De metaalgehalten gemeten in grondmonsters van Saeftinge duiden op een verontreinigingsgraad (gedefinieerd als het quotiënt van het actuele sedimentgehalte/achtergrondwaarde overeenkomstige sedimenten) variërend van 2 (voor koper) tot 8 (voor cadmium). Grote seizoensfluctuaties werden niet waargenomen, daarentegen kon wel een belangrijk verschil worden vastgesteld tussen monsters afkomstig van verschillende locaties op de schorren.



Figuur 1.

Gehalten van cadmium (Cd), lood (Pb) en koper (Cu) in grondmonsters van drie locaties (hoge, middelhoge en lage schorren). De gemeten hoeveelheden zijn weergegeven als gemiddelden gedurende de onderzoeksperiode $\pm$ de standaardfout (SEM) van die gemiddelden ($n = 16$).

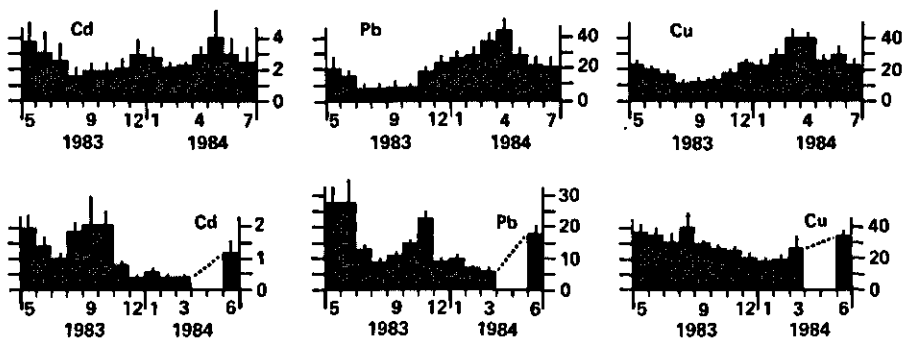
Dit is weergegeven in figuur 1: het blijkt dat de lager gelegen delen van de schor (de "kommen") ongeveer 4 maal meer zijn verontreinigd dan de hoger gelegen locaties (de "ruggen"). Een verklaring daarvoor kan gedeeltelijk worden gevonden in de verschillen in mate en frequentie van overstroming van de verschillende schorlocaties, als gevolg waarvan op de ruggen aanmerkelijk minder slib wordt afgezet dan in de kommen, waar het water bovendien ook nog langer blijft staan hetgeen de slibafzetting bevordert. De waargenomen verschillen hangen bovendien direct samen met de verschillen in slib- c.q. humusgehalten.

Vegetatie

Analyse van de elementen in de vegetatie gaf wel een aanzienlijke seizoensfluctuatie te zien. In figuur 2A zijn de maandelijks gemeten gehalten weergegeven, waaruit blijkt dat de gehalten vroeg in de lente 2–5 maal hoger zijn dan in de nazomer. Aangezien de grondgehalten een dergelijke seizoensvariatie niet te zien geven, suggereert dit een indicatieve relatie tussen de groeicyclus van de plant en de opname van de in het onderzoek betrokken elementen, een verschijnsel dat ook in tal van andere onderzoeken naar voren is gekomen. De relatie tussen bodem- en vegetatiegehalte van metalen is echter uitermate complex, omdat bijvoorbeeld ook de aard van de bodemdeeltjes, het organische stofgehalte en de zuurgraad een belangrijke rol spelen. Aangezien deze factoren ook nog per element en per plantesoort kunnen verschillen, is het voorshands niet mogelijk om aan de hand van bodemgehalten de biologische beschikbaarheid te voorspellen. In het geval van Saeftinge treden dan nog extra complicaties op, omdat daar het gehalte van een plant niet uitsluitend bepaald wordt door opname via het wortelsysteem, maar in overstromde situaties ook opname plaats kan vinden via de huidmondjes. Bovendien wordt het uiteindelijk gehalte van de bovengrondse plantedelen mede bepaald door aanhangend slib dat achterblijft na een overstroming. Direct na een overstroming zijn de schorplanten dan ook overtrokken met een grijze waas van slib. Oriënterend onderzoek heeft uitgewezen dat de bijdrage van aanhangend slib, afhankelijk van de omstandigheden, kan variëren van 50 tot 90%. Uiteraard spelen daarbij ook de weersomstandigheden een rol, terwijl directe depositie vanuit de lucht eveneens kan bijdragen tot de contaminatie.

Cadmium

Met betrekking tot de vraag wat uit consumptie-oogpunt toelaatbaar is, geven de onderzoeksresultaten aan dat het cadmiumgehalte in bepaalde perioden van het jaar tot ca. een factor 2 boven de tolerantiegrens stijgt. Consequen-



Figuur 2A (boven).

Gehalten van cadmium (Cd), lood (Pb) en koper (Cu) in vegetatie (in mg per kg droge stof), weergegeven als maandgemiddelden van vier plantesoorten $\pm$ de standaardfout (SEM) van die gemiddelden ($n = 6$).

Figuur 2B (onder).

Metalengehalten in faeces (in mg per kg droge stof) van schapen, weergegeven als maandgemiddelden $\pm$ de standaardfout (SEM) van die gemiddelden ($n = 3-10$). In april en mei 1984 werden geen faecesmonsters genomen.

ties voor de gezondheidstoestand van schapen zijn hiervan overigens niet te verwachten: in deze hoeveelheden is cadmium niet acuut toxisch. Pas na blootstelling gedurende vele jaren zouden (vanwege de accumulatie van cadmium in de nieren) enige toxische effecten verwacht mogen worden; de levensduur van schapen is echter vele malen korter dan de periode van chronische expositie die voor het bereiken van een intoxicatie nodig zou zijn. Bovendien is bekend dat cadmium, wat aan slibdeeltjes is gebonden, bijzonder slecht wordt geabsorbeerd, en uit het voorgaande is al gebleken dat de bijdrage van aanhangend slib tot het totale gehalte van de plant aanzienlijk kan zijn.

De gehalten van de overige metalen in het vegetatiemateriaal geven niet bij voorbaat aanleiding tot verontrusting.

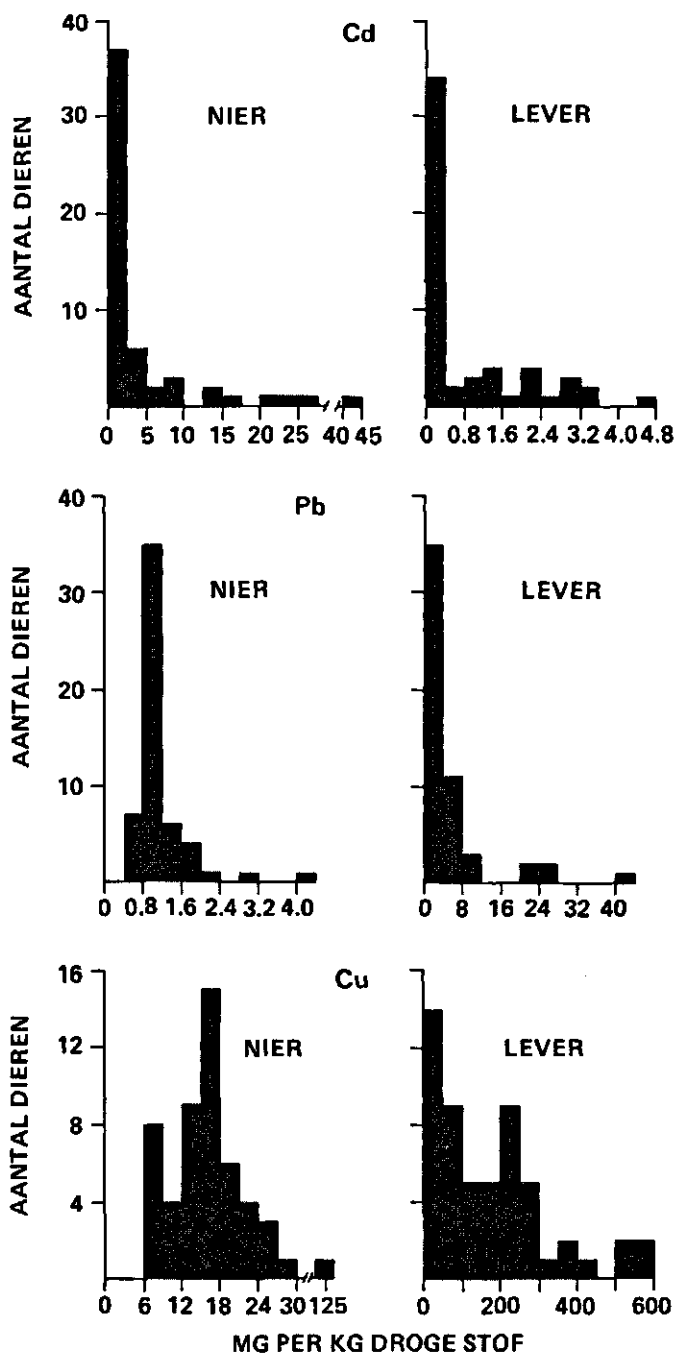
Faeces onderzoek

Als indicatie voor de actuele consumptie van metalen door schapen kan de uitscheiding van deze elementen met de faeces beschouwd worden. De absorptie via orale opname is namelijk in het algemeen matig: doorgaans $\leq 5\%$ voor cadmium, ca. 10% voor lood en $10-50\%$ voor koper. Gesteld kan dus worden dat ten aanzien van cadmium en lood de faecale uitscheiding een redelijk goed beeld geeft van de opname, terwijl voor koper tenminste een indruk wordt verkregen. Figuur 2B toont de hoeveelheid van de geanalyseerde metalen in de faeces gedurende de onderzoeksperiode (in april en mei 1984 werden geen faeces bemonsterd). Opvallend is dat de seizoensvariatie die bij de gehalten in de planten zo duidelijk zichtbaar was, hier niet wordt terugge-

vonden. Kennelijk zijn de schapen dus tamelijk selectief in hun consumptiegedrag. Niet alleen is uit ander onderzoek bekend dat herbivoren de neiging hebben zwaar verontreinigde gewassen te mijden, ook hebben veldwaarnemingen van de schapenhouder en van medewerkers van het Delta Instituut voor Hydrobiologisch Onderzoek geleerd dat bepaalde planten in bepaalde perioden van het jaar duidelijk voorkeur genieten, een voorkeur die zich soms zelfs uitstrekt tot specifieke plantendelen. Figuur 2A geeft dus wel een beeld van de aanwezige verontreiniging, maar dit impliceert geenszins ook een actuele opname door de dieren. Uit figuur 2B kan ook afgeleid worden dat de periode met hoge gehalten in faeces niet samenvalt met de periode van hoge gehalten in vegetatie, doch daar kort op volgt. Wellicht hebben de dieren in het voorjaar meer keuzemogelijkheden. Met betrekking tot de winterperiode moet de kanttekening worden gemaakt dat de weersomstandigheden globaal van december tot april beweiding van de schorren niet toelaten: de schapen zijn dan opgesteld en worden derhalve in die periode van de gebruikelijke standaardvoeders voorzien. De gehalten aan zware metalen waren daarin overigens normaal.

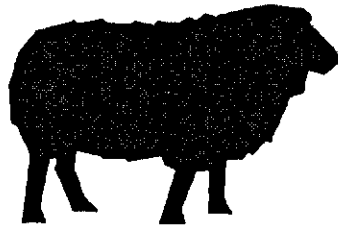
Onderzoek aan orgaan- en ribmateriaal

Gedurende het onderzoek kwam van 55 schapen orgaan- en ribmateriaal ter beschikking. De leeftijdsopbouw van deze dieren was geenszins uniform: de situatie op de schorren leidt incidenteel tot verdrinking van dieren die door het opkomende getij worden verrast, terwijl sterfte in de lammerperiode uiteraard vooral de jonge dieren treft. De gestorven schapen vertoonden overigens geen klinische of pathologische tekenen van enige intoxicatie. Figuur 3 geeft een beeld van de analyseresultaten met betrekking tot de metalengehalten in de vorm van frequentiediagrammen. Zoals bekend accumuleert cadmium voornamelijk in de nier, de figuur toont dan ook dat de niergehalten ongeveer 10 maal hoger zijn dan de levergehalten. Overigens bleek dat verreweg de meeste dieren, ook die in de hogere leeftijdsklassen, een lage cadmium-orgaanspiegel hebben. In tegenstelling tot cadmium accumuleert lood vooral in de lever, hetgeen in de figuur duidelijk zichtbaar is. Ook hier geldt dat de orgaangehalten zeker niet verontrustend hoog genoemd mogen worden. Lood en cadmium zijn beide niet-essentiële elementen, wat ook blijkt uit de eenzijdige symmetrie van de frequentiediagrammen; het accumulerend gedrag van deze elementen kan mede worden afgeleid uit de niveaus in de jonge dieren, die vrijwel zonder uitzondering zeer laag zijn. In tegenstelling daarmee laat de figuur zien dat koper wel een essentieel element is (hoewel toxisch in grote hoeveelheden): het frequentiediagram vertoont meer symmetrie dan die van lood en cadmium terwijl de spreiding, met name ook van de jonge dieren, veel groter is. Daarbij moet worden overwogen dat lammeren bij de ge-



Figuur 3.
 Frequentiediagrammen van cadmium-, lood- en kopergehalten in levers en nieren van schapen op Saeftinge.

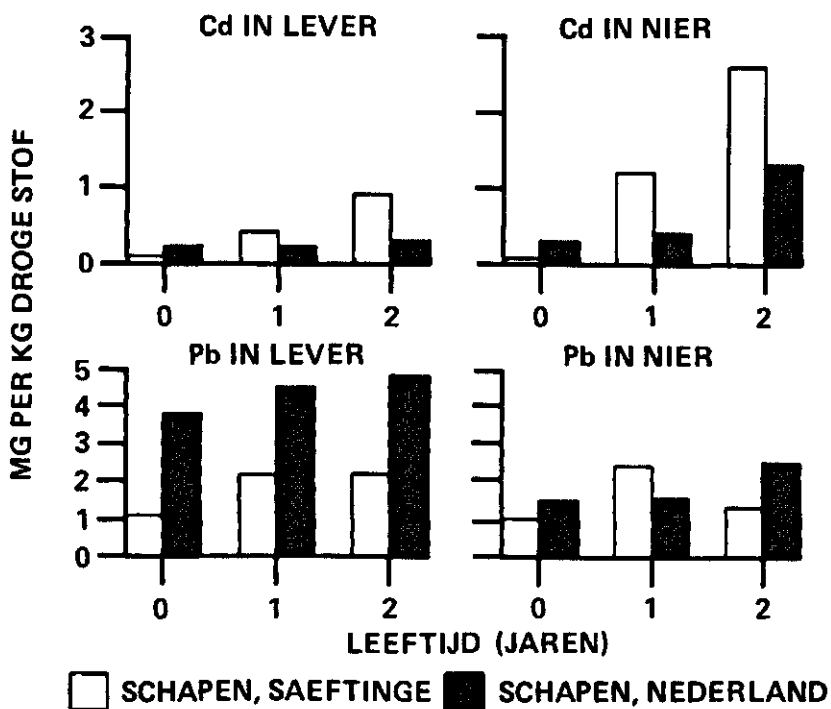
boorte veel koper van het moederdier meekrijgen omdat de melk verhoudingsgewijs weinig koper bevat, waardoor in de eerste levensperiode gemakkelijk een koperdeficiëntie zou kunnen ontstaan. Overigens geldt ook voor koper dat de waargenomen orgaanspiegels niet verontrustend hoog zijn; bovendien bevat de kudde geen dieren van het Texelse ras (die het meest gevoelig voor koper-intoxicatie zijn): dit ras is minder geschikt voor schorbeweiding vanwege het ruwe terrein.



Landelijke norm

Dank zij het landelijke VREK-programma (surveillance van zware metalen en organochloorverbindingen aan varkens, runderen, eieren, kippen en schapen) van het Ministerie van Landbouw en Visserij kunnen de lood- en cadmiumgehalten die in schape-organen van Saeftinge gevonden zijn, vergeleken worden met de landelijke situatie. Die vergelijking wordt getoond in figuur 4 en beperkt zich tot jonge dieren omdat geen of te weinig gegevens van oudere dieren beschikbaar zijn. Het blijkt dan dat voor dieren van 1 en 2 jaar op Saeftinge het cadmiumgehalte in lever en nier gemiddeld ca. twee maal hoger is dan landelijk. Lood in de levers van Saeftinge-schapen is daarentegen twee maal lager, terwijl het loodgehalte van de nieren wat wisselend is. Omdat de aantallen dieren zeer beperkt zijn, is slechts een heel voorzichtige interpretatie van deze gegevens mogelijk. Bovendien zijn voor schapenmateriaal geen landelijke actiegrenzen of richtnormen vastgesteld. Op basis van de beschikbare gegevens lijkt het orgaanmateriaal van dieren afkomstig van Saeftinge echter niet verontrustend af te wijken van de landelijke situatie.

Volledigheidshalve werd in juni 1984 een monster lokaal geproduceerde schapekaas geanalyseerd. De van belang zijnde elementen werden daarin echter niet in aantoonbare hoeveelheden aangetroffen: cadmium $< 0,05$, lood $< 0,5$ en koper $< 2,0$; alles in mg per kg kaas. Ook voor dit product heeft schorbeweiding van de schapen dus geen consequenties.



Figuur 4.

Vergelijking van de orgaangehalten van cadmium en lood in schapen van Saeftinghe met de resultaten van het VREK-monitorprogramma 1983/1984 (een doorsnede van Nederlandse schapen). Weergegeven zijn de mediane waarden van schapen van 0 jaar oud (Saeftinghe: $n = 33$, Nederland: $n = 11$), 1 jaar oud (Saeftinghe: $n = 2$, Nederland: $n = 11$) en 2 jaar oud (Saeftinghe: $n = 4$, Nederland: $n = 4$).

Conclusies

Op het Verdrongen Land van Saeftinghe worden in grond en vegetatie verhoogde gehalten van een aantal metalen aangetroffen, veroorzaakt door een uiterst complex geheel van factoren samenhangend met het unieke ecosysteem ter plaatse. Als voornaamste bron van de verontreinigingen moet de Westerschelde worden aangemerkt. De aangetroffen gehalten zijn niet zodanig dat daarvan voor enige element acute toxische effecten verwacht mogen worden voor de op de schorren van Saeftinghe geweidde schapen. Slechts voor enkele metalen kon enige vrees bestaan voor vererfingstoxicologische effecten op lange termijn. Het hier beschreven onderzoek heeft daarvoor evenwel geen enkele aanwijzing opgeleverd, zodat voor een hierop gerichte aanpassing van de bedrijfsvoering geen aanleiding bestaat. Ook de regelmatige inspecties door de regionale Gezondheidsdienst voor Dieren heeft in dat opzicht geen aanwijzingen voor onregelmatigheden of verdachte situaties opgeleverd. De verklaring voor een en ander moet waarschijnlijk gezocht worden in:

1. Een door het samenspel van voor schorren kenmerkende milieufactoren slechtere absorptie van de hier onderzochte contaminerende elementen dan doorgaans wordt aangenomen.
2. Een "zelfbeschermend" vermogen van de schapen via een selectief consumptiegedrag.
3. Het opstallen van de schapen gedurende de winterperiode.
4. Een goede en aan de lokale omstandigheden aangepaste bedrijfsvoering.

Thans mag dan ook gesproken worden van een zeer gezonde schaapskudde, wat bewijst dat ook onder deze moeilijke omstandigheden een verantwoorde en economisch haalbare bedrijfsuitoefening, in combinatie met een planmatig milieubeheer, mogelijk is. Naast de wol en de schapekaas, die al eerder geproduceerd werden, heeft het vlees nu het predikaat "mouton des prés-salés" gekregen en wordt als zodanig geleverd aan diverse specialiteitenrestaurants.

Dr. A. J. Baars¹⁾, mede namens H. van Beek¹⁾, dr. W. G. Beeftink²⁾, drs. J. Boom³⁾, G. J. de Graaf¹⁾, J. Nieuwenhuize²⁾, dr. H. J. Over⁴⁾, drs. J. J. Pekelder⁵⁾ en ir. Th. J. Spierenburg¹⁾.

¹⁾ Centraal Diergeneeskundig Instituut, Lelystad, afd. Analytische Chemie & Toxicologie.

²⁾ Delta Instituut voor Hydrobiologisch Onderzoek, Yerseke.

³⁾ Schapenhouderij Saeftinge, Nieuw Namen.

⁴⁾ Centraal Diergeneeskundig Instituut, Lelystad, afd. Parasitologie.

⁵⁾ Gezondheidsdienst voor Dieren in West- en Midden-Nederland, Gouda.

Mucosale immuniteit

Het effect van vaccinatie wordt meestal geëvalueerd aan de hand van de antilichaamrespons die gemeten wordt in het bloed. Toch is er lang niet altijd een correlatie tussen de respons in het bloed en de eventueel waargenomen bescherming. De antilichaamrespons in het bloed is een afspiegeling van een zogenaamde systemische immuunrespons. Het is al langere tijd bekend dat, naast het systemische immuunsysteem, er ook een mucosaal immuunsysteem bestaat dat tot op zekere hoogte onafhankelijk funktioneert van het systemische immuunsysteem. Onder het mucosale immuunsysteem vallen alle lymfoïde weefsels welke een bijdrage leveren aan de immuunrespons aan de slijmvliezen, de mucosae. Ook is het zo dat een respons, geïnduceerd via de mucosa bijv. in de darm, niet alleen tot expressie komt in de darm maar ook op andere plaatsen van het mucosale immuunsysteem zoals long, speeksel nier (zie schema). Deze migratie van antilichaam-producerende cellen tussen de verschillende mucosale weefsels maakt dat het mucosale immuunsysteem onafhankelijk van het systemische immuunsysteem kan funktionseren.

De mucosa is in vele gevallen de "porte d'entrée" van infectieuze agentia. Het tot stand komen van een goede mucosale immuunrespons middels vaccinatie is dan ook belangrijk omdat middels een mucosale immuunrespons een eerste lijn van defensie tegen een infectie wordt opgeworpen.



Binnen het CDI wordt een aantal projecten bewerkt, waarin de mucosale immuniteit bestudeerd wordt. Ze hebben als doel het verwerven van meer kennis en inzicht in de inductie en regulatie van de mucosale immuunrespons. De verworven kennis en inzichten kunnen vervolgens worden gebruikt voor de ontwikkeling van vaccinatiemethoden welke primair gericht zijn op het induceren van een adequate bescherming middels een goede mucosale immuunrespons.

