619:636.2:616.988.43:576.8.097

CENTRAAL DIERGENEESKUNDIG INSTITUUT,
AFDELING AMSTERDAM

NEUTRALISERENDE ANTISTOFFEN IN SERA VAN TEGEN MOND- EN KLAUWZEER GEVACCINEERDE RUNDEREN

WITH A SUMMARY

NEUTRALIZING ANTIBODIES IN SERA OF CATTLE VACCINATED AGAINST FOOT-AND-MOUTH DISEASE

J. G. VAN BEKKUM

CENTRUM VOOR
LANDBOUWPUBLIKATIES pudoc LANDBOUWDOCUMENTATIE

VERSL. LANDBOUWK. ONDERZ. No. 65.8 — WAGENINGEN — 1959

1982018

INHOUD

Blz.

INLEIDING 1

I. DE ANTILICHAMEN TEGEN MOND- EN KLAUWZEERVIRUS 3

II. DE REACTIE TUSSEN VIRUS EN NEUTRALISERENDE ANTILICHAMEN . 22

III. DE TECHNIEK 37

1. Inleiding 37
2. Eigen methode 40
   a. De apparatuur 40
   b. Het kweekmedium 41
   c. Het weefsel 42
   d. Het virus 43
   e. De sera 45
   f. De complementbindingsreactie 45
   g. De controles 48

3. Onderzoek ter verbetering van de techniek 48
   a. De betekenis van het verdunningsinterval voor de nauwkeurigheid van de smetstoftitratie 48
   b. De invloed van inactiveren van het serum op het neutralisatievermogen 53
   c. De betekenis van de incubatie van het serum-virusmengsel 56
   d. De invloed van verdunning op tevoren geïncubeerde smetstof-serummengsels 62
   e. Vergelijking van een proefopstelling met constante serumconcentratie met een met constante virushoeveelheid . . 68
   f. Onderzoek naar factoren welke de uitslag van de in de cultuurtjes uitgevoerde complementbindingsreactie zouden kunnen beïnvloeden 75
   g. De betrouwbaarheid van de neutralisatieproef 84
   Bespreking 102

IV. ENKELE PRAKTISCHE TOEPASSINGEN VAN DE NEUTRALISATIEREACTIE

1. Inleiding 105
2. Het verloop van de serumtiter bij gevaccineerde volwassen runderen 106
   Proef 1. Het titerverloop na injectie van verschillende doses vaccin en na revaccinatie 106

De auteur promoveerde op 18 juni 1959 aan de Rijksuniversiteit te Utrecht op een gelijkluidend proefschrift tot Doctor in de Dierengeneeskunde.

Proef 2. De invloed van de hoeveelheid aluminiumhydroxyde 110
3. De vaccinatie van jonge runderen 112
Proef 3. De vaccinatie van Nederlandse kalveren van verschillende leeftijden 113
Proef 4. De antistoffen bij niet-gevaccineerde Nederlandse kalveren 119
Proef 5. De vaccinatie van Ierse kalveren van verschillende leeftijden 124
Proef 6. Een onderzoek naar de leeftijd waarop Nederlandse kalveren met succes geënt kunnen worden 128
4. De distributie van neutraliserende antistoffen bij de Nederlandse rundveestapel 131
Proef 7. De serumtiter bij volwassen dieren van verschillende herkomst 131
Proef 8. De invloed van infectie op de serumtiter van met monovalent vaccin geënte dieren 135
Proef 9. De invloed van infectie op de serumtiter van met trivalent vaccin geënte dieren 137
Proef 10. De invloed van revaccinatie met monovalente entstof op de serumtiter van trivalent geënte runderen . . 139
Proef 11. De antistoffen tegen de drie virustypen 139
Bespreking 139
5. Serumtiter en immuniteit 142
Proef 12. De resistentie van runderen met uiteenlopende antistoftiters tegen besmetting door inwrijven van virus in de mondholte 147
Proef 13. Serumtiter en weerstand tegen smetstoftoediening door intradermolinguale injectie van een onbekende virusdosis 148
Proef 14. Serumtiter en weerstand tegen smetstoftoediening door intradermolinguale injectie van een bekende virusdosis 151
Bespreking 152

SAMENVATTING 156

SUMMARY 160

ZUSAMMENFASSUNG 163

RÉSUMÉ 167

LITERATUUR 171

INLEIDING

De mond- en klauwzeerbestrijding in Nederland is hoofdzakelijk gebaseerd op jaarlijkse vaccinatie van de rundveestapel tegen de drie in Europa vastgestelde virustypen.