Het onderzoek wordt onder meer verricht aan runderen en binnen de per 1 januari 1986 te starten projecten 'Mucosale immuniteit varken' en 'Mucosale immuniteit kip'. Om praktische redenen wordt er ook van een muize-proefdier-modelsysteem gebruik gemaakt. De muis is immunologisch veel beter beschreven en er zijn veel meer technieken en reagentia beschikbaar om het onderzoek te verrichten dan voor de eerder genoemde landbouwhuisdieren.

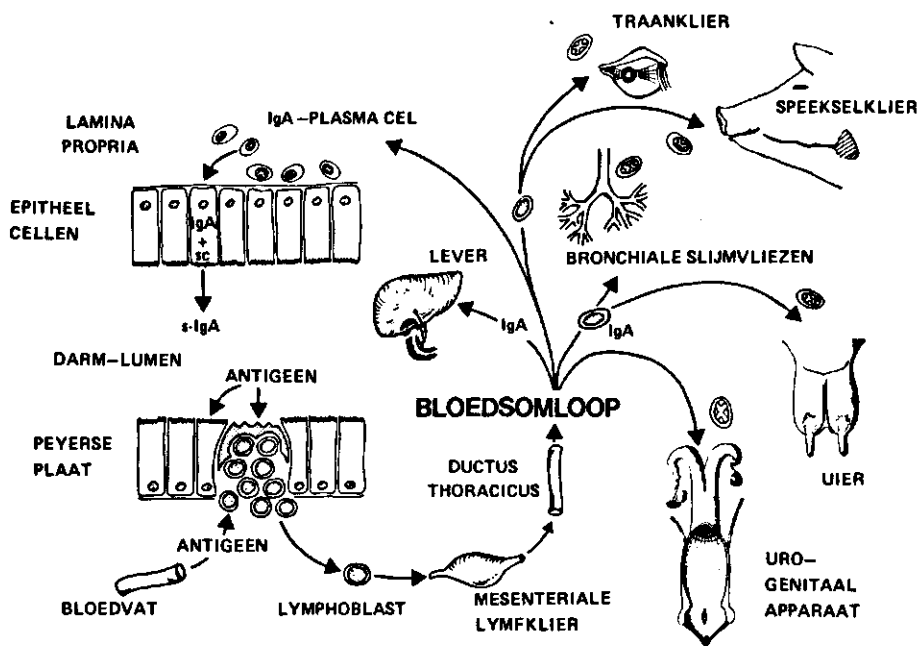
Binnen het muize-model wordt dan ook gewerkt aan het opzetten van methodieken en modelsystemen, waarmee allerlei aspecten van de mucosale immuniteit kunnen worden onderzocht. De belangrijkste konklusies kunnen dan op gerichte wijze worden getoetst binnen de verwante projekten, waarbij het doeldier varken, kip en rund centraal staat. Binnen deze laatstgenoemde projekten komen ook problemen aan de orde die direkt betrekking hebben op de inductie van mucosale immunresponsen tegen bepaalde pathogenen.

Onderzoek naar de funktie en regulatie van het mucosale immuunsysteem in een muize-proefdiermodel

Het onderzoek naar het mucosale immuunsysteem van de muis is gestart met de ontwikkeling en introductie van technieken om de immunrespons aan de mucosa te meten. In eerste instantie is gekozen voor de bestudering van de immunrespons aan de darm.

Voor het meten van de respons in het darmlumen zijn antiyeen- en isotype-specifieke Enzyme Linked Immunosorbent Assay's (ELISA's) opgezet, waarmee antilichamen kunnen worden aangetoond in darmspoelsels. Voor het verkrijgen van deze darmspoelsels is een techniek ontwikkeld waarmee het mogelijk is om individuele muizen in de tijd te vervolgen. Bij deze muizen wordt er van tijd tot tijd een lichte diarree geïnduceerd waardoor voldoende

SCHEMA MUCOSALE IMMUNITEIT



faeces kan worden opgevangen. Na opwerking van deze monsters kan dan een ELISA worden uitgevoerd ter bepaling van de antilichaamrespons in de darm van de muizen.

Naast het meten van de antilichaamrespons in de darm wordt ook de lokalisatie van de antilichaamvormende cellen bestudeerd. Hierbij worden, naast de lamina propria van de darm, de peyzerse platen en de mesenteriale lymfklieren ook andere lymfoïde organen, milt en beenmerg, onderzocht op het voorkomen van antigeen-specifieke antilichaam bevattende cellen (ACC's). Dit gebeurt met behulp van immunohistochemische technieken, waarbij de cellen door middel van een enzymreactie *in situ* zichtbaar gemaakt kunnen worden. Door het patroon van ACC's in de verschillende weefsels te vervolgen tijdens de ontwikkeling van de immuunrespons wordt een goed beeld van de migratie van deze cellen verkregen. Hierdoor kan een idee worden gevormd van de wijze waarop de mucosale immuunrespons tot stand komt.

Kwantitatieve techniek

Tot slot is er een techniek ontwikkeld waarmee *kwantitatief* zowel het aantal antigeen-specifieke als het totale aantal antilichaam-secreterende cellen in de darm bepaald kan worden. Voor deze bepaling werd een methode ontwikkeld waarmee antilichaam-secreterende B-cellen uit de darmwand konden worden geïsoleerd zonder de functionele activiteit van deze cellen te beïnvloeden. Na een jaar onderzoek zijn we in staat om het aantal antilichaam producerende cellen in deze geïsoleerde celpopulatie te bepalen met behulp van een plaque forming cell (PFC) test.

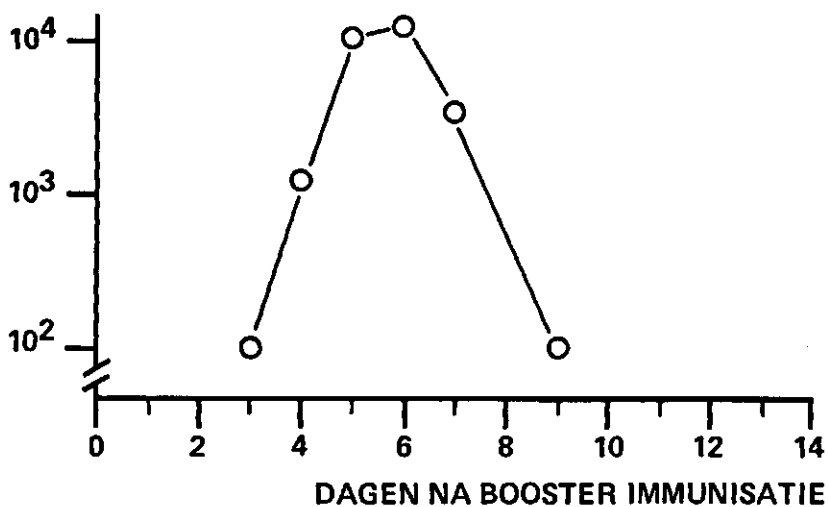
De eerste experimenten hebben aangetoond dat het mogelijk is een antilichaamrespons in de darm van muizen te induceren (figuur 5). De muizen werden hiertoe eerst intraperitoneaal geïnjecteerd met antigeen (Ovalbumine) in een water-in-olie emulsie en vervolgens werd vier weken later oraal opnieuw antigeen toegediend (booster).

De ELISA-resultaten sluiten goed aan bij resultaten verkregen met de PFC test waarmee het aantal antigeen-specifieke cellen in de darmwand werd bepaald (figuur 6). De histologische beelden geven op hun beurt een indruk van de verdeling van de antigeen-specifieke ACC's in de tijd en bevestigen de ELISA- en PFC-resultaten.

Deze eerste resultaten laten zien dat het met dit muize-model mogelijk is een mucosale immuunrespons te induceren tegen een bepaald antigeen en deze respons op gedetailleerde wijze te vervolgen. Het modelsysteem is dus geschikt om verschillende aspecten van de mucosale immuniteit te onderzoeken. Hierbij wordt gedacht aan het bestuderen van variabelen die de inductie van een mucosale immuunrespons kunnen beïnvloeden, zoals het soort antigeen waarmee wordt geïmmuniseerd, de route waarop het antigeen wordt

OVALBUMINE SPEC.

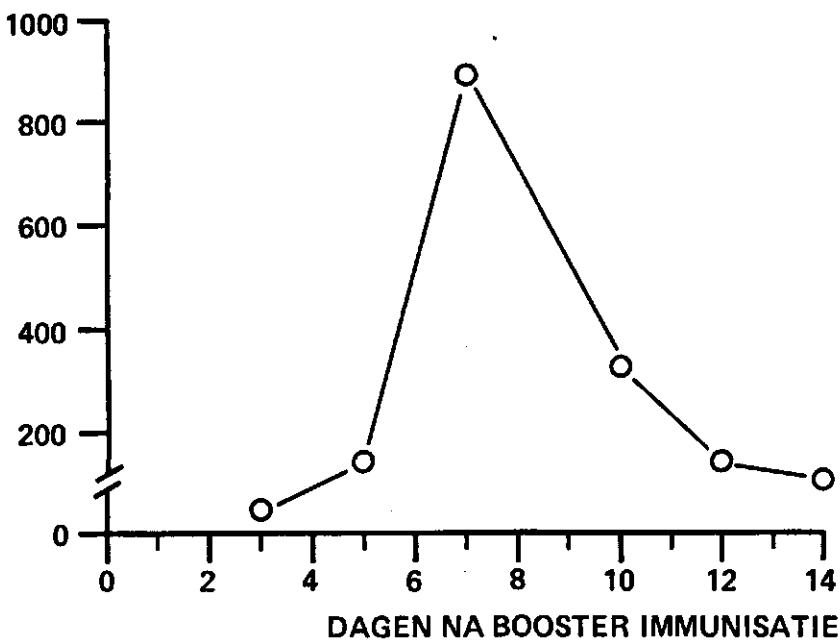
PFC/ DUNNE DARM



Figuur 5.

De kinetiek van de ovalbumine specifieke antilichaam secreterende cellen langs de darm.

Eenheden/ μ g IgA



Figuur 6.

De kinetiek van de ovalbumine specifieke IgA-antilichamen in het lumen van de darm.

aangeboden, de frequentie en dosis waarmee dat gebeurt en wat voor soort adjuvantia toegevoegd kunnen worden.

Onderzoek naar de functie en de regulatie van het mucosale immuunsysteem in landbouwhuisdieren

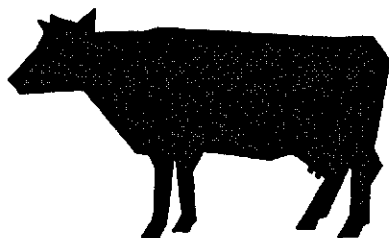
Voor het onderzoek naar het mucosale immuunsysteem van landbouwhuisdieren werden in de afgelopen jaren monoklonale antistoffen bereid tegen immunoglobuline (Ig) klassen en subklassen van runderen, varkens en kippen. Met behulp van deze reagentia werden klasse-specifieke ELISA's ontwikkeld voor het aantonen en kwantificeren van runder-antistoffen tegen rotavirus en Bovine Respiratory Syncytial Virus (BRSV). Vervolgens werd de immuunrespons bij infectie met deze virussen nader onderzocht.

Rotavirus

Bij kalveren die gevoed werden met biest vrij van antistoffen tegen rotavirus, bleek een orale besmetting of vaccinatie met respectievelijk virulent en geattenuerd rotavirus binnen enkele dagen de uitscheiding van IgM-antistoffen in de darm te induceren. Deze eerste respons werd snel gevolgd door de uitscheiding van IgA-antistoffen. Een challenge met virulent rotavirus 6 dagen na vaccinatie resulteerde niet in het optreden van klinische symptomen, terwijl er niet of nauwelijks virusuitscheiding plaats vond.

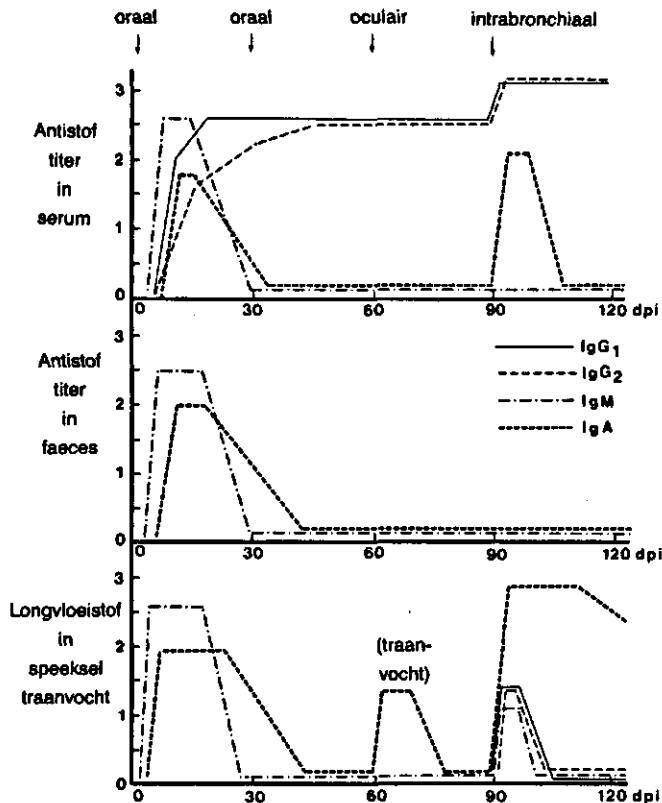
Dit gunstige effect van vaccinatie werd echter niet waargenomen indien de kalveren biest kregen verstrekt waarin rotavirus-antistoffen aanwezig waren, een situatie die model staat voor de omstandigheden in het veld.

Een mucosale immuunrespons in de darm bleek na orale vaccinatie niet meetbaar en na challenge vertraagd en verzwakt te zijn. Deze gegevens onderbouwen en bevestigen eerdere waarnemingen in het veld die er op duiden dat orale vaccinatie van jonge kalveren met levend rotavirus niet effectief is als gevolg van interferentie door maternale antistoffen.



Tijdens deze proeven werd vastgesteld dat na orale besmetting met rotavirus tevens IgM- en IgA-antistoffen in secreta van veraf gelegen slijmvliezen, zoals

longvloeistof, speeksel en traanvocht, uitgescheiden werden gedurende een aantal weken. Een daaropvolgende toediening van rotavirus via de luchtwegen leidde tot de uitscheiding van voornamelijk IgM-antistoffen gedurende tenminste een maand in longvloeistof, speeksel en traanvocht, maar niet in faeces. (Figuur 7). Een verklaring voor deze waarnemingen is waarschijnlijk de redistributie van de bij de darm geprikkelde IgM- en IgA-producerende cellen over diverse slijmvliezen en de vorming van memory lymfocyten. Mede gezien de interferentie van maternale antistoffen met orale vaccinatie, is het van belang te weten of primaire toediening van rotavirus via de luchtwegen het mucosale immuunsysteem activeert en tevens leidt tot de uitscheiding van antistoffen in de darm. Theoretisch zou dan via deze weg bescherming tegen een orale rotavirusbesmetting verkregen kunnen worden, of in meer algemene termen een "distant site" vaccinatie kunnen worden uitgewerkt.



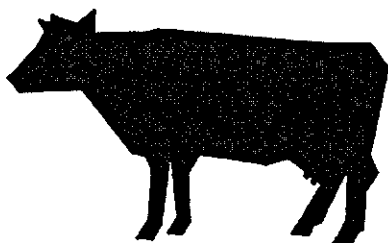
Figuur 7.

Antistofuitscheiding aan lokale "verafgelegen" slijmvliezen na orale infectie en daaropvolgende orale, oculaire en intrabronchiale toediening van rotavirus aan kalveren.

Schematische samenvatting van verschillende experimenten. De antistoftiter is weergegeven als $10_{\log}$ van de eindpuntverduunning.

Na primaire intrabronchiale toediening van rotavirus aan seronegatieve kalveren bleken IgM- en IgA-antistoffen uitgescheiden te worden in secreten rondom de luchtwegen gedurende tenminste 2 maanden. In de darm werden voornamelijk IgM-antistoffen waargenomen. Een daaropvolgende orale besmetting met rotavirus ging gepaard met een IgA-titerstijging in longvloeistof, speeksel en traanvocht. Hoewel in de faeces geen antistofactiviteit aantoonbaar was (zie figuur 7) bleek deze challenge geen diarree te veroorzaken. Deze resultaten werden met een beperkt aantal dieren onder experimentele omstandigheden verkregen en behoeven derhalve bevestiging. Het blijft verder de vraag of na intrabronchiale toediening toch niet een deel van het virus in de darm terecht komt en aldaar een lokale immuunrespons induceert. Vast staat evenwel dat deze toedieningswijze leidt tot een sterke mucosale immuunrespons.

Uiteraard zal de invloed van maternale antistoffen bij een intrabronchiale toedieningswijze ook onderzocht dienen te worden.



BRSV

Vergelijkbaar onderzoek als boven beschreven werd gestart met seronegatieve kalveren die intratracheaal besmet werden met BRSV. Ook hier werd een uitscheiding in longvloeistof, neussecret en traanvocht van IgM-antistoffen gevolgd door IgA-antistoffen waargenomen. De IgA-respons persisteerde tot tenminste 3 maanden na besmetting en vertoonde een bifasisch verloop met een dal ca. 3 weken na infectie. In de faeces werden voornamelijk IgM-antistoffen aangetoond. Herbesmetting 3 maanden later bleek gepaard te gaan met een snelle en sterke IgA-titerstijging in longvloeistof, neussecret en traanvocht.

Ook in dit geval werd geen antistofactiviteit in de faeces waargenomen.

Bij deze herbesmetting trad geen virusuitscheiding op. Verder onderzoek naar de invloed van maternale antistoffen op de mucosale immuunrespons na infectie met BRSV is in voorbereiding.

Met deze gegevens is thans een meer gedetailleerd beeld verkregen van de mucosale immuunrespons van kalveren bij darm- en luchtweginfecties. Teza-

men wijzen de gegevens op redistributie over diverse slijmvliezen van IgM- en IgA-producerende cellen die lokaal geprikkeld zijn, hetgeen duidt op het bestaan van een "common mucosal immune system", ook bij het rund. Verder zijn aanwijzingen verkregen voor het bestaan van mucosale memory lymfocyten. Bij het verdere onderzoek zal ter onderbouwing hiervan onder meer onderzoek naar antistof-producerende cellen in de slijmvliezen dienen te worden uitgevoerd.

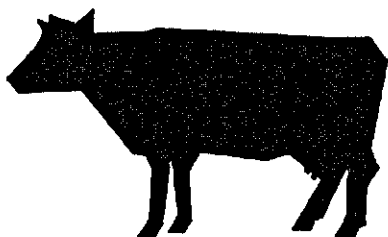
Medewerkers muize-proefdiermodel: Drs. P. J. van der Heijden, Dr. A. T. J. Bianchi, J. W. Scholten, W. Stok, R. J. Zwart, Drs. B. A. Bokhout.

Medewerkers Rotavirusprojekt: Dr. D. van Zaane, J. IJzerman, Dr. P. W. de Leeuw.

Medewerkers BRSV-projekt: Drs. F. Westenbrink, Drs. T. G. Kimman, Drs. P. J. Straver, J. M. A. Brinkhof, Dr. P. W. de Leeuw.

Mycoplasma-infekties

Het onderzoek naar mycoplasma-infekties is in 1982, direct na de ingebruikname van het nieuwe hoofdgebouw ter hand genomen. Vanwege ruimtegebrek en organisatorische moeilijkheden moest het project tot die tijd wachten. Een bijdrage over het project Mycoplasma-infekties op dit moment kan dan ook niet meer zijn dan een tussenbalans. Het onderzoek richt zich voornamelijk op de gastheersoorten rund, schaap, geit en varken.



Het onderzoek en de kennis van mycoplasma's breiden zich echter in het buitenland gestaag uit en daarmee heeft dit onderzoek in Nederland een achterstand opgelopen die slechts langzaam is in te halen. Een reden hiervan is dat mycoplasma's organismen zijn die in het algemeen niet routinematig gekweekt kunnen worden. Mycoplasma's zijn de kleinste vrij levende organismen ter wereld. Evolutionair gezien is het voorkomen van mycoplasma's opzienbarend, daar ze als een groep van heterogene organismen doorgaans toch gastheerspecifiek zijn dat wil zeggen dat elke gastheer zijn eigen soorten kent. Slijmvliezen blijken bij veel diersoorten een ecologische niche te vormen welke bezet werden door mycoplasma's die in de evolutie een parallele, maar gescheiden ontwikkeling hebben doorgemaakt.

Aantal soorten

Bij de genoemde diersoorten zijn momenteel ruim 30 soorten mycoplasma's bekend. Ook momenteel worden bij deze diersoorten nog nieuwe soorten beschreven. Het begint er enigszins op te lijken dat deze gastheerspecificiteit zich niet beperkt tot de huisdieren en de mens maar ook opgaat voor andere diersoorten, zodat het aantal van ca. 90 soorten dat momenteel voornamelijk bij de mens en huisdieren beschreven is, in de nabije toekomst met tientallen en misschien wel honderden soorten zal worden uitgebreid.

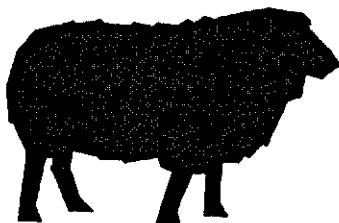
Maar terug naar de eerder genoemde landbouwhuisdieren: het aantal van ruim 30 zorgt voor een complexe situatie. Het belang van mycoplasma's ligt hierin dat een aantal soorten al sinds lange tijd als pathogeen bekend is, en

dat het van de overige soorten steeds duidelijker wordt dat zij een pathogene rol kunnen spelen.

Mycoplasma-onderzoek is tijdrovend en moeizaam vanwege onder andere de volgende factoren:

- voedingsmedia dienen aan hoge, vaak nog onduidelijke kwaliteitseisen te voldoen;
- vanwege de heterogeniteit van de organismen dienen diverse soorten voedingsmedia en kweekomstandigheden toegepast te worden wat met name geldt voor primaire isolaties;
- de typering van de soorten geschiedt onder andere op basis van serologische tests. De benodigde antisera zijn niet commercieel verkrijgbaar, maar dienen zelf bereid te worden.

Het kan daarom niet anders dan dat de aanloopfase van het onderzoek lang is. Deze fase wordt nog gecompliceerd doordat eigenlijk aan alle 4 genoemde diersoorten gelijk gewerkt moet worden. Na het bekend worden van de eerste resultaten was het enthousiasme van CDI-collega's gewekt en moest als het even kon alles tegelijk onderzocht worden. Een duidelijke keuze en een pas op de plaats was nodig. Besloten is om voorlopig uitsluitend projektmatig onderzoek uit te voeren, dat wil zeggen in het kader van omschreven CDI-onderzoek en dat geen routinebepalingen voor de praktijk zullen plaatsvinden.



Schade

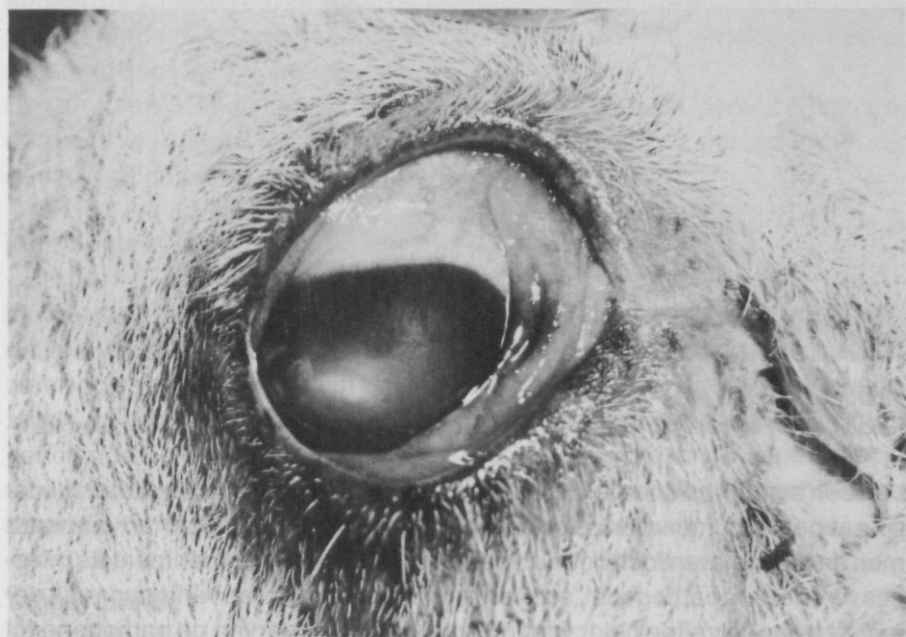
Het doel van het projekt is meerledig.

In eerste instantie een inventarisatie met betrekking tot het voorkomen van de diverse soorten mycoplasma's en de mate van talrijkheid. In een volgende fase wordt het voorkomen van mycoplasma's in relatie tot het voorkomen van andere micro-organismen en mogelijk ziekteverwekkende factoren geëvalueerd. Daarnaast kan verder onderzoek plaatsvinden: welke rol spelen mycoplasma's in de pathogenese en tenslotte komt de belangrijkste vraag aan de orde: op welke manier is schade, door mycoplasma's veroorzaakt, te beperken respectievelijk te voorkomen.

Een andere vraagstelling is of een bepaald ziektesyndroom (mede) door mycoplasma's wordt veroorzaakt. Een voorbeeld hiervan is het onderzoek naar zere oogjes bij kleine herkauwers (figuur 8).

Van weer andere soorten mycoplasma's is bekend dat zij de enige oorzaak zijn van omschreven ziekten zoals bijv. enzoötische pneumonie van het varken, contagieuze agalactie van kleine herkauwers en de al in de vorige eeuw in Nederland uitgeroeide longziekte (CBPP) van het rund. Voor de twee laatstgenoemde ziekten werd ten behoeve van im- en export een serologische test ontwikkeld.

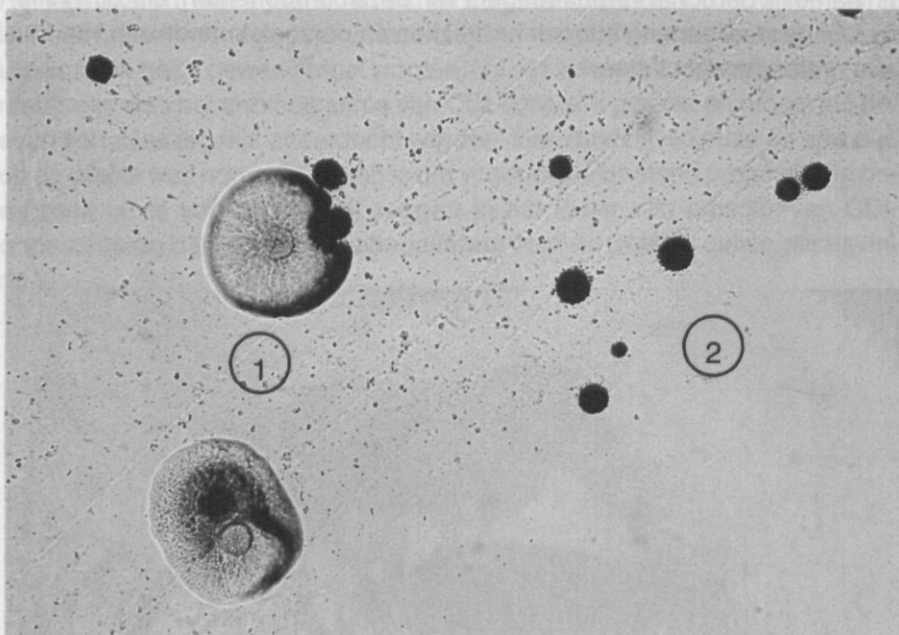
Een nuttige bijkomstigheid van het mycoplasma-project is dat ten behoeve van de virologische afdelingen van het CDI celculturen en virusbatches op de aanwezigheid van mycoplasma's gescreend kunnen worden. Mycoplasma's zijn namelijk beruchte verontreinigers van deze componenten, die zich volledig aan de waarneming kunnen onttrekken en oorzaak kunnen zijn van foutieve onderzoekresultaten.



Figuur 8.
Oog van een schaap met kerato-conjunctivitis veroorzaakt door *Mycoplasma conjunctivae*.

Luchtwegaandoeningen

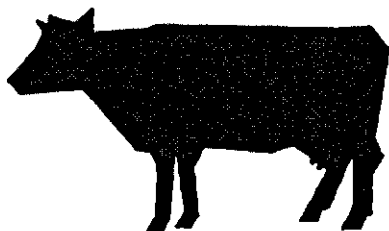
Wat betreft de participatie in het CDI-project 'Luchtwegaandoeningen bij jongvee' waarover in het vorige jaarverslag bericht werd, is de stand van zaken nu zo, dat alle te verwachten soorten gekweekt en voor het grootste deel ook getypeerd kunnen worden. De monsters welke in de afgelopen jaren verzameld zijn en bij -70°C opgeslagen, worden momenteel onderzocht. Uit dit materiaal dat merendeels afkomstig is van zieke of gestorven kalveren zijn tot nu toe 7 soorten mycoplasma's geïsoleerd. De soorten die het meest worden aangetoond zijn *M.bovirhinis* (fig. 9.1), *M.dispar* en *Ureaplasma* (fig. 9.2). In veel mindere mate worden *M.bovis*, *M.bovigenitalium*, *M.arginini* en een tot heden niet typeerbare soort aangetoond.



Figuur 9.
Kolonies van *Mycoplasma bovirhinis* (1) en *Ureaplasma* (2) uit de long van een kalf.

Van een aantal van deze soorten is de pathogeniteit (in het buitenland) duidelijk aangetoond, maar van de als commensaal beschouwde soorten vermoedt men de laatste jaren toch ook een pathogene betekenis. Experimentele infecties met deze "apathogene" soorten in (kiemvrije) kalveren verliepen vaak negatief, maar hetzelfde geldt voor diverse virussen waarvan de pathogene rol door serologisch onderzoek wel duidelijker is vastgesteld. Door middel van recente studies met orgaankweken zijn echter van enkele als apathogeen beschouwde soorten mycoplasma's pathogene effecten aangetoond. Op dit ter-

rein dient nog veel onderzoek plaats te vinden. Een handicap in het onderzoek is dat ondanks de vaak grote aantallen waarmee mycoplasma's de respiratietractus bevolken, antistoffen ertegen vaak niet of onregelmatig aantoonbaar zijn.



Dit kan (ook) opgevat worden als een mechanisme waarover mycoplasma's kunnen beschikken om zich aan de afweerreacties van de gastheer te onttrekken, terwijl de mycoplasma's toch hun pathogene werking uitoefenen, een intrigerend aspect van de pathogenese.

Een andere bijkomstigheid is dat een volledige isolatie- en identificatieprocedure van een monster op mycoplasma's gemiddeld een maand in beslag neemt, wat de bewerkelijkheid van dit projekt aantoont.

Zere oogjes

Met betrekking tot zere oogjes bij schapen en geiten is intussen het nodige onderzoek verricht. Een van de resultaten is dat in Nederland als oorzaak van zere oogjes bij zowel schapen als geiten *M.conjunctivae* is vastgesteld, welke zeer waarschijnlijk identiek is aan de nog in recente Nederlandse literatuur genoemde *Colesiota conjunctivae*, een Rickettsia-achtig organisme dat echter nog nooit gekweekt is. In een experimentele infectie is de pathogeniteit van deze soort mycoplasma door ons aangetoond.

Triggerfunctie

Tenslotte is onlangs gestart met het onderzoek naar varkensmycoplasma's. Bij deze diersoort komen twee van de meest moeilijk kweekbare soorten mycoplasma's van dieren voor. Dit zijn *Mycoplasma hyopneumoniae*, de verwek-

ker van enzoötische pneumonie, en de nog moeilijker kweekbare, maar minder pathogene soort *M. flocculare* welke zeer verwant is aan *M. hyopneumoniae*, hetgeen dus in de differentiaaldiagnose van belang is. Er zijn daarnaast aanwijzingen dat mycoplasma's bij een aantal andere belangrijke ziekten van het varken een triggerfunctie kunnen vervullen. Daarom zal dit onderdeel een van de belangrijkste onderzoeksvelden binnen het projekt worden.

Dit project wordt uitgevoerd door drs. E. A. ter Laak, J. H. Noordergraaf en W. van den Ouden. Er wordt geparticipeerd in diverse andere projecten van het CDI.

Elektronenmicroscopie

Toepassing van colloidaal goudlabelling bij diagnostiek van virusinfecties met speciale aandacht voor herpesvirussen bij paarden.

Elektronenmicroscopie speelt al vele jaren een belangrijke rol in het virologisch onderzoek waarbij men onder meer gebruik maakt van de volgende technieken:

- negatief kleuring;
- ultramicrotomie;
- immuno-elektronenmicroscopie.

Negatiefkleuring

Onder negatief kleuren wordt verstaan het contrasteren van biologische preparaten opdat in de elektronenmicroscopie uiteindelijk een zichtbaar beeld ontstaat. Dit kunnen virussen en bacteriën zijn die eerst op een dragervlies worden gehecht, meestal een plastic film die redelijk stabiel is onder invloed van het elektronenbombardement. Het vlies met daarop het preparaat heeft geen contrast. Eenmaal behandeld met een oplossing van een zwaar metaal (uranium of wolfram) ontstaat het negatieve contrast, dat wil zeggen het deeltje wordt aan het oppervlak gecontrasteerd door een laagje contrastmiddel dat aan het virusoppervlak blijft hangen. Door de verstrooiing van elektronen aan zware metalen (waaronder ook colloidaal goud, zie hieronder) wordt op het fotopositief een meer of mindere zwarting gecreëerd: colloidaal goud diep zwart door de compacte opbouw van de goudatomen, wolframzuur in grijstinten afhankelijk van de hoeveelheid contrastmiddel die is achtergebleven op het vlies.

De negatief kleurtechniek wordt veel gebruikt voor structuurherkenning, zuiveringsstudies van bijv. virussen en sneldiagnostiek.

Ultramicrotomie

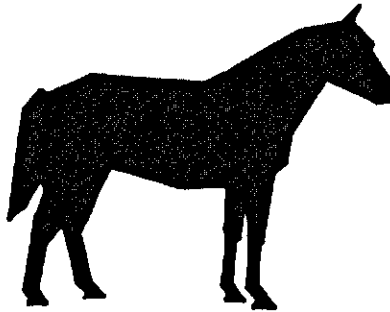
Ultradunne coupes van cellen worden na inbedden in een geschikte kunsthars gesneden met speciale apparatuur (ultramicrotoom) en speciale messen (glas- of diamantmessen). De elektronen worden niet volledig geabsorbeerd, maar passeren de coupe na verstrooiing. De verstrooiing die ook hier weer het contrast tot stand brengt, vindt plaats aan lood- en uranium-atomen waarmee de coupe is gecontrasteerd. In tegenstelling tot de negatief kleurtechniek is de kleuring hier positief doordat de zware metalen zich actief binden aan eiwitstructuren (lood) en aan nucleïnezuren (uranium).

Immuno-elektronenmicroscopie

Deze techniek biedt de mogelijkheid om naast louter een beoordeling op morfologie, inzicht te verschaffen in antigeensamenstelling van een biologische structuur. Op deze wijze is bijv. serotypering van virusdeeltjes mogelijk en de bestudering van antigeenlokalisaties in de cel.

Voorheen werd voor dit doel gebruik gemaakt van:

- Immuuncomplexvorming; na incubatie van viruspreparaten met antilichamen gericht tegen het virus, of van onbekende sera met referentie virus-suspensies, ontstaan grote virus-antilichaamcomplexen. Op deze wijze is identificatie van het virus en serotypering mogelijk. Een nadeel is enerzijds dat de ultrastructurele details van het virus ten dele worden gemaskeerd en anderzijds de kritische concentratie van het antigeen.
- Antilichamen gekoppeld met ferritine en peroxidase; cellen waarvan het plasmamembraan vooraf permeabel is gemaakt, worden achtereenvolgens gelabeld, gefixeerd en ingebed in een kunsthars. Coupes worden vervolgens onderzocht op de betreffende labelling. De ultrastructurele details van de cellen zijn echter in hoge mate verslechterd door de voorbehandeling met de immuunreagentia.



De laatste jaren heeft het colloïdale goud de functie van de ferritine techniek overgenomen met de volgende voordelen:

- Colloïdaal goud is op eenvoudige wijze te koppelen aan antigenen en antilichamen. De goudgemerkte antilichamen kunnen worden ingezet in de directe labellingstechniek of de indirecte labellingstechniek (zie figuur 1).
- Voorts kan het label worden aangemaakt als monodisperse sol met uniforme diameter variërend van 5–50 nanometer (meestal worden solen gebruikt met een diameter van 5 of 20 nanometer). Dit opent mogelijkheden om dubbellabellingsexperimenten uit te voeren (bijv. gelijktijdig labellen van 2 verschillende antigenen) door gebruik te maken van solen van verschillende diameter.
- Ieder (virus)deeltje dat op het dragervlies is gelegen kan afzonderlijk wor-

Colloidal Gold Labelling

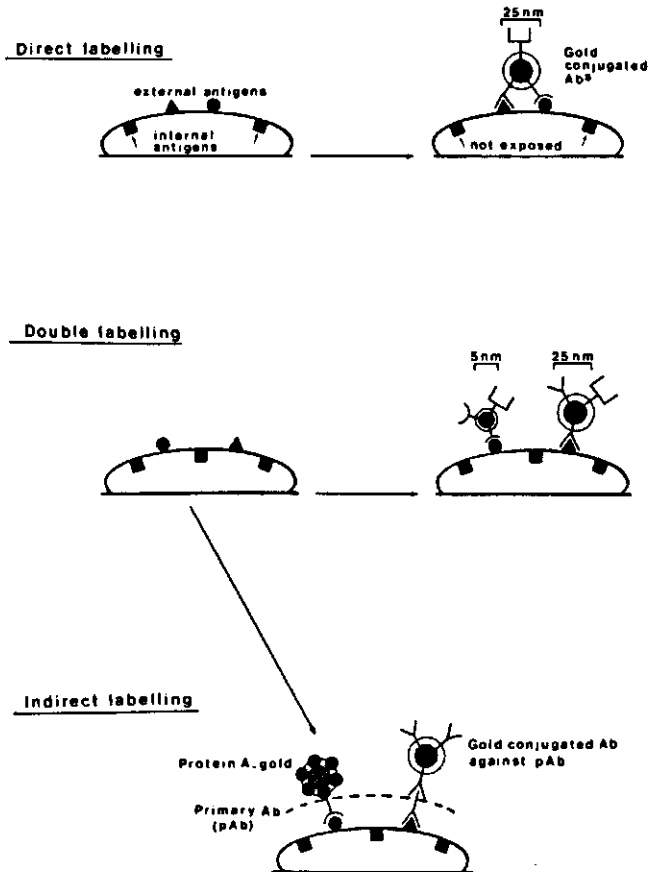


Fig. 10

den gelabeld volgens de directe of indirecte techniek, zodat de detectie van immuuncomplexen kan worden omzeild. De ultrastructurele details van het deeltje worden nagenoeg niet gemaskeerd. Gebruik van de directe goudlabellingstechniek beïnvloedt de morfologie zelfs in het geheel niet.

- Colloidaal goud kan afhankelijk van de gevoeligheid van het antigeen voor de gebruikte fixatie en inbedding worden toegepast bij achteraflabeling van coupes en op deze wijze een perfecte lokalisatie geven van het antigeen in de cel.

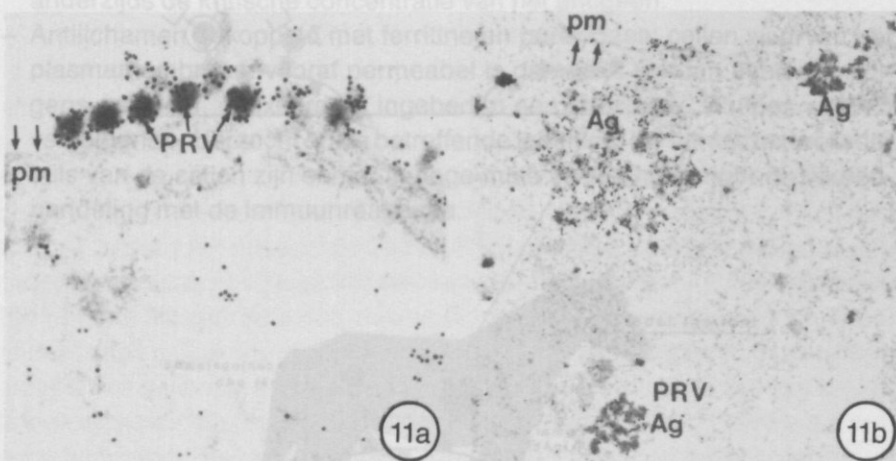
Toepassingen van goudlabelling binnen CDI-projecten:

Ziekte van Aujeszky

Het gebruik van colloidaal-goudlabelling op plastic coupes van neusslijmvlies

afkomstig van varkens, besmet met Aujeszky's Disease Virus (ADV) biedt de mogelijkheid om het infectieproces op ultrastructureel niveau te bestuderen. Zowel de polyclonale als monoclonale antilichamen werden gebruikt bij het lokaliseren van virale en cellulaire antigenen (figuur 11).

Binnen het deelproject 'Micropathogenese van de ziekte van Aujeszky zijn lesies bestudeerd, veroorzaakt door zowel een avirulente als een virulente (wilde type) ADV-stam. Voorts is de betrokkenheid van ontstekingscellen onderzocht bij de uitbreiding van de infectie alsmede de celtypen die bijdragen tot productieve vermeerdering van het virus. Recente resultaten duiden op een productieve vermeerdering van het wilde type virus in weefselmacrofagen hetgeen mogelijk aanleiding geeft tot een verstoring van de lokale afweer.

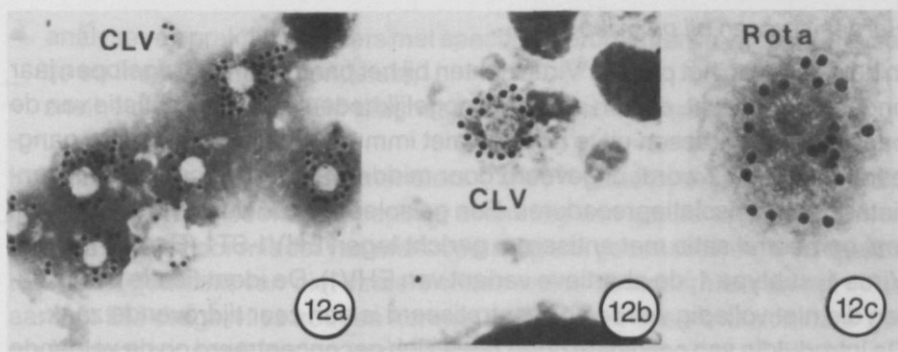


Figuur 11a:
Extracellulair gelegen virusdeeltjes gelabeld via de indirecte labellingstechniek (pm: plasma membraan).

Figuur 11b:
Intracellulair gelegen virus antigenen (Ag).

Varkensdiarree-onderzoek

Een tweede geavanceerde techniek voor de detectie van virussen met specifieke antilichamen is de SPIEM (Solid Phase Immune Electron Microscopy). Deze antigeen "capture assay" is zeer specifiek en benadert in zijn gevoeligheid de ELISA. De vaste drager bestaat uit een vlies voorzien van een proteïne A monolayer waaraan de immuunglobulines worden gebonden, gericht tegen het te detecteren agens. Met deze vaste drager wordt vervolgens het agens opgevangen uit bijv. een druppel weefselvocht. Subtypering van het agens is mogelijk door de combinatie van SPIEM en colloidaal-goudlabelling (figuur 12a, 12b en 12c).



Figuur 12a:
"Corona-like" virus (CLV) gezuiverd uit varkensfaeces en opgevangen via de SPIEM-techniek. Vervolgens gelabeld met antistoffen gericht tegen CLV gekoppeld aan goud.

Figuur 12b:
Verdacht partikel afkomstig uit praktijkmateriaal en opgevangen met de SPIEM-techniek. Identificatie met goud-gelabelde antistoffen gericht tegen CLV.

Figuur 12c:
Rota virus of "rota-like" virus afkomstig uit praktijkmateriaal. M.b.v. goud-gelabelde antistoffen gericht tegen rota virus getypeerd als normaal rota virus.

De SPIEM is ondermeer gebruikt in het onderzoek naar diarree bij varkens, waarbij de correlatie tussen de detectie van rotavirus en coronavirus, alsmede menginfecties via ELISA en SPIEM werd onderzocht.

De betrouwbaarheid van de ELISA voor rotavirus op basis van een polyclonaal konijneserum kon op deze wijze worden vastgesteld. Echter de SPIEM en de ELISA voor de coronavirussen (TGEV, 'Transmissible Gastroenteritis Virus' en CLV 'Corona-like Virus') gaven bijzondere problemen, te weten:

- Coronavirussen, opgenomen door toepassing van SPIEM, waren niet altijd als zodanig morfologisch herkenbaar, in de meeste gevallen door de vage structuur van de karakteristieke ring van peplomeren. Dit probleem werd ondervangen door het met de SPIEM opgevangen virus te labelen met anti-coronavirus-goudconjugaat (anti-CLV) waarna geen twijfel meer kon bestaan over de aanwezigheid van het virus in het preparaat.
- Sommige praktijkmonsters gaven fout-positieve uitslagen met de ELISA test op basis van polyclonaal anti-coronavirus konijneserum en kippe-serum.