De hier te lande toegepaste entstoffen worden, volgens de door FRENKEL ontwikkelde methode, bereid uit in overlevend tongepitheel gekweekt virus. De smetstof wordt volgens de door WALDMANN beschreven principes na adsorptie aan aluminiumhydroxyde door behandeling met verdunde formaldehyde bij 25° C onschadelijk gemaakt.

Controle van de werkzaamheid van deze vaccins geschiedt in speciaal voor dat doel geïmporteerde gevoelige runderen. Twee weken na vaccinatie worden de dieren aan een kunstmatige infectie blootgesteld. Hierbij wordt een bekende hoeveelheid virulente smetstof in het tongslijmvlies geïnjicieerd of wordt het mondslijmvlies ingewreven met een in een virussuspensie gedrenkte lap. Gevaccineerde runderen dienen resistent te zijn tegen deze infectie. Wanneer het virus in de tong is ingespoten wordt de ontwikkeling van beperkte tonglaesies op de injectieplaats in de regel niet als teken van onvoldoende weerstand opgevat.

De thans gebruikte techniek bevredigt niet, daar de met betrekking tot de immunisatietoestand verkregen informaties onvolledig zijn en de methode kostbaar is.

Waardering van de door vaccinatie opgewekte immuniteit is thans slechts tot op zekere hoogte mogelijk. Wanneer de infectie afwijkingen doet ontstaan, kan uit de uitbreiding en distributie daarvan een indruk over de grootte van het weerstandsvermogen verkregen worden. Men kan echter geen verschillen in resistentie vaststellen bij die dieren, welke na infectie geen veranderingen vertonen. Het volgen van het immuniteitsverloop bij een bepaald individu is uitgesloten, daar de besmetting de immuuntoestand van het dier geheel verandert.

In de humane geneeskunde, waar kunstmatige infectie in de regel niet verantwoord is, worden serologische methoden algemeen gebruikt voor het verkrijgen van gegevens over de immunisatietoestand van individuen of populaties. In een aantal gevallen bleek een duidelijke parallel te bestaan tussen de gevonden antistofconcentraties en de later bij infectie waargenomen resistentiegraad. Bij verschillende dierziekten is een overeenkomstige situatie aangetroffen, maar hoewel MINETT reeds in 1927 schreef: "In foot-and-mouth disease the immune state is essentially due to antibodies", is juist aan het kwantitatief onderzoek der afweerstoffen en hun betekenis voor de resistentie tegen het virus, betrekkelijk weinig aandacht besteed.

Tot dusver waren de complementbindingsreactie en de serumneutralisatie- en protectieproeven de enige serologische methoden welke voor een enigszins

algemene toepassing bij het mond- en klauwzeeronderzoek in aanmerking kwamen.

Van eerstgenoemde reactie is evenwel eerst onlangs een modificatie uitgewerkt, welke de mogelijkheid tot routine-onderzoek van rundersera schijnt te bieden, terwijl aan de meeste methoden welke ter beschikking stonden voor het bepalen van de virusneutraliserende antilichamen dusdanige bezwaren verbonden waren, dat hun praktische bruikbaarheid slechts beperkt was.

Doel van de hier beschreven, aan het Staats Veeartsenijkundig Onderzoekingsinstituut verrichte studie, was het ontwikkelen van een eenvoudige serumneutralisatieproef, welke geschikt zou zijn voor gebruik op ruime schaal. Met de gevonden methodiek werden vervolgens enkele met de vaccinatie samenhangende problemen nader bestudeerd.

I. DE ANTILICHAMEN TEGEN MOND- EN KLAUWZEERVIRUS

(LITERATUUROVERZICHT)

Reeds in een vroeg stadium van de ontwikkeling van de bacteriologie als wetenschap, en spoedig na het verwerven van het inzicht in de betekenis van bepaalde microörganismen voor de etiologie van infectieziekten, werd het voorkomen van specifieke afweerstoffen in de sera van geïmmuniseerde individuen vastgesteld. Het onderzoek van deze materie heeft sindsdien een grote vlucht genomen, en de vorderingen, die hierbij ook op het gebied van de virusziekten werden gemaakt, hebben in belangrijke mate bijgedragen tot een beter begrip van epidemiologie en pathogenese en tot het perfectioneren van de profylactische maatregelen.