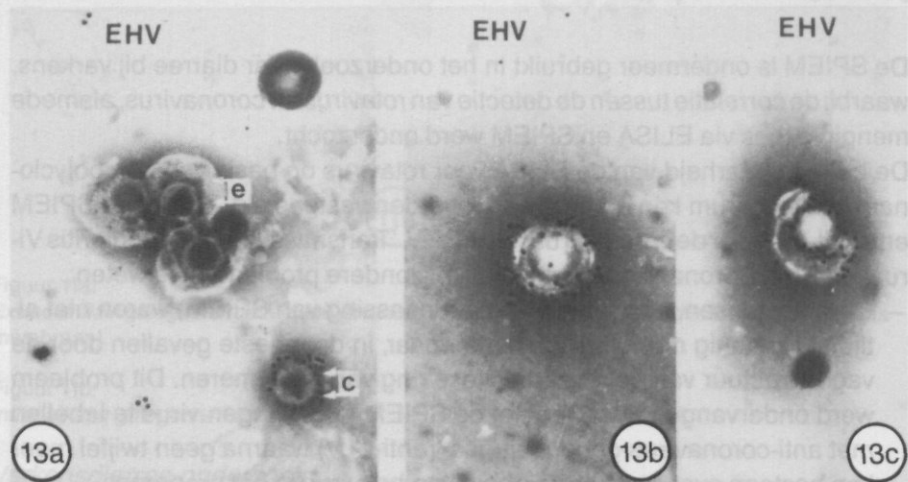
De resultaten van dit onderzoek gaven aanleiding tot het introduceren van monoclonale antilichamen in de nog te ontwikkelen ELISA tests.

De verwachting is dat bij het karakteriseren van monoclonale antilichamen (alsmede bij het selecteren ervan) gericht tegen moeilijk of in het geheel niet kweekbare virussen (rota-like virus en TGEV-wilde type) colloidaal goudlabelling van groot belang kan zijn.

Herpesvirussen bij paarden

In het kader van het project 'Virusziekten bij het paard' is in het afgelopen jaar onderzoek verricht, dat ten doel had mogelijkheden voor differentiatie van de paardeherpesvirussen uit te bouwen met immuno EM-technieken. De gangbare diagnostiek wordt uitgevoerd door middel van een immunofluorescentietest en virusisolatieprocedures. Een geïsoleerd virus wordt vervolgens getest op neutralisatie met antiserum gericht tegen EHV1-ST1 (Equine Herpes Virus 1, subtype 1, de abortieve variant van EHV1). De identificatie van isolaten die niet volledig worden geneutraliseerd is een zeer tijdrovende zaak. De introductie van colloidaal goud heeft zich geconcentreerd op de volgende aspecten:

- verificatie van virusneutralisatie en fluorescentieuitslagen (typering van EHV1-ST1);
- uitwerken van een snelle diagnostiek voor EHV2 (cytomegalo virus) en EHV1-ST2 (de respiratoire variant van EHV1);



Figuur 13a:

Labellingsbeeld verkregen na incubatie met anti EHV1 subtype 1 goud-gelabelde antistoffen van EHV, subtype 2-virus (respiratoire variant): enveloppe (e) negatief, core (c) positief (kruisreactie op core niveau met subtype 1).

Figuur 13b:

Positief gelabelde enveloppe verkregen met antistoffen gekoppeld aan goud gericht tegen EHV-1 subtype 1.

Figuur 13c:

Als figuur 13b. Dit deeltje vertoont een opengebroken enveloppe waardoor ook de core toegankelijk is voor labelling.

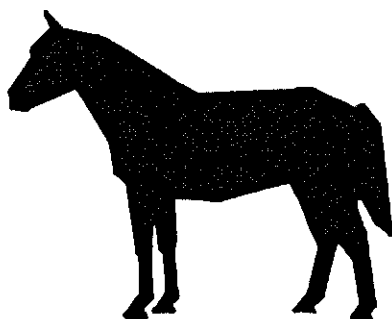
- analyse van praktijkmonsters met specifieke problemen in virusneutralisatie en immunofluorescentietest;
- snelheid waarmee de EM-diagnose kan worden afgegeven.

In totaal werden 58 praktijkmonsters "blind" geanalyseerd waarvan 25 neusswabs en 33 weefselsuspensies afkomstig van geaborteerde foeten. Het virus werd door middel van microcentrifugatie geconcentreerd en daarbij tevens vrijgemaakt van niet-virale eiwitten welke de adsorptie van het virus aan het EM-dragervlies zouden kunnen verstoren. Virus werd zichtbaar gemaakt door negatiefkleuring en getypeerd met colloidaal goud. Hiervoor werden directe goud conjugaten bereid, gericht tegen EHV1 (zowel subtype 1 als subtype 2), EHV2 en Aujeszky's Disease Virus.

Door analyse van de goudlabelling op zowel core- als enveloppeniveau, kan op een snelle wijze (binnen 2 uur nadat het virus zich in weefselweek manifesteert door een cytopathogeen effect (CPE), een indicatie worden verkregen van type, subtype en het voorkomen van menginfecties (figuren 13a, 13b en 13c).

In twee gevallen werd EHV2 gediagnostiseerd met afwijkende corelabelling, te weten een kruisreactie met anti-Aujeszky goudconjugaat. Beide isolaten waren afkomstig van paarden met een acute pneumonie.

Vierentwintig weefselsuspensies zijn rechtstreeks onderzocht op aanwezigheid van virus. In 17 monsters kon na negatiefkleuring binnen 30 minuten na ontvangst van het materiaal de diagnose herpes worden afgegeven. Vijf van deze monsters konden vervolgens zonder aankweek worden getypeerd omdat zowel gelabelde viruscores als gelabelde enveloppes werden gedetecteerd in de orgaansuspensies. Wellicht kunnen door een combinatie van SPIEM en goudlabelling in de toekomst nog meer uitslagen door analyse van het oorspronkelijke materiaal worden verkregen.



Tabel 4. Resultaten van colloidaal-goudlabelling.

	Aantal	routine IFT ^a	VN ^b	CPE ^c	EM neg.- kleuring	EM goudlabelling		
						EHV-ST1	EHV1-ST2	EHV2
Neusswabs	4		-	+	Adeno			
	3		+	-		+		
	5		-	+			+	
	11		-	+				+ ^d
	2		-	+		+		+
Veulens	3	+	+	-		+		
Foeten	24	+	+	-		+		
	1	±	-	+			+	
	1	+	±	+		+		+
	1	+	±	+		+		+
CZS-paarden	2	-/+	-	+			+	
	1	nd	±	+		+		+

a: Immunofluorescentietest op aanwezigheid van EHV1 ST1.

b: Virusneutralisatietest met konijn anti-EHV1-ST1 serum.

c: Cytopathogeen effect: desintegratie van de monolayer door afronden en loslaten van de cellen. Hier aangeven het CPE na neutralisatie van EHV1-ST1.

d: In twee gevallen werd EHV2 gediagnostiseerd met afwijkende corelabelling, te weten een kruisreactie met anti-Aujeszky goudconjugaat. Beide isolaten waren afkomstig van veulens met acute pneumonie.

... Menginfecties, alle zijn geverifieerd met behulp van neutralisatie van één van de twee virussen of EHV1-ST1 serum of EHV2 serum, voor EHV1-ST2 is nog geen specifiek neutraliserend serum beschikbaar.

De niet-geneutraliseerde viruspopulatie werd geïdentificeerd met EM.

CZS: Centrale zenuwstelsel.

De conclusies ten aanzien van herpesvirusinfecties bij paarden kunnen als volgt worden samengevat:

1. De resultaten van tabel 4 laten zien dat de beschikbare virologische technieken voor de detectie van herpesvirussen bij het paard slechts beperkte mogelijkheden bieden. Via IFT kunnen weefselcoupes worden onderzocht waarbij echter geen onderscheid valt te maken tussen EHV1 subtype 1 en subtype 2. Via virusneutralisatie is alleen EHV1 subtype 1 te identificeren.

Daarentegen is de colloidaal-goudlabelling een betrouwbare techniek, geschikt voor snelle diagnostiek welke bovendien de uitslagen van de IFT en de virusneutralisatie kan bevestigen en eventueel aanvullen. Het is zeer waardevol gebleken voor het typeren van paardeherpesvirussen waarvoor nog geen routine virologische techniek beschikbaar is.

2. Colloidaal goudlabelling heeft tot het inzicht geleid dat dubbelinfecties, die tot nu toe niet beschreven zijn, bij het paard kunnen voorkomen. Over een

mogelijke relatie met bepaalde ziekteverschijnselen is tot op heden niets bekend. Voor het verkrijgen van meer inzicht in deze problematiek zullen proefinfecties noodzakelijk zijn.

Algemene conclusies:

Immuno EM-technieken gebaseerd op colloidaal-goudconjugaten blijken zeer waardevolle tools te zijn met ruime toepassingsmogelijkheden binnen het virologisch onderzoek:

1. EM-diagnostiek, gericht op de detectie en typering van virussen.
2. Virologische diagnostiek, gericht op specificiteitscontrole en verbetering van gangbare technieken voor antigeen- en antilichaamdetectie.
3. Virale micropathogenese, gericht op de detectie en lokalisatie, met behoud van ultrastructurele details, van virale antigenen in weefselcoupes.

Dr. J. Vreeswijk, mede namens J. Cornelissen, E. A. de Boer-Luytze, dr. A. P. K. M. I. van Nieuwstadt, dr. J. T. van Oirschot, drs. J. M. A. Pol, F. Wagenaar.

Publicaties

Diarrhoea in piglets around weaning	53
Respiratory diseases in calves	55
Carbadox	56
Toxicological research	58
Botulism	59
Differentiation of streptococci	60
Mastitis in cattle	61
Mastitis immunity	62
Summer mastitis	63
Brucellosis	64
Manipulation of the humoral and cellular immune response	65
Pathogenesis of parasitic infections in cattle	67
Systematic epidemiological investigations of helminths	68
Efficacy of anthelmintics	69
Resistance to anthelmintics	73
Foot-and-mouth disease	74
Swine fever	76
Virus infections in cattle	79
Virus infections in sheep (other than Maedi/Visna)	82
Aujeszky's disease	83
Avian leukosis	86
Marek's disease	87
Infectious bronchitis	90
Maedi/Visna	91
Research on disinfectants	92
Diagnosis of diseases of pigs	93
Diagnosis of diseases of small ruminants	94
Diagnosis of diseases of fur animals	95
Other investigations	96
Synthetic peptide vaccines	102
Other publications	104

DIARRHOEA IN PIGLETS AROUND WEANING (PROJECT 2)

Soyabean products stimulating net excess of secretion in the LGT model

M. J. A. NABUURS¹⁾, A. HOOGENDOORN¹⁾

Proceedings of the 3rd International Seminar on Digestive Physiology in the Pig, Copenhagen 16th-18th May 1985.

Beretning fra Statens Husdyrbrugsforsøg, Editors A. Just, H. Jørgensen and J. A. Fernandez, 1985, 580, 131-134.

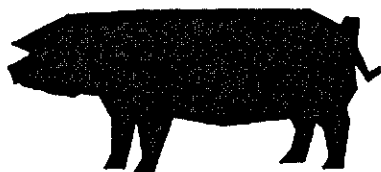
The ligated gut test (LGT) in pigs is the standard method to examine *E. coli* strains for enterotoxin production. Because solid pig food has been associated with diarrhoea, we decided to examine soyabean products (the main protein source in food for piglets), in the same manner as *E. coli* strains.

After injection of different soya products into ligated segments of the small intestine fluid accumulation was observed, indicating a net excess of secretion. The factor in soya products responsible for this effect was found to be highly thermo-stable, as it resisted heating at 120 °C during an hour. No indications for a possible allergic phenomenon accounting for the fluid accumulation were found.

From the results of this study it can be concluded that soyabean products can give similar results in the LGT as enterotoxigenic *E. coli* strains.

Full text in English.

¹⁾ CDI - Department of Herd health and Pathology.



Clinical and microbiological field studies on digestive tract disorders of piglets around the time of weaning

M. J. A. NABUURS¹⁾, F. G. VAN ZIJDERVELD²⁾, A. ROELOFS¹⁾, J. HAAGSMA²⁾,
P. W. DE LEEUW³⁾

Proceedings of the 3rd International Seminar on Digestive Physiology in the Pig, Copenhagen 16th-18th May 1985.

Beretning fra Statens Husdyrbrugsforsøg, Editors A. Just, H. Jørgensen and J. A. Fernandez, 1985, 580, 304-310.

A clinical and microbiological study was performed in three swine herds involving six litters from one week before to three weeks post-weaning. The agents looked for were rotavirus, *E. coli* and *Clostridium perfringens*.

Before weaning rotavirus excretion in the faeces was found in four litters, after weaning in all six litters. Many piglets had two episodes of virus shedding. Enterotoxigenic as well as non-enterotoxigenic *E. coli* strains were isolated in pure culture from all piglets but only after weaning. The different types appeared sequentially: the first strain was always a pathogenic one.

Clostridium perfringens type A was isolated from part of the piglets examined. The number of isolations before weaning was considerably higher than after weaning.

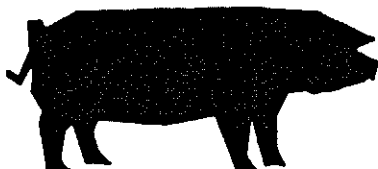
Although an over-all pattern relating the agents to diarrhoea could be shown, it proved difficult to find clear-cut relations in all individual piglets.

Full text in English.

¹⁾ CDI - Department of Herd health and Pathology.

²⁾ CDI - Department of Bacteriology.

³⁾ CDI - Department of Virology.



RESPIRATORY DISEASES IN CALVES

(PROJECT 5)

Diagnosis of bovine respiratory syncytial virus infections Improved by virus detection in lung lavage samples

T. G. KIMMAN¹⁾, G. M. ZIMMER¹⁾, P. J. STRAVER²⁾, and P. W. DE LEEUW²⁾

American Journal of Veterinary Research, in press.

The potential of lung lavage to diagnose and study infections with bovine respiratory syncytial virus (BRSV) was investigated.

The technique was simple to perform under field conditions, and even in calves with respiratory tract disease, serious drawbacks were not noted. In 9 epizootics of respiratory tract disease, BRSV infection was diagnosed in one or more calves. BRSV was detected from a total of 21 of 32 calves by immunofluorescence in cells recovered from lavage fluids and the virus was recovered by cell culture from 17 of these. In the 4 remaining calves, infectious bovine rhinotracheitis virus or parainfluenza type 3 virus was isolated. In calves with high levels of maternally derived antibodies, direct demonstration of the virus was found to be essential for BRSV diagnosis. In 3 of the 9 epizootics, the majority of 4- to 8-month-old calves had a significant increase in antibody concentration against BRSV, whereas only a few 1- to 2-month-old calves present during the other 6 epizootics did so. However, at least in 4 of the 6 herds with younger calves, direct detection of the virus in 2 or more calves indicated that BRSV was involved in the epizootic.

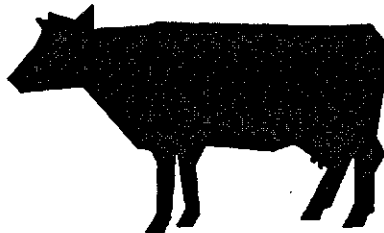
Cytologic examination of wash fluids from BRSV-infected animals demonstrated an increased neutrophil/large mononuclear cell ratio. Occasionally bronchiolar casts and syncytial giant cells with inclusion bodies were seen.

In lung lavage fluids of 4 experimentally infected specific-pathogen-free calves, BRSV containing cells were detected by immunofluorescence for 12 to 18 days after inoculation.

Full text in English.

¹⁾ CDI - Department of Herd health and Pathology.

²⁾ CDI - Department of Virology.



CARBADOX

(PROJECT 9)

Liquid chromatographic determination of carbadox and desoxycarbadox in medicated feeds and in porcine gastrointestinal tract

GERRIT J. DE GRAAF¹⁾ and THEODORUS J. SPIERENBURG¹⁾.

J. Assoc. Off. Anal. Chem. Vol. 68, No. 4, 1985, 658-660.

A liquid chromatographic method for the assay of carbadox and desoxycarbadox in medicated feeds and porcine stomach and intestinal contents is described. Samples were extracted with dimethylformamidewater and cleaned up on an alumina column. The eluate was chromatographed using either gradient elution for simultaneous assay of both compounds or isocratic elution for carbadox only. Detection of carbadox by its native fluorescence yielded a sensitive and specific assay without interferences by metabolites of matrix components. The optimal UV absorption of desoxycarbadox was at 280 nm. Mean recoveries of carbadox in spiked feed and stomach contents were 104 and 97%, respectively; mean recovery of desoxycarbadox in stomach contents was 106%. The day-to-day reproducibility for carbadox in different feed samples and stomach contents samples had a coefficient of variation of 6-13%.

Full text in English.

¹⁾ CDI - Department of Analytical Chemistry and Toxicology.



Pathological and clinical changes related to toxicity of carbadox in weaned pigs

E. J. VAN DER MOLEN¹⁾, M. J. A. NABUURS¹⁾ and L. P. JAGER²⁾

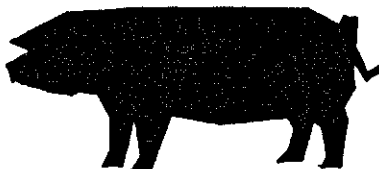
Zbl. Vet. Med. A, 32, 540-550 (1985).

The toxicity of carbadox was tested in weaned pigs over a period of 10 weeks. One group (N = 9) was given carbadox medicated feed at a level of 150 ppm, the other served as non-treated control. The pigs were clinically observed 3 times a week and Hb values, weight and feed intake were measured weekly. After 3 weeks the carbadox group showed the first signs of intoxication: dry faeces with decreased abdominal volume. After 5 weeks the animals also developed whitered hair and showed agitation. This picture persisted during the rest of the experiment. Already after a few days feed intake decreased to 60% of that of the control group and the decrease lasted until the end of the experiment. Weight gain was ca. 50% lower than in the control group. After 6 weeks of feeding carbadox a remarkable increase of Hb values was seen in the treated group compared to the control group (13.5 ± 0.5 versus 11.6 ± 1.2). After 6 and 10 weeks 3 and 4 pigs, respectively, of each group were killed for pathological examination. In both cases the carcasses were dehydrated and showed features of retarded growth. The coiled colon was involuted and the contents were very dry. After 6 weeks the adrenals showed hydropic changes of the zona glomerulosa. The changes in the kidneys consisted of necrosis of the collecting tubules and hydropic degeneration and desquamation of the pelvic epithelium. The lesions after 10 weeks were much more pronounced, especially in the adrenals. The glomerular zone had become atrophic and fibrotic and the capsule was thickened and contained many cells with PAS-positive granules. In the renal medulla degenerative and inflammatory lesions were present. The inflammation in the colon had a chronic character. In the control group, the characteristic lesions as observed in the carbadox treated group, were absent. The results are discussed with special emphasis on the significance of the adrenal lesions for the clinical picture.

Full text in English.

¹⁾ CDI - Department of Herd health and Pathology.

²⁾ CDI - Department of Control and Standardization.



TOXICOLOGICAL RESEARCH
(PROJECT 2)

Een geval van aldicarbvergiftiging bij rundvee
A case of aldicarb intoxication in cattle

Th. J. Spierenburg¹⁾, P. E. F. Zoun¹⁾, F. W. Doorenbos²⁾ and H. Wanningen²⁾

Tijdschrift voor Diergeneeskunde, 1985, 110 (14), 555-558.

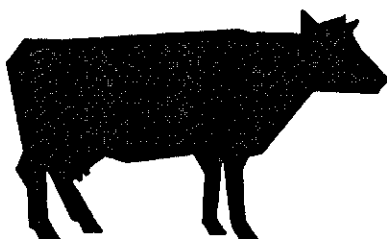
Six cows fell ill and two died following the spilling of an amount of the pesticide Temik on a pasture. Chemical analyses for aldicarb, the active principle of Temik, in the rumen of a dead animal, showed that a lethal dose of aldicarb was present. Examination for residues resulted in the decision to regard meat and organs as unfit human consumption.

From the point of view of prevention of general risks, the milk produced on the day on which the accident was recorded, as well as that produced during the following six days had to be destroyed.

Full text in Dutch.

¹⁾ CDI - Department of Analytical Chemistry and Toxicology.

²⁾ Regional Meat Inspection.



BOTULISM
(PROJECT 15)

Type C botulism in five dogs

J. M. M. Cornelissen¹⁾, J. Haagsma²⁾, J. J. van Nes¹⁾

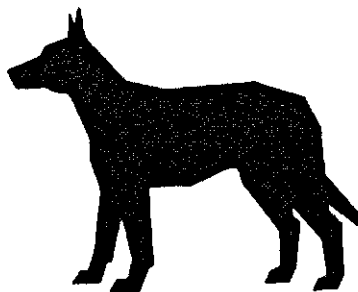
Journal of the American Animal Hospital Association, 1985, 21, 401-404.

Type C botulism was diagnosed and confirmed in four dogs and was clinically suggested in another. In this paper, the history, clinical signs, and results of laboratory examinations of these dogs are reported. In all confirmed cases, the source of botulism was found. With supportive care treatment, the dogs recovered completely. The dogs for this study represented 50% of those dogs presented to Utrecht University Small Animal Clinic (UUSAC) in 1982 with signs of acute lower motor neuron (LMN) disease. Botulism should, therefore, be included in the differential diagnosis of any dog with signs of acute LMN disease.

Full text in English.

¹⁾ State University Utrecht, Small Animal Clinic.

²⁾ CDI - Department of Bacteriology.



**DIFFERENTIATION OF STREPTOCOCCI
(PROJECT 17)**

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

U. Vecht¹⁾, L. A. M. G. van Leengoed²⁾ and E. R. M. Verheijen¹⁾

The Veterinary Quarterly 1985, 7, 315-321.

Data are presented on the incidence 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.

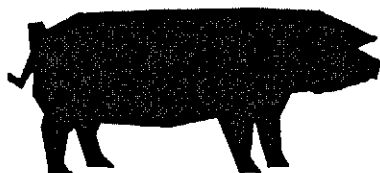
S. suis type 2 (Serogroup R) and *S. equisimilis* (Serogroup C) constituted 16.2% and 13.7% of the isolates respectively. Besides meningitis, endocarditis and polyserositis *S. suis* type 2 infections may frequently be associated with pneumonia (42%).

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*/*S. suis* types. 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.

Full text in English.

1) CDI - Department of Bacteriology.

2) CDI - Department of Herd health and Pathology.