Enkele maanden nadat STERNBERG (1892) zijn waarneming had gepubliceerd, dat serum van een tegen vacciniavirus geïmmuniseerd kalf in staat was in vitro de infectiositeit van deze smetstof te doen afnemen, vermeldden LOEFFLER en FROSCH (1898) dergelijke observaties met betrekking tot mond- en klauwzeersmetstof.

Hiermede was de aanwezigheid van specifieke, tegen de infectie gerichte, antistoffen in de circulatie van herstelde dieren aangetoond. In de loop der jaren is duidelijk geworden, dat zowel bij mond- en klauwzeer als bij andere virusziekten, ten tijde van de infectie aanwezige afweerstoffen van doorslaggevende betekenis kunnen zijn voor de weerstand tegen de ziekte. Daarnaast nemen enkele auteurs ook het bestaan aan van een lokale immuniteit, die niet op een humorale basis zou berusten (WALDMANN en PAPE, 1920, 1921; OLITSKY, TRAUM en SCHOENING 1928; VARENNE, 1957).

Het voorkomen van immuunstoffen tegen mond- en klauwzeervirus is vooral voor profylactische toepassing benut. Meestal werd door intraveneuze injectie van virulente blaarinhoud bij runderen, die van de infectie waren hersteld, hyperimmuunserum bereid.

Over de bepaling van het gehalte aan antistoffen van dergelijke sera is een uitgebreide literatuur verschenen.

LOEFFLER en zijn medewerkers (LOEFFLER en FROSCH, 1898; LOEFFLER en UHLENHUTH, 1900) formuleerden reeds eisen waaraan de sera dienden te voldoen om geschikt te zijn voor gebruik in de praktijk. De entstoffen werden onderzocht in runderen of varkens. Deze proefdieren werden in de regel ingespoten met verschillende hoeveelheden serum en vervolgens intraveneus geïnfecteerd. LOEFFLER en UHLENHUTH (1900) gebruikten naast deze protectieproef ook een virusneutralisatieproef, waarbij blaarinhoud samen met serum in verschillende concentraties bij biggen werd geïnjicieerd.

Na het vaststellen van de gevoeligheid van de cavia voor het virus door WALDMANN en PAPE (1920, 1921) is door talrijke onderzoekers getracht met

behulp van dit proefdier op meer eenvoudige wijze tot een standaardisatie van de immuunsera te komen. (Men zie o.a. WALDMANN en TRAUTWEIN, 1921, 1928).

WALDMANN en zijn medewerkers (1928) ontwikkelden een zg. protectieproef, waarbij telkens groepjes van drie caviae subcutaan werden ingespoten met verschillende serumdoses. De dieren werden dan korte tijd later besmet door inwrijven van virus in scarificaties van de plantaire huid. De voor de infectie gebruikte smetstof moest zowel bij de met serum behandelde, als bij de onbehandelde caviae, binnen 24 uur blaarvorming veroorzaken op de gescarificeerde plaatsen. Althans een deel van de met serum ingespoten proefdieren moest tegen generalisatie beschermd worden. Onder de serumtiter verstond men dan de dosis, die nog in staat was alle drie caviae te beschermen tegen generalisatie. Slechts indien het gewenste effect bereikt werd wanneer 0,4 ml of minder werd ingespoten, achtte WALDMANN de resultaten voldoende en werd een dergelijk serum vrijgegeven voor gebruik in de praktijk.

KRAUS (1925) injicieerde caviae intracutaan in de achterpoten een uur na injectie van het serum. Hij kon vaststellen, dat indien het virus intraperitoneaal werd toegediend, een kleinere hoeveelheid antistoffen voldoende was om de ontwikkeling van laesies te voorkomen.

ERNST (1921) en ook RENNER (1925) gaven de voorkeur aan jonge caviae boven volwassen dieren, aangezien daarmede regelmatiger uitkomsten verkregen werden. Deze mening werd die niet door PFAB (1927) gedeeld. ERNST constateerde, dat het mond- en klauwzeervirus na enkele passages in deze dieren jonge caviae en ook jonge katten doodde. Dit heeft evenwel niet tot praktische toepassing geleid. Eerst 30 jaar later werd deze methode met succes verder ontwikkeld door SKINNER (1951).