MASTITIS IN CATTLE (PROJECT 24)

Effect of bull selection for somatic cell count in first lactation on cell counts and pathogens in later lactations

U. VECHT¹⁾, G. E. SHOOK²⁾, R. D. POLITIEK³⁾, G. GROOTENHUIS¹⁾, W. J. KOOPS³⁾
and D. G. GROOTHUIS^{1),4)}

Journal of Dairy Science, 1985, 68, 2995-3003.

Somatic cell counts were measured one time on Meuse-Rhine-IJssel cattle in The Netherlands. Experiment 1 involved 1,741 first lactation daughters of 31 bulls. Eleven bulls with daughters with either high or low average cell count were selected for further study of their daughters in third and fourth lactation. Cell counts and bacteriological tests were performed on 684 of the older daughters. A second experiment was conducted to measure daughters in second lactation and to obtain additional daughters in first lactation. This experiment recorded cell counts of 1,071 daughters of 10 of the bulls selected in Experiment 1. Heritability of the natural logarithm of cell count in first lactation was .081 based on daughters of 31 bulls in Experiment 1. Geometric daughter averages ranged from 206 to 700 $\times 10^3$ cells/ml. Transmitting ability of bulls was estimated by the regressed least squares method. Ranking of bulls on first lactation cell count was different between the two experiments. Management factors and stage of lactation effects could be responsible for these differences. Within Experiment 2, the ranking of bulls on cell counts was nearly identical between first and second lactation. Daughter groups with low average cell count in first lactation in Experiment 2 had low averages in third and fourth lactation although some changes in ranking did occur. These results are consistent with a low to moderate genetic correlation between lactations for cell count. In general, daughter groups with higher average cell count had higher percentage of quarters with mastitis pathogens.

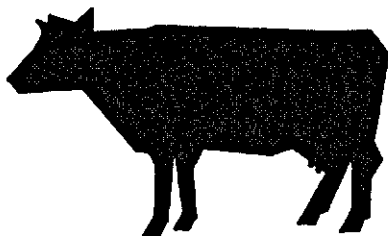
Full text in English.

1) CDI - Department of Bacteriology.

2) Agricultural University, Wageningen, The Netherlands, and University of Wisconsin-Madison.

3) Animal Breeding Department, Agricultural University, Wageningen, The Netherlands.

4) Present address: National Institute of Public Health, Bilthoven, The Netherlands.



MASTITIS IMMUNITY

(PROJECT 26)

Immunological approach to mastitis control

U. VECHT ¹⁾

Proceedings IDF seminar "Progress in mastitis control", Kiel, May 21-24th 1985.

Recent vaccination studies indicate that by using local immunization in the dry period or systemic vaccination during lactation in the region of the supramammary lymph node combined with Freund's incomplete adjuvans higher and longer lasting levels of immunoglobulins in serum and milk could be achieved. Clinical efficacy has not yet been proven. The combination of systemic and local immunization deserves to be further tested. Also the effect of vaccination on the mobilization of PMN to the mammary gland could prove to be of value in future mastitis control.

The correlation of phagocytic functions of blood- or milk derived leucocytes with resistance against mastitis still has to be confirmed. Sufficient control of in vitro test conditions is essential in proper phagocytosis studies. Standardization of assays is therefore of overriding importance. As vaccination is still not practicable, research to identify individual cows with superior or inferior natural defence mechanisms is indicated. A crucial step preceding the phagocytosis process seems to be the mobilization of PMN to the mammary gland.

The possible role for the intra mammary device (IMD) in mastitis control is dependent on the outcome of on-going research. There are indications that the IMD might only prove effective against special forms of mastitis. If so application should be limited to herds where the indication for such treatment exists.

Levamisole is used in human medicine in immunodeficient situations. As the diagnosis of mastitis as such cannot be held for immunodeficiency the indication for its use is weak. However there are indications that at drying-off and around calving some beneficial effect may be found.

Altogether control of bovine mastitis through immunological approach is not yet practicable. Problems are highlighted by the "immunological paradox": at parturition concentrations of immunoglobulins, various non-specific agents and many leucocytes are at the highest level while the incidence of (sub)clinical mastitis is maximal. Later in lactation just the opposite is the case. The value of immunological methods for mastitis control can only be proven in challenge experiments and field studies.

Full text in English.

¹⁾ CDI - Department of Bacteriology.

SUMMER MASTITIS
(PROJECT 27)

Host finding and feeding in *Hydrotaea irritans* (Diptera, Muscidae): The role of chemical senses

G. THOMAS^{1),2)}, C. H. SCHOMAKER²⁾, T. H. BEEN²⁾, M. J. VAN DEN BERG^{1),2)}, and H. J. PRIJS²⁾

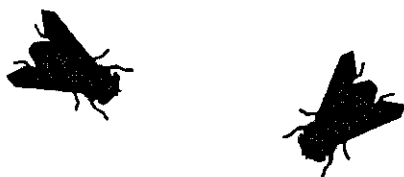
Veterinary Parasitology, 18 (1985) 209-221.

Hydrotaea irritans is commonly considered to be the primary vector for the bacteria which cause summer mastitis in cattle. A behavioural physiology approach was used to investigate potential host odours (kairomones) that may be used by the fly in finding its host and to determine which substrates or sites on the host may be utilised in feeding. Attractant odours include CO₂ and butyric, propionic and acetic acids: the latter three are also produced by the bacteria causing summer mastitis. When milk, slaver, nasal secretion, mastitis secretion and blood were offered to flies as feeding substrates only the last three produced significant increases in feeding duration in comparison to controls offered distilled water.

Full text in English.

¹⁾ CDI - Department of Parasitology.

²⁾ State University Groningen - Department of Animal Physiology.



BRUCELLOSIS
(PROJECT 30)

Allergic test in goats experimentally infected with *Brucella melitensis*

Z. BERCOVICH¹⁾

In: Brucella melitensis.

A Seminar in the CEC Program of Co-ordination of Research on Animal Pathology, held in Brussels at the Commission of the European Communities, 14-15 November 1984.

Edited by: J. M. Verger and M. Plommet;

Dordrecht: Martinus Nijhoff Publishers, 1985, 173-179.

A protein allergen prepared from a smooth strain of *Brucella abortus* S-99 was used to diagnose *B. melitensis* (16 M) infection in three experimentally infected goats.

The allergen was standardized to contain 1 mg nitrogen per ml and used in dose of 0.1 ml.

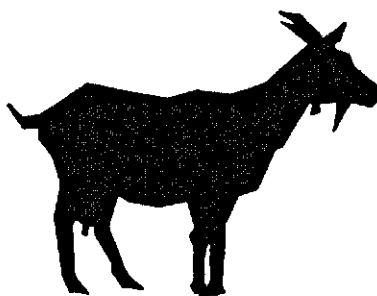
The animals were injected with the allergen intracutaneously in the lower eyelid and the reaction was read within 48 hours.

Infected animals showed a distinct local skin swelling within 14 days after infection, while a control remained negative.

The skintest can be of practical value in diagnosing brucellosis when serological tests fail.

Full text in English.

¹⁾ CDI - Department of Immunology.



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

**Secondary delayed type hypersensitivity to H-2 subregion-
coded alloantigens**

A. T. J. BIANCHI¹⁾, L. M. HUSSAARTS-ODIJK²⁾ and R. BENNER²⁾

Immunobiology, vol. 170, pp. 192-202 (1985)

Secondary type delayed type hypersensitivity (DTH) in mice against class I alloantigens or non-H-2 alloantigens is characterized by an earlier appearance of DTH reactivity after booster immunization compared with the development of DTH reactivity after primary immunization. In contrast to the primary and secondary DTH against class I or non-H-2 alloantigens, the development of secondary DTH against class II alloantigens or a set of alloantigens that includes class II alloantigens is *not* faster than the development of primary DTH. Thus, primary and secondary immunization with class II alloantigens prevents secondary type DTH reactivity to simultaneously administered class I alloantigens and non-H-2 alloantigens.

Full text in English.

¹⁾ CDI - Department of Immunology.

²⁾ Erasmus University Rotterdam, Department of Cell Biology, Immunology and Genetics.



Separate application of adjuvant and antigen: The effect of a water-in-oil emulsion on the splenic plaque- forming cell response to SRBC in mice

PH. J. VAN DER HEIJDEN¹⁾, B. A. BOKHOUT¹⁾, A. T. J. BIANCHI¹⁾,
J. W. SCHOLTEN¹⁾, W. STOK¹⁾.

Immunobiology, in press.

The effect of a non-immunogenic adjuvant on the murine splenic plaque-forming cell (PFC) response against sheep red blood cells (SRBC) was studied. The adjuvant, a stable water-in-oil (W/O) emulsion, was injected intraperitoneally at the same time as or prior to the intravenous (i.v.) injection of SRBC. Enhancement of the SRBC-specific IgM-, but not IgG- and IgA-responses was observed. The stimulatory effect depended on the dose of both adjuvant and antigen and on the interval between their application. The minimal dose of adjuvant needed to induce maximal stimulation increased with the interval between the injections. Administration of an optimal adjuvant dose one week before antigen application still resulted in a clear stimulation of the response to the antigen. In adjuvant treated animals the primary PFC response did not exceed the maximum level reached after i.v. injection of a high dose of SRBC. Adjuvant therapy did also result in polyclonal B-cell-activation, since the number of spontaneous Ig-secreting cells in the spleen was increased. The kinetics and isotype distribution of the SRBC-specific and polyclonal responses, however, were different.

Therefore the observed stimulatory effect on the SRBC-specific PFC-response cannot be explained by the polyclonal activation of the immune system. From this study it appears that injection of a W/O emulsion provokes an active stimulation of the immune system, which demonstrates that the adjuvant effect of W/O emulsions is not only passively obtained by prolonged antigen presentation by depot formation.

Full text in English

¹⁾ CDI - Department of Immunology.



**PATHOGENESIS OF PARASITIC INFECTIONS IN CATTLE
(PROJECT 35)**

The effect of experimental *Ostertagia ostertagi* infections in stabled milking cows on egg output, serum pepsinogen levels, antibody titres and milk production

A. KLOOSTERMAN¹⁾, F. H. M. BORGSTEEDE²⁾ and M. EYSKER³⁾

Veterinary Parasitology, 17 (1984/85) 299-308.

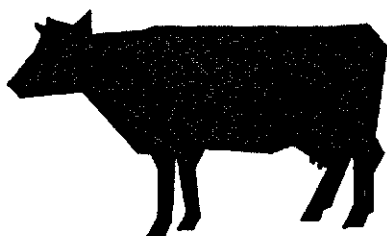
Two trials with stabled milking cows were carried out. In the first trial, cows were either experimentally infected with *Ostertagia ostertagi* larvae or served as naturally-infected controls. In the second trial, cows were treated the same as in the first trial, but in addition half of the number of cows of each group were treated with oxfendazole before the trial started. The results showed that experimental infection influenced *Ostertagia* egg output, host serum pepsinogen levels and anti-*Ostertagia* antibody titres. The influence on egg output consisted of an initial decrease 1 week after infection, followed by an increase 3-7 weeks after infection. The pepsinogen level was significantly elevated after one week. The antibody titres increased from 3 weeks p.i. onwards. No influence on the milk production could be demonstrated. Naturally-infected controls also showed a rise in pepsinogen level and antibody titres, probably due to the existing worm burden. The egg output appeared to be influenced by the partus. Naturally-infected cows, treated with oxfendazole, showed no changes in any of the parameters during the trial.

Full text in English.

¹⁾ Agricultural University, Wageningen. Department of Animal Husbandry.

²⁾ CDI - Department of Parasitology.

³⁾ University of Utrecht. Institute of Veterinary Helminthology and Entomology.



**SYSTEMATIC EPIDEMIOLOGICAL INVESTIGATIONS OF HELMINTHS
(PROJECT 36)**

**Enkele gevallen van cysticercosis bij schapen in Nederland
Cysticercosis in sheep in The Netherlands.
Report on a number of cases**

F. H. M. BORGSTEEDE¹⁾, J. DIJKSTRA²⁾, R. G. DIJKSTRA³⁾, J.SOL³⁾ en
P. VELLEMA³⁾

Tijdschrift voor Diergeneeskunde, 1985, 110, 898-900.

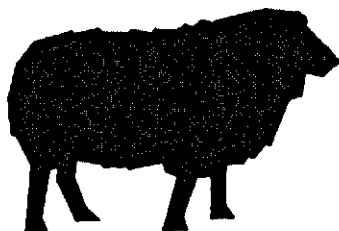
During the period from January to March 1985, approximately ninety cases of *Cysticercus ovis* infection in sheep were observed in a slaughter-house in The Netherlands. Investigations into the cause of this infection showed that dogs kept by the owners of the slaughter-house, had in alle likelihood been the source of contamination.

Full text in Dutch.

1) CDI - Department of Parasitology.

2) Regional Meat Inspection.

3) Regional Animal Health Service.



EFFICACY OF ANTHELMINTICS

(PROJECT 38)

Comparative efficacy of three different anthelmintics in calves

J. AKHTAR¹⁾, F. H. M. BORGSTEEDE¹⁾, NUSRAT I. CHAUDHRY²⁾, and C. S. HAYATT²⁾.

Pakistan Vet. J., Vol. 4, No. 2, 1984, p. 118-121.

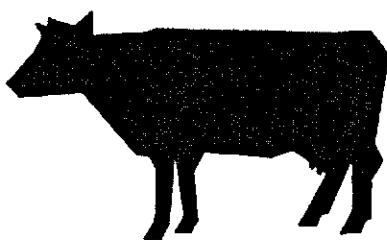
Twenty four calves of the Dutch Friesian breed were housed after their first grazing season and divided into 4 groups of 6 animals each. One group was treated with 10 mg/kg body weight levamisole in a "pour on" formulation, the second group was injected with 0.2 mg/kg bodyweight ivermectin, the third was drenched with 4.5 mg (kg oxfendazole, whilst the remaining group was retained as an untreated control. Efficacy was determined by means of a comparison of the nematode egg output on the day of treatment and one week later. Oxfendazole and ivermectin reduced the egg output of both *Ostertagia* spp. and *Cooperia* spp. for 100 percent.

Nematodirus spp. egg output was 100 percent reduced in oxfendazole treated calves, but not in ivermectin treated calves. Four out of 6 levamisole treated calves showed a 100 percent reduction in egg output of *Ostertagia* spp., *Cooperia* spp. and *Nematodirus* spp. whilst in two calves the treatment showed no effect. The reason for the inefficacy in these two calves remains unknown.

Full text in English.

¹⁾ CDI - Department of Parasitology.

²⁾ University of Agriculture, Faisalabad. Faculty of Veterinary Science.



Vergelijking van de effectiviteit van Ivermectine in injecteerbare vorm en als pasta bij paarden

A comparison of the efficacy of Ivermectin as an injection and as a paste in horses

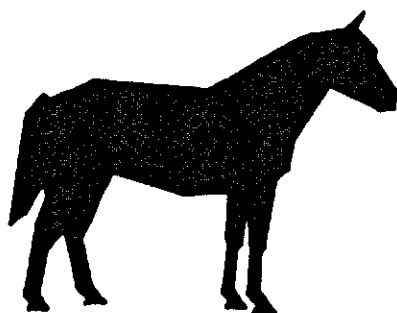
F. H. M. BORGSTEEDE¹⁾).

Tijdschrift voor Diergeneeskunde, 1985, 110, 237-238.

A comparison was made of the efficacy of Ivermectin administered as an injection and as a paste. Fourteen horses which were naturally infected with small strongyles were divided into three groups. Animals of group 1 received an injection of 5 ml Ivermectin, equivalent to 500 kg bodyweight, horses of group 2 received one injector with Ivermectin as a paste (for 500 bodyweight), a third group remained untreated as a control. Faecal examinations and larval cultures on the day of treatment and 14, 28 and 42 days later showed that both injection and paste had a 100 percent efficacy against mature and immature small strongyles in these horses.

Full text in Dutch.

¹⁾ CDI - Department of Parasitology.



The residual effect of treatment with ivermectin after experimental reinfection in calves

F. H. M. BORGSTEEDE¹⁾, and J. HENDRIKS¹⁾

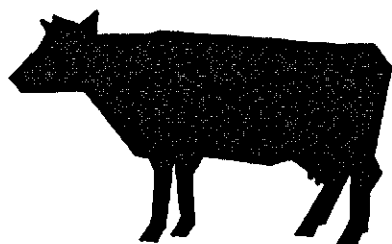
The Veterinary Quarterly, in press.

The residual effect of treatment with ivermectin after experimental reinfection in calves was tested. Twenty four calves were divided into 6 groups of 4 calves each. All calves received a primary infection of 50,000 larvae of *Ostertagia ostertagi*, 50,000 of *Cooperia oncophora* and 1000 of *Dictyocaulus viviparus*. Calves of group 1 remained untreated, all other calves were treated 21 days after primary infection (0.2 mg/kg by subcutaneous injection). Calves of groups 1 and 2 were slaughtered 7 days later. Calves of groups 3-6 were reinfected with the same doses of larvae 3 days, 1, 3 and 6 weeks after treatment respectively. Slaughter was 21 days after reinfection.

Based on post mortem worm counts the efficacy of ivermectin after primary infection was 99.7% for *O.ostertagi*, 91.1% for *C. oncophora* and 100% for *D. viviparus*. The residual effect was present for at least one week, but could not be observed 3 weeks after treatment.

Full text in English.

¹⁾ CDI - Department of Parasitology.



Effects of the use of a morantel sustained release bolus in first and second year grazing cattle

F. H. M. BORGSTEEDE¹⁾, A. KLOOSTERMAN²⁾, D. OOSTENDORP³⁾ and H. VAN TARRIJ⁴⁾

Veterinary Parasitology, 18 (1985) 39-49.

In an experiment carried out in 1981 and 1982, the effect of the use of a morantel sustained release bolus (Paratect® bolus) on the weight gain and a number of parasitological parameters of cattle was studied.

In the first year 42 calves were divided into 3 equal groups, one group was kept outside and treated with a bolus (B), the second group was kept outside and was not treated (C), while the third group remained indoors (I). Groups B and C were grazed separately on contaminated pasture. During the first months Group B had a negligible egg output. The egg output in the controls was much higher and in mid-August they had to be treated for parasitic gastroenteritis. At the end of the grazing season the advantage in weight gain of Group B was 20 kg compared with the controls.

During the housing period the growth in the 3 groups was not significantly different. At the start of the second grazing season half the animals of Groups B, C and I received a bolus (Groups BB, CB and IB). The other half remained untreated (BC, CC and IC). The animals treated with a bolus in 1982 gained significantly more weight (64 g/day) than untreated animals. Heifers turned out for the first time (IB and IC) showed much less weight gain than heifers in their second grazing season. The heifers which had previously grazed in 1981 had a very low egg output compared with Groups IB and IC, although the level of egg output of the latter was also not very high (max. almost 40 eggs per gram (EPG)). In faecal cultures of heifers of Group BC, CB and CC, no *Cooperia oncophora*-larvae were seen from May onwards indicating a strong immunity against this species. In Group BB very low numbers of *C. oncophora*-larvae were observed. In Groups IB and IC, *C. oncophora* was present during the whole season. At the end of the first season the level of herbage infestation on the control pastures was much higher. In 1982 only slight differences in level of infestation between the pastures were observed. At the start of the season in 1982 serum pepsinogen levels were much higher in the groups which grazed in 1981, compared with the indoor-fed groups. Groups BC and CC had significantly higher levels than Groups BB and CB and all 4 groups always had higher levels than Groups IB and IC. The antibody titres of *Ostertagia* and *C. oncophora* followed the same trend as the pepsinogen levels.

Full text in English.

¹⁾ CDI - Department of Parasitology.

²⁾ Agricultural University, Department of Animal Husbandry, Wageningen.

³⁾ Research and Advisory Institute for Cattle Husbandry, Lelystad.

⁴⁾ Pfizer B.V., Rotterdam.

RESISTANCE TO ANTHELMINTICS
(PROJECT 39)

Effect of cool storage of faecal samples containing *Haemonchus contortus* eggs on the results of an in vitro egg development assay to test anthelmintic resistance

C. M. C. SMITH-BUIJS¹⁾ and F. H. M. BORGSTEEDE¹⁾

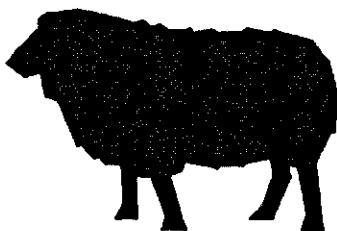
Research in Veterinary Science, in press.

An in vitro egg development assay was used to test the resistance of eggs from a benzimidazole susceptible and a resistant strain of *Haemonchus contortus* to four benzimidazoles. Storage of eggs contained in faecal samples at 4°C for four, 24 or 72 hours did not appear to impair the results from the in vitro egg development assay or alter the LD₅₀. Storage for one week, however, proved to be lethal for the eggs. The average LD₅₀ values for thiabendazole, albendazole, mebendazole and cambendazole were 0.06, 0.07, 0.96 and 2.47 ppm for the susceptible strain.

For the resistant strain the values averaged 0.26, 0.24, 1.07 and 5.11 ppm.

Full text in English.

¹⁾ CDI - Department of Parasitology.



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

Multiple variants in foot-and-mouth disease virus (FMDV) populations: The Achilles heel for peptide and rec. DNA vaccines?

S. J. Barteling¹⁾ and R. Woortmeyer¹⁾

Proceedings of the ESACT meeting 30-9/6-10-1985.

Variants of type A₁₀ FMDV were isolated by passage of virus in BHK-cells in the presence of a neutralizing anti-peptide serum or monoclonal antibodies. These variants which were no longer neutralized by the particular anti-peptide serum or monoclonal antibody were easily isolated from (crude) virus populations (cattle virus and BHK-adapted virus). The rapidity of isolation suggested that these variants are already present in normal virus populations. The variants were cloned by plaque purification.

All variants isolated so far seem to be different:

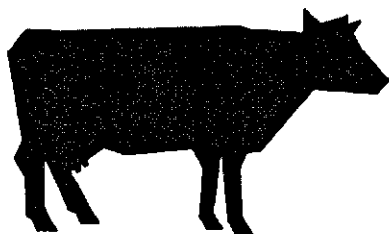
Neutralization of these variants by a panel of 20 monoclonal antibodies and by anti-peptide sera was different for all isolates and parent virus. Anti-variant sera raised in rabbits neutralized parent virus and the different variants at different levels.

The data indicate that at (a low level) many variants are present that are not neutralized by anti-peptide or monoclonal antibodies. Normally these variants escape our attention because in neutralization assays only a limited quantity of infective units are used representing only "top of the iceberg". In classical inactivated virus vaccines many these variants will be represented and therefore can be expected to be "primed" immunogenitically. This will not be the case with peptide vaccines or in case of recombinant DNA products, where only one virus clone is represented.

In addition, and probably more important inactivated virus vaccines will raise antibodies against completely independent epitopes that each have a limited chance to be changed in the variants present in the challenge virus population. Thus if peptide vaccines can be composed in such a way that antibodies are raised against completely different antigenic sites the chance of break through of variants will strongly be limited and it is expected that the efficient protection of inactivated virus vaccines can be approached.

Full text in English.

¹⁾ CDI - Department of Virology.



Conditions for proper formaldehyde inactivation of foot-and-mouth disease alhydrogel vaccines

S. J. BARTELING¹⁾.

Joint ESACT/IABS Meeting on the Production and Exploitation of existing and new Animal Cell Substrates, Gardone Riviera, Italy, 1984 Develop. biol. Standard., Vol. 60, pp. 323-329 (S. Karger, Basel 1985).

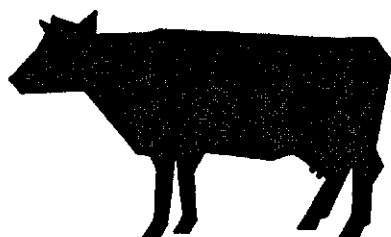
The inactivation of FMDV by formaldehyde (FA) was studied under different conditions, both as free virus and (as in routine vaccine production) after adsorption of the virus to aluminium hydroxide gel (alhydrogel). In the latter case infectivity was monitored after elution of the virus from gel by isopycnic ultracentrifugation of the virus-alhydrogel mixture in CsCl. By this method good virus recoveries were obtained. Adsorption of the virus to alhydrogel (without formaldehyde) did not reduce infectivity significantly. Both adsorbed and non-adsorbed virus lost infectivity at a rate of about one $\log_{10}$ per day (at pH 8.5, 25°C - no formaldehyde).

Kinetics of FA inactivation of adsorbed and non-adsorbed virus were also identical, with a fast reduction in the initial phase. After this initial phase inactivation became linear and rather slow. No 'tailing-off' was observed.

Some additives (f.i. LAH and especially Tris) reduced the inactivation rate. These findings might explain some data of others who observed 'tailing-off'.

Full text in English.

¹⁾ CDI - Department of Virology.



SWINE FEVER (PROJECT 49)

Description of the virus infection

J. T. VAN OIRSCHOT¹⁾

In: Hog cholera. Diseases of swine. VI edition. Eds. A. D. Leman et al., in press.

Hog cholera (HC) can run widely varying courses. The severity and outcome of an hog cholera virus (HCV) infection is determined by the interplay between virulence of the virus and host factors. Although there is a continuous spectrum of virulence, a classification has been made based on different degrees of virulence.

Acute infections with high mortality, characterized by rapid spread of virus throughout epithelial, reticuloendothelial and lymphoid tissues and depression of certain immune functions are caused by high-virulent strains of HCV. Although HCV induces no cytopathic effect in vitro extensive lesions develop in acute HC. The mechanisms of tissue damage in HC remain to be clarified.

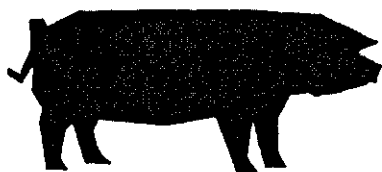
Subacute, chronic, atypical or mild infections with a lower mortality and slower spread of virus throughout the pig's body are induced by HCV strains of moderate virulence. These strains can persist for the pig's lifetime, which is seldom more than 100 days. Low-virulent HCV strains give rise to mild or subclinical infections, when pigs are infected postnatally. These strains can produce congenital infections, characterized by birth of healthy pigs and development of late onset disease, invariably followed by death, not until some months after birth. Virus persistence is lifelong, and pigs are immunotolerant to HCV.

Avirulent strains of HCV are usually attenuated and used as vaccine.

The virus properties involved in the expression of virulence of HCV are unknown.

Full text in English.

¹⁾ CDI - Department of Virology.



Epizootiology of hog cholera

C. TERPSTRA¹⁾

In: Hog cholera and related virus infections / Editor B. Liess, in press.

An account is presented on the distribution and economic impact of hog cholera (HC), pathways of transmission, virus reservoirs and factors influencing the epizootiology. In countries with an intensive pig production system, HC, where present, is economically the most important pig disease.

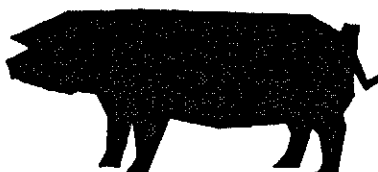
The virulence of the strains circulating in the field and the measures applied to control the disease determine to a large extent the course of an epizootic. Outbreaks by high virulent strains are readily recognized. Epizootics caused by low virulent strains are characterised by indistinct signs of disease, slow spread of virus through the herd and a relatively important role of the "carrier sow syndrome". The latter phenomenon, with the possible birth of healthy-looking but persistently infected and immune tolerant piglets, and chronic infections are largely responsible for the perpetuation of the virus in the pig population.

In close-knit communities with large modern units, man appears the single most important factor in the herd-to-herd transmission of the virus, whereas transport and introduction of infected pigs accounts for the majority of outbreaks in areas with small pig farms.

The 1982-1985 epizootic of HC in The Netherlands showed an almost equal prevalence of outbreaks in breeding and fattening herds. In proportion to the number of herds present in the country, there was in both categories an approximately linear relationship between the risk of infection and the size of the herds.

Full text in English.

¹⁾ CDI - Department of Virology.



Enkele aspecten van Afrikaanse varkenspest

Some aspects of African swine fever

C. TERPSTRA¹⁾

Tijdschrift voor Diergeneeskunde deel 110, afl. 7, 1985, 270-272.

Clinical, pathological and epidemiological characteristics of African swine fever (ASF), and methods of differential diagnosis with classical swine fever are discussed in the light of recent outbreaks of ASF in North-Western Europe.

Full text in Dutch.

¹⁾ CDI - Department of Virology.

Production of monoclonal antibodies against swine fever virus and their use in laboratory diagnosis

G. WENSVOORT¹⁾, C. TERPSTRA¹⁾, J. BOONSTRA¹⁾, M. BLOEMRAAD¹⁾ and D. VAN ZAANE¹⁾

Veterinary Microbiology, in press.

Thirteen hybridoma cell lines which secrete monoclonal antibodies (MCAs) against swine fever virus (SFV) strain Brescia were produced. The hybrid cells resulted from fusion of P3 x 63-Ag8.653 myeloma cells with splenocytes of Balb/c mice which had been immunized with purified SFV.

Screening of supernatant fluids was performed by an indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and an immunoperoxidase monolayer assay (IPMA). The IPMA, and an immunoperoxidase test (IPT) performed on cryostat sections, were used to characterize these MCAs on several pestivirus strains. All MCAs reacted to a varying degree with all but one of the SFV strains tested. None of the MCAs reacted with the bovine viral diarrhoea virus (BVDV) strains.

Two MCAs are now used routinely in the differential diagnosis between infections with field strains of SFV, and the Chinese vaccine strain and BVDV strains.

Full text in English.

¹⁾ CDI - Department of Virology.

VIRUS INFECTIONS IN CATTLE
(PROJECT 51)

Correlation of a disease scoring system with arterial PO₂ values in respiratory syncytial virus infection in calves

J. VERHOEFF¹⁾, A. WIERDA¹⁾ and A. P. K. M. I. VAN NIEUWSTADT²⁾

The Veterinary Quarterly vol. 7, no. 2, 1985, 106-111.

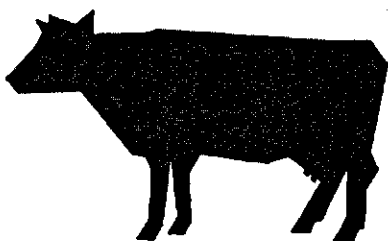
The mean arterial PO₂ value measured in blood obtained by puncture of the brachial artery of 20 calves with acute clinical signs of a bovine respiratory syncytial virus (BRSV) infection was 8.4 ± 1.9 kPa. The values differed significantly from arterial PO₂ values of eleven healthy calves (mean 14.2 ± 1.5 kPa).

A disease scoring system is presented based on the type of respiration and the findings on auscultation. A high correlation ($r = -0.87$) was found between disease scores and arterial PO₂ values. This indicates that the described disease scoring system can be a useful tool in the evaluation of the severity and course of BRSV infections in calves, and could be used for evaluating the efficacy of BRSV vaccines in the field. The course of disease was studied in 127 calves with clinical signs of serologically proven BRSV infection. Animals with mild respiratory signs during the acute phase of disease remained free of severe respiratory problems until the end of a 35-day examination period. Mean disease scores indicated that animals with severe signs in the acute phase often developed persistent respiratory problems.

Full text in English.

¹⁾ Herd Health Department and Ambulatory Clinic. Utrecht.

²⁾ CDI - Department of Virology.



Comparison of a newly developed enzyme-linked immunosorbent assay with complement fixation and neutralisation tests for serology of bovine respiratory syncytial virus infections

F. WESTENBRINK¹⁾, J. M. A. BRINKHOF¹⁾, P. J. STRAVER¹⁾, J. QUAK¹⁾,
P. W. DE LEEUW¹⁾

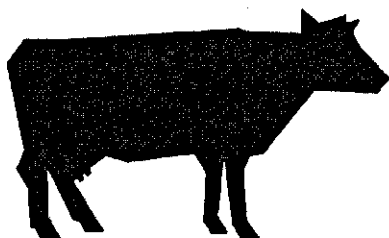
Research in Veterinary Science 1985, 38, 334-340.

An indirect double antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was developed for the detection and titration of serum antibodies to bovine respiratory syncytial virus (BRSV). The ELISA was compared with a complement fixation (CF) test and a test for virus neutralising antibody in serum (virus neutralisation [VN] test). Testing sera collected in dairy herds revealed the closest correlation between the results of the ELISA and the CF test with respect to BRSV antibody titres. The VN test detected BRSV antibodies in a higher percentage of acute phase sera compared to the other two tests in field samples and in early bleedings of experimentally infected calves.

However, the VN test was less effective in making a diagnosis of BRSV infections on the basis of a significant titre increase in paired sera. For this purpose the ELISA was found to be the most sensitive test.

Full text in English.

¹⁾ CDI - Department of Virology.



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

DICK VAN ZAANE¹⁾, JOHAN IJZERMAN¹⁾ and PETER W. DE LEEUW¹⁾

Veterinary Immunology and Immunopathology, 1986, 11, 45-63.

The intestinal and systemic antibody response of calves vaccinated and/or challenged with rotavirus was studied employing isotype-specific ELISAs for the detection of IgG₁, IgG₂, IgM and IgA antibodies to rotavirus. Monoclonal antibodies to bovine immunoglobulin isotypes of proven specificity were used as conjugated or catching antibody.

Five days after oral inoculation (dpi) of a 5-day-old gnotobiotic calf with rotavirus, IgM rotavirus antibodies were excreted in faeces, followed 5 days later by IgA rotavirus antibodies. The increase in IgM rotavirus antibody titre coincided with the inability to detect further rotavirus excretion. Faeces IgM and IgA rotavirus antibody titres fell to low levels within 3 weeks post infection. IgG₁ and IgG₂ rotavirus antibodies were not detected in faecal samples. In serum, antibodies to rotavirus of all four isotypes were detected, starting with IgM at 5 dpi.

Two SPF-calves, which were fed colostrum free of rotavirus antibodies, were vaccinated with a modified live rotavirus vaccine and challenged with virulent rotavirus 6 days later. Upon vaccination, the calves showed an antibody response similar to the response of the infected gnotobiotic calf. Intestinal IgM rotavirus antibodies were excreted before or on the day of challenge and appeared to be associated with protection against challenge infection with virulent virus and rotavirus-induced diarrhoea. In 3 control calves, which were challenged only, the antibody patterns also resembled that of the gnotobiotic calf and again the appearance of IgM rotavirus antibodies coincided with the end of the rotavirus detection period.

Two other groups of 3 SPF-calves were treated similarly, but the calves were fed colostrum with rotavirus antibodies during the first 48 h of life. These calves excreted passively acquired IgG₁ and IgG₂ rotavirus antibodies in their faeces from 2 to 6 days after birth. After vaccination, no IgM or IgA antibody activity in serum or faeces was detectable. Upon challenge, all calves developed diarrhoea and excreted rotavirus. Seven to 10 days after challenge low levels of IgM rotavirus antibody were detected for a short period.

These data indicate that the intestinal antibody response of young calves to an enteric viral infection is associated with the excretion of IgM antibodies, immediately followed by IgA antibodies. This response is absent or diminished in calves with passively acquired specific antibodies which may explain the failure to induce a protective intestinal immune response by oral vaccination with modified live rotavirus of calves fed colostrum containing rotavirus antibodies.

Full text in English.

¹⁾ CDI - Department of Virology.

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

Border disease: A congenital infection of small ruminants

C. TERPSTRA¹⁾

Prog. Vet. Microbiol. Immun., vol. 1, pp 175-198 (Karger, Basel 1985).

Border disease (BD) can be defined as a congenital virus infection of sheep and goats, characterised by embryonic and fetal death with or without abortion, mummification, stillbirth and/or the birth of weak lambs with nervous symptoms, abnormal hairy birth-coat and low viability.

In the review (103 references) an account is given of the present state of knowledge on BD. The disease was first observed in the late forties in the counties along the border between England and Wales and since 1955 also in other parts of England. Identical syndromes have subsequently been reported from Scotland, New Zealand, Ireland, Australia, United States, Switzerland, Greece, The Netherlands, Canada, Germany and Norway. Due to the casual and rather varying flock incidence, the nature of BD remained obscure until Australian workers presented evidence that sheep inoculated with tissue homogenates of lambs suffering from a condition similar to BD developed precipitation antibody against bovine viral diarrhoea virus (BVDV). The infectious nature of the disease and the serological relationship of the causal agent with BVDV initiated an avalanche of transmission experiments but early attempts to isolate the agent failed. The diagnostic resources were essentially extended by the detection of BVD antigen in cryostat sections of various tissues of affected lambs by immunofluorescence.

These antigenic relationship between BDV and BVDV as expressed by virus-specific cross neutralisation tests and their physical and biological similarities make the two agents indistinguishable *in vitro*. These properties, together with the potential to cross-infect the bovine and ovine species and to induce comparable congenital defects, do not justify that the agents are considered distinct viral entities.

The clinical and pathological features of prenatal, neonatal and postnatal infections, pathogenesis, immunity, diagnosis, epizootiology and control of the disease are discussed under separate headings.

As regards future research, new tools such as monoclonal antibodies and immunoblotting of electrophoretically separated polypeptides should be extremely useful for differentiation between BVDV strains and for their classification into serological subgroups. Identification of isolates along these lines would shed more light on the epizootiology of BD and, under certain conditions, could provide the answers to questions, for example as to whether the virus responsible for an outbreak originated from newly introduced sheep, or from virus excreted by cattle grazing concomitantly with the flock, or from the use of a contaminated vaccine.

Full text in English.

¹⁾ CDI - Department of Virology.

AUJESZKY's DISEASE
(PROJECT 54)

Presence of markers for virulence in the unique short or repeat region or both of pseudorabies hybrid viruses

ANTON BERNS¹⁾, ANS VAN DEN OUWELAND¹⁾, WIM QUINT¹⁾,
JAN VAN OIRSCHOT²⁾ and ARNO GIELKENS²⁾.

Journal of Virology 53; 1985, 89-93.

The unique short region and part of the repeat region of virulent pseudorabies virus strain NIA-3 was replaced by the corresponding region of the avirulent NIA-4 strain by transfection with subgenomic DNA fragments. The resulting hybrid virus showed a reduced virulence in both mice and pigs. Therefore, important markers for virulence are located in the unique short or repeat or both of pseudorabies virus. We provide evidence that the terminally located repeat is not required for the generation of progeny with intact pseudorabies virus genomes. Apparently, the terminal repeat is regenerated from the internal repeat.

Full text in English.

¹⁾ University of Nijmegen - Department of Biochemistry.

²⁾ CDI - Department of Virology.



Genome differences among field isolates and vaccine strains of pseudorabies virus

ARNO L. J. GIELKENS¹⁾, JAN T. VAN OIRSCHOT¹⁾ and ANTON J. M. BERNIS²⁾

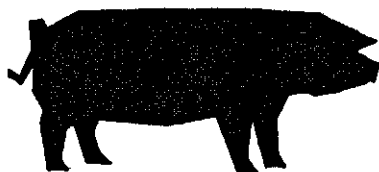
The Journal of General Virology 66; 1985, 69-82.

The DNA of field isolates and vaccine strains of pseudorabies virus (PRV) was analysed by digestion with the restriction endonuclease BamHI. A number of distinct restriction profiles of the field isolates obtained from different locations within Europe were observed. As for herpes simplex virus (Lonsdale et al., 1980) the variations could be classified into two types: first, alterations in the mobility of fragments due to the presence of additional sequences and/or the occurrence of deletions, a phenomenon most apparent in fragments containing part or whole of the repeat sequence of PRV DNA; second, generation of differently sized fragments due to loss and/or gain of restriction endonuclease cleavage sites. By analysis of several strains with BamHI a small number of variable cleavage sites were identified within particular regions of the unique long (U_L) segment of the PRV genome. Compared to wild-type PRV, the restriction fragment patterns of vaccine strains showed characteristic alterations, including the absence of bands, which were nonvariable in wild-type strains, and/or the presence of new bands some of which were submolar. Some of these characteristics could be explained by a deletion in the unique short (U_S) region of the genome of most vaccine strains and the occurrence of closely related variants in the uncloned vaccine virus stocks.

Full text in English.

¹⁾ CDI - Department of Virology.

²⁾ University of Nijmegen, Department of Biochemistry.



Intranasal vaccination of pigs against Aujeszky's disease: comparison with 1 or 2 doses of attenuated vaccines in pigs with high maternal antibody titres

J. T. VAN OIRSCHOT¹⁾

Research in Veterinary Science, in press.

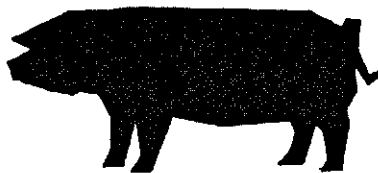
Ten-week-old pigs with high levels of maternally derived antibody (MDA) against Aujeszky's disease virus (ADV) were given a single intranasal (IN) vaccination or 1 or 2 doses (with an interval of 3 weeks) of commercially available attenuated ADV vaccines intramuscularly. The pigs did not produce a clear neutralizing antibody response to ADV. However, pigs vaccinated intranasally and pigs given 2 doses of attenuated ADV vaccines were protected against IN challenge with virulent ADV 2 months after the first vaccination. Pigs given one parenteral dose of attenuated ADV vaccine were insufficiently protected.

Protection was evidenced by shorter periods of growth arrest and fever and a greater reduction of virulent virus shedding after challenge in vaccinated pigs versus nonvaccinated control pigs. Although IN vaccination conferred protection comparable to 2 parenteral doses of attenuated vaccines, it reduced shedding of virulent virus much more effectively.

These results, along with those of previous studies, show that IN vaccination confers better protection against AD in pigs with MDA than parenteral vaccination(s). However, the efficacy of IN vaccination also decreases with increasing levels of MDA at the time of vaccination.

Full text in English.

¹⁾ CDI - Department of Virology.



AVIAN LEUKOSIS
(PROJECT 57)

**Application of monoclonal antibodies in the Dutch avian
leukosis control programme**

G. F. DE BOER¹⁾, A.D. M. E. OSTERHAUS²⁾ and B. KOUWENHOVEN³⁾

Avian Pathology, 14: 435-439, 1985.

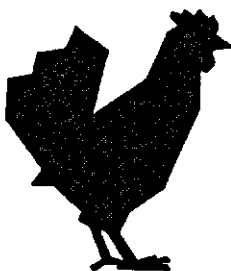
Comparative testing with series of albumen samples obtained from seven Dutch poultry flocks was performed for avian leukosis virus group-specific antigen (ALV-gsa) by complement fixation test (CFT) and by a double antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (DAS-ELISA) employing selected monoclonal antibodies directed to different ALV-p27 epitopes. The higher sensitivity for ALV-gsa detection of the DAS-ELISA resulted in increased scores of ALV-shedding hens in all seven flocks. Relatively low absorbance values seem to be associated with low rates of congenital ALV transmission.

Full text in English.

¹⁾ CDI - Department of Virology.

²⁾ National Institute of Public Health and Environmental Hygiene, Bilthoven.

³⁾ Poultry Health Service, Doorn.



MAREK'S DISEASE
(PROJECT 58)

Protective efficacy of Marek's disease virus (MDV) CVI-988 CEF₆₅ clone C against challenge infection with three very virulent MDV strains

G. F. DE BOER¹⁾, J. E. GROENENDAL¹⁾, H. M. BOERRIGTER¹⁾, G. L. KOK¹⁾ and J. M. A. POL¹⁾.

Avian Diseases, in press.

Comparative 50% protective dose (PD₅₀) assays were performed using a plaque-purified preparation of Marek's disease virus (MDV) strain CVI-988 at the 65th chicken embryo fibroblast (CEF) passage level (MDV CVI-988 CEF₆₅ clone C) and three commercial MD vaccines: herpesvirus of turkeys (HVT) FC126, MDV CVI-988 CEF₃₅ and a bivalent vaccine composed of HVT FC126 and MDV SB-1. In addition, comparative PD₅₀ assays were performed in groups of chickens with maternal antibody to each of the three vaccines. Three representatives of the newly emerged biovariant very virulent (vv) MDV strains, – RB/1B, Tun, and Md5 – were employed as challenge virus.

The experiments made feasible the differentiation between virulent MDV and vvMDV strains, within serotype 1.

Vaccination with CVI-988 clone C vaccine resulted in PD₅₀ estimates of about 5 plaque-forming units (PFU) against challenge infection with each of the three vvMDV strains. The PD₅₀ estimate of CVI-988 clone C vaccine was 12-fold below the PD₅₀ of HVT FC126. The protective synergism of bivalent vaccine, composed of HVT and SB-1, was confirmed by groups given the lowest vaccine doses. The bivalent vaccine, however, resulted in incomplete protection in groups given the highest vaccine doses. Homologous maternal antibodies to serotype 1 caused a fivefold increase in the PD₅₀ estimate of CVI-988 clone C. Heterologous maternal antibodies against HVT did not interfere with efficacy of CVI-988 clone C vaccination. However, the combination of maternal antibodies against both HVT and SB-1 (serotypes 2 and 3) showed a strong adverse effect on CVI-988 clone C vaccine. The effect of maternal antibody induced by bivalent vaccine can be explained by the binding capacity of antibodies directed to serotype-common antigenic determinants of serotype 1 strains, which are partially shared by serotype 2 and which for another part are present on serotype 3 viruses. Results indicate that the mechanism of protective synergism of bivalent MD vaccines is mediated by the immune response to the combination of serotype-common antigenic determinants of virus serotypes 2 and 3.

Full text in English.

¹⁾ CDI - Department of Virology.

Pathogenicity studies with plaque-purified preparations of Marek's disease virus strain CVI-988

J. M. A. POL¹⁾, G. L. KOK¹⁾, H. L. OEI²⁾ and G. F. DE BOER¹⁾

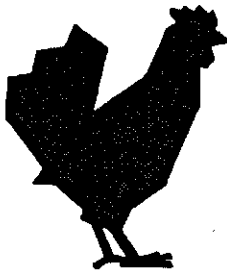
Avian Diseases, in press.

The pathogenicity of Marek's disease (MD) strain CVI-988 vaccine, eight plaque-purified preparations originating from this strain, and the vaccine HVT FC126 was determined by intramuscular administration of high virus doses to day-old specific-pathogen-free Rhode Island Red (RIR) chickens, which are extremely MD-susceptible.

Paralysis and neuritis were observed in 88% of RIR chickens inoculated with MDV CVI-988 at the cell-passage level of the commercial vaccine. HVT FC126 caused paralysis in two of 39 RIR chickens tested of which one had an endoneural lymphoma and endoneural inflammation in another three chickens. Five plaque-purified MDV CVI-988 virus preparations at various cell-culture passage levels caused no lesions. On another three clones two caused inflammatory B-type lesions in the nerves of 1/10 chickens, and the third clone caused inflammatory non-neoplastic MD lesions in the liver of 1/11 chickens.

1) CDI - Department of Virology.

2) CDI - Department of Control and Standardization.



Gel electrophoretic analysis of polypeptides from nucleocapsids of Marek's disease virus strains and herpesvirus of turkey

F. WESTENBRINK¹⁾, J. M. A. BRINKHOF¹⁾ and A. L. J. GIELKENS¹⁾

Archives of Virology 84, 217-231 (1985).

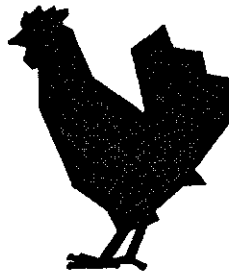
The polypeptides of nucleocapsids of Marek's disease virus (MDV) strains with different biological properties and of antigenically related herpesvirus of turkey (HVT) strains were analysed by one- and two-dimensional (1 D and 2 D, respectively) gel electrophoresis. Based on small differences in migration behaviour (size and charge) of a number of corresponding nucleocapsid polypeptides, the virus strains could be differentiated into three groups.

The polypeptide pattern of group I, comprising the virulent MDV-strain K and the attenuated strains, HPRS-16/att and CVI 988 37th passage, was composed of four major polypeptides (i.e. 140K, 50K, 40K and 33K daltons) and at least four minor polypeptides. The pattern of group II, comprising the naturally occurring non-oncogenic MDV-strains SB-1 and HPRS-24, contained one additional major polypeptide of 39K daltons. The nucleocapsid-specific 2D polypeptide patterns of the HVT strains HVT-Fc126 and PB-THV₁, comprising group III, were distinguishable from each other on the basis of a small difference in size of one major 50 K polypeptide.

Results were further substantiated by coelectrophoresis experiments.

Full text in English.

¹⁾ CDI - Department of Virology.



INFECTIOUS BRONCHITIS

(PROJECT 60)

Antigenic differentiation of avian bronchitis virus variant strains employing monoclonal antibodies

G. KOCH¹⁾, L. HARTOG¹⁾, A. KANT¹⁾, D. VAN ROOZELAAR¹⁾ and G. F. DE BOER¹⁾

In: Proceedings EEC meeting "Recent advances in acute viral diseases of poultry", Brussels 13/14 June 1985.

Monoclonal antibodies (McAbs) to Infectious Bronchitis Virus (IBV) were prepared and tested for reactivity to different IBV variant strains by an indirect enzyme-immunoassay.

With the exception of two McAbs specific for the nucleoprotein, which did not recognize the SE-17 strain, all McAbs to the matrix and nucleoprotein reacted with all strains tested. McAbs to the matrix and nucleoprotein, therefore, are suitable for diagnostic purposes.

On basis of the reactivity pattern to variant strains of a panel of McAbs specific for the peplomer protein, it was possible to differentiate Dutch variant strains into three groups.

Full text in English.

¹⁾ CDI - Department of Virology.



MAEDI-VISNA
(PROJECT 65)

Experimental maedi-visna control in the Netherlands

D. J. HOUWERS¹⁾

In: Slow viruses in sheep, goats and cattle. Proceedings of two CEC workshops. Report EUR 8076. Edited by J. M. Sharp and R. Hoff-Jørgensen, 1985, p. 291-295.

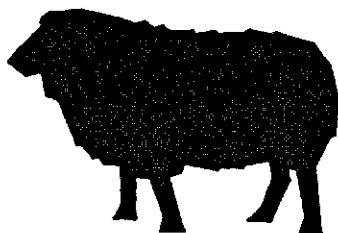
Two basically different methods of maedi-visna (mv) control under field conditions were investigated. The method of artificial rearing of colostrum deprived lambs proved to be effective in obtaining mv-free flocks. It furthermore appeared practicable, with low mortality, although rather expensive. It seems to be the method of choice for highly infected valuable breeding flocks.

The method of half-yearly serological testing with culling of reactors and progeny also proved effective. The data indicated that culling of all progeny (preceeding years included) was the most efficient approach. The reappearance of reactors in one of the flocks led to the conclusion that the infection must have persisted in the flock for 3 years without inducing a sero-response. However, so far, this appears to have a low incidence.

A small field experiment showed that the progeny of one-year-old ewes hardly became infected during the usual suckling period, thus offering a possible alternative method of maedi-visna control.

Full text in English.

¹⁾ CDI - Department of Virology.



RESEARCH ON DISINFECTANTS
(PROJECT 83)

Investigations on the sporicidal and fungicidal activity of disinfectants

H. H. LENSING¹⁾, and H. L. OEI¹⁾

Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene, I Abteilung, Originale, Reihe B, 1985, 181, 487-495.

The sporicidal and fungicidal activity of disinfectants was studied in a suspension test. Glutaraldehyde 4%, sodium-dichloroisocyanurate-dihydrate (2400 ppm active chlorine) and peracetic acid 0.25% demonstrated after 30 minutes of exposure at 20°C in the presence of 4% horse serum a clear activity against spores of *Bacillus cereus*. Under the same conditions formaldehyde 4% and glutaraldehyde 2% were also found to be sporicidal, but only after a longer time of exposure.

Spores of *Bacillus anthracis* and *B. cereus* appeared to be comparably resistant against the investigated disinfectants, whereas conidiospores of *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus niger* were less resistant. Of the micro-organisms tested *Candida albicans* proved to be slightest resistant, while spores of *Bacillus subtilis* were found the most resistant.

Full text in English.

¹⁾ CDI - Department of Control and Standardization.

DIAGNOSIS OF DISEASES OF PIGS (PROJECT 88)

Swine dysentery in a sow herd

I. Clinical manifestation and elimination of the disease with a combination of lincomycin and spectinomycin

L. A. M. G. VAN LEENGOED¹⁾, H. F. SMIT²⁾, A. BRAND²⁾ and J. F. FRIK²⁾

The Veterinary Quarterly 1985, 7, 146-150.

An acute outbreak of swine dysentery (Doyle) on a farrowing farm is described. Besides clinical signs of enteritis a general loss of condition was seen throughout the herd. This resulted in a decreased fertility and breeding performance among sows and an increase in piglet mortality. Several dehydrated sows aborted.

The outbreak was stopped by oral treatment with lincomycin/spectinomycin 1:1. In the course of the treatment all animals and buildings were washed and disinfected. The use of pharmacotherapeutics in treating swine dysentery is discussed with emphasis on the involuntary induction of carriers.

Full text in English.

¹⁾ CDI - Department of Herd health and Pathology.

²⁾ State University Utrecht, Faculty of Veterinary Medicine.

Swine dysentery in a sow herd

II. Comparison of a direct fluorescent antibody test with selective culture in the laboratory diagnosis

H. F. SMIT¹⁾, L. A. M. G. VAN LEENGOED²⁾ and J. M. JONGERIUS¹⁾

The Veterinary Quarterly 1985, 7, 150-153.

During and after an outbreak of swine dysentery (Doyle) two diagnostic techniques were compared: a direct fluorescent antibody test and a selective culture method. The latter was more sensitive, provided the animals were not medicated and the samples were processed on the day of collection. The widespread use of chemoprophylaxis makes selective culture as a diagnostic aid under Dutch conditions highly impractical.

Full text in English.

¹⁾State University Utrecht, Faculty of Veterinary Medicine.

²⁾ CDI - Department of Herd Health and Pathology.

DIAGNOSIS OF DISEASES OF SMALL RUMINANTS
(PROJECT 89)

**An outbreak of caseous lymphadenitis in dairy goats:
First report of the disease in the Netherlands**

B. E. C. SCHREUDER¹⁾, E. A. TER LAAK²⁾, and H. W. GRIESEN³⁾

The Veterinary Quarterly, in press.

An outbreak of caseous lymphadenitis in which three herds of goats were involved is described. *Corynebacterium pseudotuberculosis* was shown to be the causative organism. The outbreak was associated with imported goats.

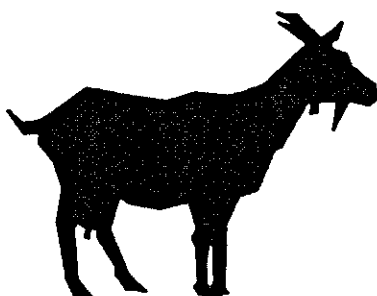
As this is the first report of *C. pseudotuberculosis* causing caseous lymphadenitis as a clinical entity in small ruminants in the Netherlands, clinical and epizootiological aspects as well as possible methods of control are discussed.

Full text in English.

¹⁾ CDI - Department of Herd health and Pathology.

²⁾ CDI - Department of Bacteriology.

³⁾ Practitioner at Zeewolde.



**DIAGNOSIS OF DISEASES OF FUR ANIMALS
(PROJECT 91)**

Pathology of Aujeszky's disease in mink

T. G. KIMMAN¹⁾ and J. T. VAN OIRSCHOT²⁾

Veterinary Pathology, in press.

Lesions in 21 mink which died of Aujeszky's disease are described. Macroscopically, hemorrhages were widespread and especially pronounced in the lungs, heart, mediastinum, thymus, diaphragm, gastric wall, pancreas and, in eight cases, in the enteric wall. Microscopically, hyalin and fibrinoid degeneration, and necrosis of vessel walls were present in the cardiac muscle, the brain, the gastrointestinal wall and occasionally elsewhere in the body. Hemorrhages, exudation of plasma proteins and necrosis were associated with the angiopathy. Inflammation usually was minimal or absent. Other findings were congestion and extravasation of blood (lungs, liver), depletion and necrosis of lymphoid cells, and hemoglobinuric nephrosis. Aujeszky's disease virus (ADV) was isolated from all but three animals. After experimental infection of three mink with ADV, similar though less pronounced lesions were found to those observed in the field cases.

Full text in English.

¹⁾ CDI - Department of Herd health and Pathology.

²⁾ CDI - Department of Virology.



OTHER INVESTIGATIONS

(PROJECT 96)

Vatbaarheid voor infectieuze laryngotracheïtis van andere vogels dan kippen

Susceptibility of some avian species other than chickens to infectious laryngotracheitis virus

F. W. HILBINK¹⁾

Tijdschr. Diergeneeskd., deel 110, afl. 11, 1985, 437-439.

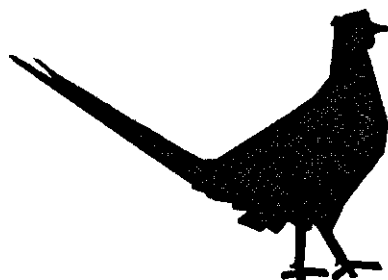
Susceptibility to infectious laryngotracheitis virus was studied in peafowl (*Pavo cristatus*), various species of pheasant (*Phasianus colchicus*, *Lophura swinhoii*, *Lophophorus impejanus*), guinea-fowl (*Numida meleagris*), canaries (*Serinus canaria*), budgerigars (*Melopsittacus undulatus*) and Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*).

Apart from clinical observations, experiments were evaluated in terms of histopathology, immunofluorescence, serology and recovery of virus.

Only peafowl and pheasants were found to be susceptible, pheasants responding more strongly than chickens to ocular vaccination and intratracheal inoculation. The other species were found to be refractory.

Full text in Dutch.

¹⁾ CDI - Department of Herd Health and Pathology.



The mediators and mechanisms causing the non-adrenergic, non-cholinergic nerve responses in opossum esophagus: role of interstitial cells of Cajal

EDWIN E. DANIEL¹⁾, LOWIE P. JAGER²⁾, JENNIFER JURY¹⁾, AZZA HELMY-ELKHOLY¹⁾, MATHUR S. KANNAN¹⁾ and VIRGINIA POSEY-DANIEL¹⁾

Biomedical Research 5, Supplement, 67-84 (1984).

The structure and function of non-adrenergic, non-cholinergic (NANC) nerves in the circular muscle layer of the esophagus of North American opossum have been studied.

Varicosities of these nerves contained mostly small agranular and sometimes also large granular vesicles and were close to interstitial cells of Cajal but not to smooth muscle cells. The interstitial cells of Cajal were easily identified and found in gap junction contact with smooth muscle cells and one another. Field stimulation of these nerves with a single pulse caused a large inhibitory junction potential (ijp) followed by an after or 'off' depolarization, often accompanied by spikes and contraction.

These responses were evoked by short duration pulses (<1 msec), and blocked by tetrodotoxin or by pretreatment with scorpion venom; hence they involved nerves. Evidence from several sources, including double sucrose gap studies, showed that the ijp was probably caused by increased K^+ -conductance. The K^+ -channels involved were insensitive to apamine, 4-aminopyridine and tetraethylammonium ion. The 'off' depolarization was dependent on external chloride. Neither any purine nor VIP evoked hyperpolarization when added to the perfusing medium. Acting directly on the muscle, ATP usually caused a transient slight depolarization and contraction whereas VIP induced repetitive contractions in phase with oscillations of membrane potential. Ijps were not affected by VIP but the 'off' responses following it were enhanced. Ijps were reduced by adenosine and other purines acting on pre-synaptic P_1 -type receptors. The actions of VIP were all abolished in Cl free media. Thus neither purines nor VIP had actions identical to the inhibitory mediator, but VIP may have mediated the 'off' depolarization. The possibility that the response of opossum circular muscle to NANC nerve is mediated via actions on interstitial cells of Cajal was discussed and the consequences of this for the criterion of neurotransmitter identification that actions of endogenously released neurotransmitters are identical to those of exogenously applied putative transmitters are pointed out.

Full text in English.

1) McMaster University, Health Sciences Centre, Hamilton, Ontario, Canada.

2) CDI - Department of Control and Standardization, Pharmacology Section.

Criteria for the involvement of adenosine and adenine nucleotides in nonadrenergic, noncholinergic transmission

LOWIE P. JAGER¹⁾ and ADRIAAN DEN HERTOEG²⁾

Chapter 20 from: METHODS IN PHARMACOLOGY, Vol. 6. Edited by David M. Paton (Plenum Publishing Corporation, 1985).

In his synthetic overview of the physiology of synaptic transmission, Eccles (1964) summarized the criteria put forward up to then. Since that time, knowledge of neurohumoral transmission has vastly increased, but Eccles's criteria still provide a good starting point for an appraisal of data and methods used in research concerning the involvement of "purines" in neurotransmission.

In a commentary, Orrego (1979) updated the criteria for application in studies with preparations of central nervous tissue. Although the proposed division of the criteria into a set of primary and secondary ones seems not wholly appropriate for the present discussion, they reflect a differential assessment of experimental observations that might not be tissue specific. Our adherence to Eccles's criteria is mostly due to the fact that he used the same order as the sequence in the physiological phenomenon studied: presynaptic presence, release, postsynaptic action, inactivation, and pharmacological interference. In the present discussion, we start each section by quoting the relevant criterion, discuss its discriminating power in general, and subsequently consider the physiological and pharmacological data available concerning the NANC nerves and the purinergic nerve hypothesis.

NANC nerves or responses supposedly mediated via intramural NANC nerves are reported from almost all visceral organs of entodermal origin. However, most reports deal with gastrointestinal preparations, among which the guinea pig taenia caecum figures as the "top hit", and far less detailed information is available concerning other organ systems, such as the respiratory tract, esophagus and the urogenital tract. We have therefore chosen to discuss the criteria in relation to the purinergic nerve hypothesis firstly with taenia caecum data and to deal more superficially with information from other preparations.

Within the set of criteria formulated by Eccles, that of identical actions of endogenous and putative transmitters and that of pharmacological identity seem to be the cornerstones for an evaluation. Gaddum referred to pharmacology as a jack of all trades, and along the same lines Werman (1966) rearranged pharmacology into the seven criteria linked to the physiology of synaptic transmission that he discerned. In this chapter we have followed the same line, but, although Werman formulated an eighth criterion concerning postsynaptic pharmacology and subsequently included that in the identity of action criterion, we chose to narrow further the definition of a separate pharmacology criterion. Postsynaptic pharmacology beyond the receptor produces insight into the mode of action of the neurotransmitter and the physiology of the effector organ and should thus be included in the identical actions criterion. Interactions, especially competitive, at the postsynaptic receptor between endogenous neurotransmitter, putative agonists, and antagonists provide a separate and indispensable measure for the evaluation of any -ergic nerve hypothesis.

In view of the criteria set, unambiguous proof for the purinergic hypothesis is lacking, whereas serious arguments against can be raised. In some preparations, all available

data are explainable if the NANC nerves are purinergic nerves, e.g., guinea pig taenia caecum. In other preparations, the available data exclude the possibility that the NANC nerves are purinergic nerves e.g., opossum esophageal circular muscle.

As long as so many facets of NANC nervous control of smooth muscle function have not been studied, the current state of affairs renders it counterproductive to hypothesize that all NANC nerves are "purinergic" or "peptidergic" (Hakanson *et al.*, 1981) or anything else.

There are always preparations to be found in which a NANC-nerve-mediated response can be measured in such a way that it seems to favor a pet-ergic nerve hypothesis. Detailed and verified information is available from only one preparation; the taenia, and that has yielded inconclusive evidence concerning the purinergic hypothesis for these NANC nerves. An assessment of the purinergic hypothesis will be possible when comparable amounts of information are available from other preparations and from other species and other classes in the chordate phylum and when a proven competitive P_2 -purinoceptor antagonist can be employed. Till then, the purinergic nerve hypothesis will continue to function as a challenging starting point to enlarge the physiology of the intramural, nonadrenergic, noncholinergic neural control of smooth muscles.

Full text in English.

- 1) CDI - Department of Control and Standardization, Pharmacology Section.
- 2) State University Groningen, Department of Pharmacology.



Unusual potassium channels mediate nonadrenergic noncholinergic nerve-mediated inhibition in opossum esophagus

J. JURY¹⁾, L. P. JAGER²⁾ and E. E. DANIEL¹⁾.

Can. J. Physiol. Pharmacol., 1985, 63: 107-112.

Field stimulation of the circular muscle of the opossum esophagus produces a transient hyperpolarization (inhibitory junction potential, IJP) followed by an "off" depolarization. A similar nonadrenergic, noncholinergic (NANC) response in guinea pig taenia caecum has been shown to be due to an increase in the potassium ion permeability of the smooth muscle cell membrane. Double sucrose gap studies showed a decrease in resistance during the IJP, and a reversal at an estimated membrane potential of about -90 mV (4 mM K^+). The reversal potential was dependent on the extracellular potassium concentration, shifting to -75 mV when the potassium in the superfusion medium was increased to 10 mM . The IJP in the opossum esophageal circular smooth muscle is therefore like the IJP of the guinea pig taenia caecum in that it is probably due to a selective increase in potassium ion permeability. Potassium conductance blocking agents, tetraethylammonium chloride TEA, 20 mM) and 4-aminopyridine (4-AP, 5 mM) both caused a depolarization of the smooth muscle cell membrane, but TEA increased the membrane resistance, whereas 4-AP did not affect the membrane conductance in a consistent way. A decrease in IJP amplitude owing to these agents was not apparent. Apamin ($10\text{ }\mu\text{M}$) did not affect the membrane potential, the membrane resistance, or the IJP. Quinine (0.1 mM) produced effects quantitatively similar to those of TEA. Quinine (1 mM) did abolish the IJP, however, this was likely due to a blockade of impulse transmission of the intramural nerves. These results suggest that the receptor-operated channels opened by the NANC-nerve mediator in this tissue are unusual in that they are different from those functioning to maintain the resting membrane potential and they differ from those involved in the IJP in the guinea pig taenia caecum.

Full text in English.

¹⁾ McMaster University, Hamilton, Ontario, Department of Neurosciences.

²⁾ CDI - Department of Control and Standardization, Pharmacology Section.

Electrical properties of smooth muscle cell membrane of opossum esophagus

M. S. KANNAN¹⁾, L. P. JAGER²⁾ and E. E. DANIEL¹⁾

Am. J. Physiol. 248 (Gastrointest. Liver Physiol. 11): G342-G346, 1985.

The electrical properties of the circular smooth muscle layer from the North American opossum esophagus (body) were studied in vitro by microelectrode recording techniques, both at rest and during stimulation of intramural inhibitory nerves. All observations were made at 37 °C in an Abe-Tomita partitioned bath on muscle strips dissected 2 cm orad of the lower esophageal sphincter. At rest, the potential of the smooth muscle cell membrane was -49 ± 4 mV (mean $\pm$ SE); the length constant and the time constant were 2.0 ± 0.6 mm and 120 ± 16 ms, respectively. The inhibitory junction potential (IJP) elicited by stimulation of intramural nerves was followed by a "rebound" or "off" response, characterized by a membrane depolarization on which spikes were superimposed and concomitant mechanical activity of the preparation that usually caused dislocation of the recording microelectrode. The maximal IJP amplitude was 35 mV, and the response reversed at a membrane polarization to -90 mV, suggesting that the IJP was due to an increase of the permeability toward potassium ions. The invariability of the IJP latency at different distances from the stimulating electrodes (1.25–4 mm) suggests that the latency is largely due to diffusion of transmitter from nerve varicosities to postsynaptic receptor sites. Depending on the rate, prolonged stimulation caused fusion of IJP or a continuous hyperpolarization of the membrane. The hyperpolarization faded with time, but off responses were only observed after terminating stimulation. The passive electrical properties of the membrane are comparable with those of other gastrointestinal smooth muscles. The response to stimulation of intramural nonadrenergic, noncholinergic nerves is essentially similar to that described for other circular smooth muscle of the gastrointestinal tract.

Full text in English.

¹⁾ McMaster University, Health Sciences Centre, Department of Neurosciences, Hamilton, Ontario, Canada.

²⁾ CDI - Department of Control and Standardization, Pharmacology Section.

SYNTHETIC PEPTIDE VACCINES
(PROJECT 100)

An epitope located at the C-terminal of isolated VP1 of foot-and mouth disease virus type O induces neutralizing activity but poor protection

R. H. MELOEN, S. J. BARTELING

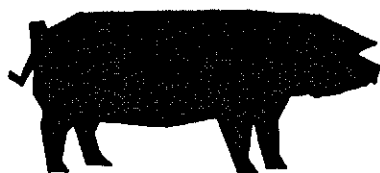
Journal of general Virology, 1986, 67, 289-294.

Both whole virus and isolated VP1 of foot-and-mouth disease virus type O1 induce antibodies.

Results obtained with pigs vaccinated with either isolated VP1 or intact inactivated foot-and-mouth disease virus type O1 and subsequently challenged show that neutralizing activity induced by intact virus correlates well with protection in pigs, however neutralizing activity induced by isolated VP1 is hardly related to protection. Further evidence suggests that the epitope, responsible for the induction of neutralization is located at the C-terminal end of the protein between residues 200 and 210.

Full text in English.

1) CDI - Department of Virology.



Epitope mapping of the outer structural protein VP1 of three strains of FMDV belonging to type O, A and C

R. H. MELOEN¹⁾, S. J. BARTELING¹⁾

Virology, in press.

All overlapping hexapeptides of the outer structural protein VP1 of type O1, type A10 and type C1 were reacted with the appropriate anti-virus, anti-viral subunit and anti-VP1 sera.

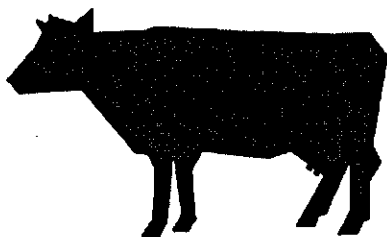
The results suggest that anti-virus sera may contain activities against viral subunit and VP1 as well as against virus.

Furthermore the antigenic peptides associated with the intact virion of all three serotypes are found at similar locations on their respective VP1's, and produced neutralising activities when used for vaccination. The results further offer an explanation for the often observed cross reactions between serotypes, especially at the level of the viral subunit and VP1. The reliability of predictions of useful peptides from hydrophilicity profiles and secondary structure predictions is questioned.

Predictions based on variation profiles appear to be more usefull. An attempt is made to understand antigenic activity in terms of secondary structure predictions and existing data on proteolytic degradation of the virus. A hypothetical model is proposed for the exposed parts of VP1.

Full text in English.

¹⁾ CDI - Department of Virology.



Other Publications

Baars, A. J. et al.

Environmental heavy metals in a salt marsh and their effect on sheep. 26th Congress of the European society of toxicology, University of Kuopio, Kuopio, Finland, June 16-19, 1985, p. 111.

Baars, A. J.

Gezondheidstoestand schapen op het schor van Saeftinge.

In: De Schelde belicht en gewogen, Internationale Scheldewerkgroep (red.), p. 85.

Benedictus, G.; Haagsma, J.

De toepassing van de operatieve lymfklier diopsie: Perspectieven bij de bestrijding van paratuberculose op een besmet rundveebedrijf?

Veterinary Quarterly, in press

Bianchi, A. T. J. et al.

Expressie van de mucosale immuunrespons aan de darm.

Najaarsvergadering Ned. Ver. Immunologie, dec. 1985, p. 85.

Boer, G. F. de; Osterhaus, A. D. M. E.

Toepassing van monoclonale antistoffen bij detectie van ALV-gs antigeen in het Nederlandse aviaire leukosebestrijdingsprogramma.

Tijdschrift voor Diergeneeskunde, 1985, 110 (20), 842-844.

Bokhout, B. A.

Aleutian disease bestrijding. Stand van zaken medio 1985.

De Pelsdierenfokker, augustus 1985.

Graaf, G. J. de, & Spierenburg, Th. J.

High-pressure liquid chromatographic assay for carbadox and desoycarbadox in medicated feeds and in contents of the porcine gastrointestinal tract.

In: Comparative veterinary pharmacology, toxicology and therapy, part I. Abstracts third E.A.V.P.T. Congress, Editors: Miert, A.S.J.P.A.M. van, Bogaert, M. G. & Debackere, M. Utrecht, 1985, p. 90.

Haagsma, J.

Botulismus bij watervogels.

It vrije fjild, 1985, 7, 11-13.

Houwers, D. J.

Monoclonale antilichamen in de zwoegerziektebestrijding bij het schaap.

Tijdschrift voor Diergeneeskunde, 1985, 110 (20), 845.

Houwers, D. J.; Schaake, J.

A blotting technique; serological and biochemical comparison of maedi/visna virus and caprine arthritis encephalitis virus. A preliminary report.

In: Slow viruses in sheep, goats and cattle / Edited by J. M. Sharp and R. Hoff-Jørgensen. - Luxembourg: CEC, 1985, 149-151. - Report EUR 8076.

Jager, L. P.

Gemedicineerde voeders: mengen met gif.

De molenaar, 1985, 88, 1003-6.

- Jager, L. P. et al.
A porcine pharmacology of carbadox.
Abstracts third E.A.V.P.T. congress, Ghent, 1985, Part I, 219.
- Jury, J.; Jager, L. P.; Daniel, E. E.
Release of a VIP-like material by dopamine from opossum esophagus circular muscle: actions distinct from non-adrenergic inhibitory mediator.
Digestive diseases and sciences, 1985, 30.
- Koch, G.; Boer, G. F. de
Monoclonale antilichamen tegen aviaire infectieuze bronchitis virus.
Tijdschrift voor Diergeneeskunde, 1985, 110 (20), 846.
- Leengoed, L. van
Nieuwe streptokokken zijn gevaarlijker.
Varkenshouderij, 15, oktober 1985.
- Leeuw, P. W. de
Vragen rond BVD vragen nog veel onderzoek.
Veehouderij, 70, 1985, 26-29.
- Meloen, R. H. et al.
Karakterisering van neutraliserende epitopen van mond- en klauwzeer virus met monoclonale antilichamen.
Tijdschrift voor Diergeneeskunde, 1985, 110 (20), 847.
- Molen, E. J. van der; Nabuurs, M. J. A.
Clinical and pathological changes related to toxicity of carbadox in weaned pigs. *Ibid.* 1985, p. 209.
- Molen, E. J. van der et al.
A specific effect of carbadox on the adrenals of weaned pigs.
Autumn meeting of The British toxicology society, September 1985, p. 35.
- Molen, E. J. van der et al.
Carbadox-induced changes in aldosterone and ion-levels in the blood of weaned pigs.
Colloquium spectroscopicum internationale XXIV, september 1985, Vol. 1, p. 089.
- Nabuurs, M. J. A.
Diarree bij zogende biggen heeft meerdere oorzaken.
Varkenshouderij, 15, oktober 1985.
- Nabuurs, M. J. A.
Slingerziekte heeft twee gezichten.
Varkenshouderij, 15, oktober 1985.
- Noorman, N.
Gevaar van leverbotinfectie ligt op veel bedrijven op de loer.
Boer en tuinder, 1985, 39, nr 1957, p. 70-73.
- Oirschot, J. T. van
Control of Aujeszky's disease.
Veterinary Record, 1985, 177, 533.
- Oirschot, J. T. van
We zullen met influenza moeten leren leven.
Varkenshouderij, 15, oktober 1985.

Schreuder, B. E. C.

Uierontsteking bij het schaap.

Het Schaap, mei/juni 1985.

Spierenburg, Th. J.; Graaf, G. J. de & Jager, L. P.

Levels of carbadox in porcine blood and gastrointestinal contents after in-feed administration. Ibid. 1985, p. 91.

Terpstra, C.

De mens is vaak zelf de overbrenger van varkenspest.

Boerderij/Varkenshouderij, 70, 6-9 Va, 1985.

Verheijden, J. H. M.; Leengoed, L. A. M. G. van

Melkgebrek en uierontsteking zijn belangrijke redenen van uitval.

Varkenshouderij, 15, oktober 1985.

Wensvoort, G. et al.

Gebruik van monoclonale antilichamen (MCA's) in een immunoperoxidase-test (IPT) ten behoeve van de differentiaal diagnostiek van Pestivirussen.

Tijdschrift voor Diergeneeskunde, 1985, 110 (20), 849.

Zaane, D. van

De toepassing van monoclonale antilichamen in het diergeneeskundig onderzoek.

Tijdschrift voor Diergeneeskunde, 1985, 110 (20), 818.

Zaane, D. van ; IJzerman, J.; Hulst, M. M.

Monoclonale antistoffen tegen runder- en varkens immunoglobuline-klassen.

Tijdschrift voor Diergeneeskunde, 1985, 110 (20), 849-850.

Zijderveld, F. G. van et al.

Toepassing van monoclonale antilichamen bij de diagnostiek van neonatale enterotoxische colibacillose (NEC) bij big en kalf.

Tijdschrift voor Diergeneeskunde, 1985, 110 (20), 850-851.

Projectenlijst

Nadere informatie over afzonderlijke projecten is op verzoek verkrijgbaar

Projectnr.: Titel:

- | | |
|----|---|
| 01 | Visziekten – Haenen. |
| 02 | Diarree bij biggen rond de speenleeftijd incl. slingerziekte
– <i>Nabuurs, De Leeuw, Jager, Van der Molen, Van Zijderveld.</i> |
| 03 | Neonatale kalverdiarree
– <i>Moerman, Van Zijderveld, De Leeuw, Van Zaane.</i> |
| 05 | Luchtwegaandoeningen bij jongvee
– <i>De Leeuw, Straver, Zimmer, Kimman, Kamp, Ter Laak.</i> |
| 06 | Opsporen en bestuderen van oorzaken, welke aanleiding geven
tot ziekte en sterfte bij in het wild levende vogels (vogelsterfte)
– <i>Smit, Baars, Over, Spierenburg, Haagsma, Ter Laak,</i>
<i>Borgsteede.</i> |
| 07 | Diagnostiek en onderzoek ten dienste van de import van pape-
gaaiachtige vogels
– <i>Smit, De Boer, Ter Laak, Koch.</i> |
| 08 | Veterinaire begeleiding van landbouwhuisdieren van in Ooste-
lijk Flevoland gelegen instituten en proefbedrijven
– <i>Talmon, Moerman, Schreuder.</i> |
| 09 | Carbadox |
| 11 | Ontwikkeling van residu-analyse methoden i.v.m. het aantonen
van vergiftigingen door bestrijdingsmiddelen en andere stoffen
– <i>Baars, Spierenburg.</i> |
| 12 | Toxicologisch onderzoek van praktijkgevallen en van bedrijfs-
en milieu-toxicologische problemen
– <i>Baars, Spierenburg, Over, Van Leeuwen.</i> |
| 13 | Paratuberculose – <i>Haagsma.</i> |
| 14 | Mycobacteriën w.o. <i>M. tuberculosis</i>
– <i>Haagsma</i> |
| 15 | Botulismus, o.a. bij watervogels
– <i>Haagsma, Over, Smit.</i> |
| 16 | Anaerobe infecties anders dan botulismus
– <i>Haagsma, Nabuurs.</i> |
| 17 | Differentiatie van streptococcen en staphylococcen
– <i>Vecht, Ter Laak.</i> |
| 18 | Algemeen bacteriologisch en taxonomisch onderzoek ten be-
hoeve van dierziekteproblemen
– <i>Ter Laak.</i> |

- 19 Mycoplasma-infecties
– *Ter Laak*.
- 20 Haemophilus-infecties varken
– *Kamp, Van Leengoed*.
- 21 Atrofische rhinitis bij het varken
– *Kamp, Kimman, Van Leengoed, Van der Heijden, Van Leeuwen*.
- 23 Colibacillosis bij biggen
– *Van Zijderveld, Nabuurs, Wirahadiredja*.
- 24 Diagnostiek, oorzaak en bestrijding van mastitis bij het rund
– *Vecht, Ter Laak, Kimman*.
- 26 Immuniteit mastitis
– *Vecht, Bianchi*.
- 27 Etiologie en transmissie van Wrang – Een praktijkgericht onderzoek
– *Vecht, Over*.
- 29 Mucosaal immuunsysteem van het varken
– *Bianchi*.
- 30 Brucellose
– *Bercovich, Haagsma, Ter Laak*.
- 31 Leptospirose
– *Bercovich, Bokhout*.
- 32 Onderzoek naar methoden voor (de verbetering van) de producten van adjuvantia en evaluatie van hun biologische activiteit
– *Bokhout, Van der Heijden, Nabuurs, Van Vugt*.
- 33 Onderzoek naar de inductie, regulatie en expressie van de mucosale immunrespons, gericht op preventie en genezing van dierziekten
– *Bokhout, Bianchi, Van der Heijden, Wirahadiredja*.
- 34 Onderzoek naar de invloed van adjuvans-toediening op de immunrespons, gericht op preventie en therapie van dierziekten
– *Bokhout, Bianchi, Van der Heijden, Wirahadiredja*.
- 35 Pathogenese van parasitaire infecties bij rund en schaap
– *Wetzlar, Borgsteede, Hendriks, Over*.
- 36 Systematisch epidemiologisch onderzoek m.b.t. helminthen
– *Over, Borgsteede, Hendriks*.
- 38 Effectiviteit van anthelmintica
– *Hendriks, Borgsteede, Over, Wetzlar*.
- 39 Resistentie tegen anthelmintica
– *Borgsteede*.
- 40 Entomologie
– *Over*.

- 41 Helminthen van beschermde zoogdieren
– Borgsteede.
- 42 Worminfecties bij paarden
– Borgsteede.
- 43 Psoroptesschurft bij het schaap
– Over, Smith.
- 44 Coccidiose
– De Leeuw (W.)
- 45 Produktie van mond- en klauwzeervaccins
– Barteling.
- 46 Onderzoek m.b.t. mond- en klauwzeervaccins en vaccincontrole
– Barteling, Terpstra.
- 47 Epidemiologisch onderzoek ten aanzien van mond- en klauwzeer
– Terpstra.
- 49 Varkenspest
– Terpstra, Pol, Wensvoort, Moormann
- 50 Virusinfecties bij varkens (inclusief varkensinfluenza)
– Terpstra, Van Oirschot, Pol.
- 51 Virusinfecties bij runderen
– Kimman, De Leeuw, Straver, Westenbrink.
- 52 Q-fever
– Houwers,
- 53 Virusinfecties bij paarden
– Van Oirschot, Pol, Gielkens.
- 54 Ziekte van Aujeszky; diagnostiek, epizoötiologie, vaccinatie
– Van Oirschot, Pol, Gielkens, Van Zaane, Vreeswijk.
- 55 Ontwikkeling van diagnostische technieken voor virale diarree bij varkens
– Terpstra, Van Nieuwstadt, Pol, Vreeswijk, Van Zaane.
- 57 Aviaire leukose
– De Boer, Van Vloten, Pol, Koch.
- 58 Ziekte van Marek
– De Boer, Van Vloten, Gielkens, Pol, Koch.
- 59 Enzoötische leukose bij het rund
– De Boer, Koch.
- 60 Infectieuze bronchitis
– De Boer, Van Vloten, Vreeswijk, Pol, Gielkens, Koch.

- 61 Mucosaal immuunsysteem van de kip
 - Koch.
- 62 Lokale immuniteit
 - *Van Zaane, Van Oirschot, Pol, De Leeuw.*
- 65 Zwoegerziekte
 - *Houwers, Van der Molen, Vecht.*
- 66 Chlamydia-infecties bij het rund
 - *Houwers, Van der Molen.*
- 67 Aleutian disease
 - Bokhout, Haagsma, De Leeuw, Westenbrink, Kimman.
- 68 Rabiesdiagnostiek
 - *Haagsma, Ter Laak.*
- 69 Porcine parvovirusinfecties
 - *De Leeuw, Van Leengoed.*
- 70 Bovine virus diarree
 - *De Leeuw, Terpstra, Straver, Westenbrink.*
- 71 Productie van virologische diagnostica en begeleiding van het gebruik
 - *De Leeuw, Straver, Westenbrink, De Boer.*
- 74 Onderzoek in verband met verbetering van bestaande en ontwikkeling van nieuwe biologische producten (verbetering producten)
 - *Van Vugt, Haagsma e.a.*
- 75 Bereiding van veterinaire biologische preparaten
 - *Van Vugt, Haagsma.*
- 76 Ontwikkelingsonderzoek ten behoeve van de kwaliteitscontrole van CDI-producten
 - *Van Vugt, Oei.*
- 77 Routinematige kwaliteitscontrole van CDI-producten en van proefdieren.
 - *Van Vugt, De Vrey.*
- 79 Productie van SPF, MDF en kiemvrij proefdiermateriaal
 - *De Vrey.*
- 81 Rijkskwaliteitscontrole van veterinair immunobiologische producten
 - *Lensing, Oei.*
- 82 Ontwikkelings- en standaardisatieonderzoek t.b.v. de rijkskwaliteitscontrole van veterinair immunobiologische producten
 - *Lensing, Oei.*

- 83 Rijkskwaliteitscontrole en ontwikkelings- en standaardisatie-
onderzoek van ontsmettingsmiddelen voor veterinaire gebruik
 – *Lensing, Oei.*
- 84 Rijkskwaliteitscontrole van veterinaire farmaceutische producten
 – *Lensing, Jager.*
- 85 Rijkskwaliteitscontrole van insecticiden voor veterinaire gebruik
 – *Lensing, Hendriks, Jager.*
- 86 Onderzoek van het mechanisme waarmee soya-pepton diarree
bij biggen induceert
 – *Jager, Nabuurs, Lensing.*

- 87 Diagnostiek van ziekten bij runderen t.b.v. de praktijk.
- 88 Diagnostiek van ziekten bij varkens t.b.v. de praktijk.
- 89 Diagnostiek van ziekten bij kleine herkauwers t.b.v. de praktijk.
- 90 Diagnostiek van ziekten bij pluimvee t.b.v. de praktijk
 – *Koch, De Boer, Moormann, Smit.*
- 92 Diagnostiek van ziekten bij overige dieren t.b.v. de praktijk.
- 93 Onderzoek t.a.v. im- en export van vee.
- 94 Onderzoek gericht op de ontwikkeling van laboratorium-
technieken
 – *Vreeswijk.*
- 95 Participatie in projecten van andere instituten.
- 96 Onderzoek, niet verantwoord in andere projecten.

- 98 Samenwerkingsproject Pakistan
 – *Boel, e.a.*
- 99 Diversen ontwikkelingssamenwerking
 – *Boel, e.a.*

- 100 Synthetische peptiden vaccins.
 – *Meloen.*

De volgende projecten zijn afgesloten:

- 01 Invloed voeding zeug op splayleg
 – *Nabuurs, Van der Molen.*
- 04 Mastitis bij het schaap
 – *Schreuder, Vecht.*
- 22 Aviaire pasteurellose
 – *Kamp, Van Vugt.*
- 52 Virusinfecties bij schapen (andere dan zwoegerziekte)
 – *Houwers, Terpstra.*

- 64 Onderzoek m.b.t. BHV₁
 - De Leeuw, Straver.
- 91 Diagnostiek van ziekten bij pelsdieren t.b.v. de praktijk
 - *Kimman*, e.a.
- 37 Ascarisinfecties bij runderen
 - Borgsteede.

Produktenlijst

I. Sera

Miltvuurserum voor herkauwer, varken.

II. Vaccins

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

MKZ-vaccin voor varken, monovalent type O en C (op verzoek).

Miltvuurvaccin voor paard, herkauwer, varken.

Pseudomonas aeruginosa-vaccin voor nertsen.

Paratuberculose-vaccin.

III. Sensitinen

Bovine tuberculine PPD (5000 TU per 0,1 ml).

Bovine tuberculine PPD (2000 TU per 0,1 ml).

Aviaire tuberculine PPD (2000 TU per 0,1 ml).

Johnine PPD (1,5 mg per ml).

Malleine PPD (1,0 mg per ml).

IV. Voor laboratoriumtoepassing:

a) Antigenen

Brucella abortus ringtest-antigeen.

Brucella abortus langzaam antigeen.

Brucella abortus snel antigeen.

Campylobacter fetus-antigeen.

Salmonella typhimurium en *S. dublin* H-antigeen.

Leptospira *gaidae* (*L. tarassovi*)-antigeen.

Fasciola hepatica-antigeen.

Parvovirus-antigeen.

b) Ingrediënten voor complementbindingsreacties

Brucella abortus CBR-antigeen.

Para-t.b.c.-antigeen.

Vlekziekte-antigeen.

Positief en negatief controleserum voor *Brucella abortus* c.q. para-t.b.c.

Cavia-complement.

Haemolytische amboceptor.

Schapebloed in Alseveroplossing.

Veronalbuffer.

c) *Conjugaten en sera voor diagnostiek.*

FITC anti PPV-conjugaat voor IFT.

FITC anti IBRV-conjugaat voor IFT.

FITC anti BRSV-conjugaat voor IFT.

FITC anti Aujeszky V-conjugaat voor IFT.

FITC anti TGEV-conjugaat voor IFT.

FITC anti PI₃V-conjugaat voor IFT.

Anti BVDV-serum varken voor IIFT.

Standaard anti IBRV-serum, rund (SN-test).

Standaard anti Aujeszky V-serum, varken (SN-test).

Standaard anti PPV-serum, varken (HI-test).

Standaard negatief varkensserum (diverse testen).

Standaard anti PI₃V-serum, rund (HI-test).

Standaard anti BRSV-serum, rund (ELISA).

Standaard negatief runderserum (diverse testen).

Standaard anti BVDV-serum, rund (ELISA).

Standaard anti Influenza H₁ N₁-serum, varken (HI-test).

Standaard anti Influenza H₃ N₂-serum, varken (HI-test).

Testserum dysenterie (Doyle) voor IFT.

Runderplasma voor clumpingtest.

d) *ELISA-componenten.*

BRS-ELISA antilichaam-gecoate plaat.

BRS-ELISA controle-antigeen.

BRS-ELISA BRSV-antigeen.

BVD-ELISA antilichaam-gecoate plaat.

BVD-ELISA BVDV-antigeen.

BVD-ELISA HRPO-conjugaat.

Paardeserum, onderdeel ELISA-buffers.

e) *Diversen.*

Gedefibrineerd runderbloed.

Geïnactiveerd normaal runderserum .

Rundererythrocyten met kristalviolet (voor H.E.T.-medium).

Staphylococci bèta-toxine (voor 1 liter H.E.T.-medium).

PPV-antigeen voor HI-test.

Spoelapparaat voor ELISA.

IBR-glaasjes voor IFT.

PI₃V-antigeen voor HI-test.