GINS en FORTNER (1925) stelden vast, dat onverdund serum van reconvalescente konijnen en caviae, indien gemengd met het virus, door middel van huidscarificatie geïnfecteerde caviae beschermde, een eigenschap welke normaal serum miste. Zij deden geen pogingen deze waarneming tot een kwantitatieve methode te ontwikkelen.

OLITSKY, TRAUM en SCHOENING (1928) gebruikten de door WALDMANN beschreven techniek, zij het in enigszins gewijzigde vorm.

MINETT (1927) paste twee verschillende proefopstellingen toe voor het onderzoek van sera met behulp van caviae.

In een neutralisatieproef mengde hij het serum met een gelijke hoeveelheid van verschillende virusverdunningen. Na een verblijf van een half uur bij kamertemperatuur werden de mengsels intraplantair bij caviae geïnjicieerd. Ter controle werden enkele virusverdunningen op gelijke wijze behandeld met normaal serum, terwijl bovendien nagegaan werd welke verdunning van het virus de m.i.d., de *minimal infective dose*, bevatte. MINETT kon vaststellen, dat de tijd gedurende welke serum en virus in contact werden gelaten, niet zeer belangrijk was. Serum van reconvalescente caviae bleek de infectiositeit van een virusfiltraat, dat aanvankelijk in een verdunning van 1/500 000 in-

fectieus was gebleken, zo ver te doen afnemen, dat 10- tot 100-maal grotere hoeveelheden nodig werden om de ziekte op te wekken. Normaal serum had slechts zelden een waarneembaar effect. Sera van enkele hyperimmune kalveren hadden een nog enigszins sterker neutraliserend vermogen dan de caviasera. Het vaststellen van de m.i.d. van virus en serum-virusmengsels, d.w.z. in het algemeen het aantonen van kleine hoeveelheden smetstof, bleek een probleem. De uitkomsten waren dikwijls niet regelmatig, wat een gevolg was van de gebruikte techniek, en wel vooral van het beperkte aantal proefdieren dat in elk experiment gebruikt kon worden.

Wanneer het virus in plaats van intracutaan, intraperitoneaal of subcutaan werd toegediend, waren de uitkomsten niet duidelijk beter.

De tweede door MINETT toegepaste methode was een protectieproef, welke in hoofdzaak overeenkwam met de door WALDMANN gebruikte. Wanneer het virus intramusculair werd toegediend, werd het ontbreken van laesies als eindpunt genomen. Vooral indien rundersera werden onderzocht leverde deze werkwijze onregelmatige uitkomsten. Werd het virus intracutaan in de achterpootjes ingespoten en het uitblijven van generalisatie als bewijs van voldoende protectie opgevat, dan waren de uitkomsten meer bevredigend. Intracutane virusinjectie bleek meer regelmatige proefuitkomsten te geven dan scarificatie, terwijl verder de gebruikte virusconcentratie enige invloed had. Moeilijkheden werden hierdoor evenwel niet veroorzaakt, wanneer een zodanige virushoeveelheid werd gebruikt, dat de primaire blaar zich binnen 24 uur ontwikkelde. De meest bevredigende resultaten werden verkregen wanneer slechts één achterpootje werd geïnjicieerd en twee steekkanalen werden aangebracht. Het verdiende aanbeveling niet minder dan drie dieren per serumverdunning te gebruiken.

MINETT concludeert, dat de protectieproef weliswaar niet zeer nauwkeurig is, maar voor praktische doeleinden als bevredigend kan worden beschouwd. Het is van belang gezonde caviae van vierhonderd tot vijfhonderd gram, een voldoend grote virusdosis (b.v. 1000 m.i.d.) en een constante enttechniek te gebruiken. De moeilijkheden welke zich voordoen bij de virustitratie wegen volgens MINETT bij de protectieproef minder zwaar dan bij de neutralisatieproef.

BEDSON, MAITLAND en BURBURY (1927), die ongeveer tegelijkertijd met MINETT het probleem van de bepaling van antilichamen in serum onderzochten, legden vooral de nadruk op de kwantitatieve aspecten van het onderzoek.

Bij de protectieproef konden zij vaststellen, dat caviae moeilijker tegen intracutaan toegediende smetstof waren te beschermen, dan tegen intramusculair of intraperitoneaal geïnjicieerd virus. Voor het doen aanslaan van de primaire infectie bleek bij met serum voorbehandelde dieren een grotere hoeveelheid virus nodig dan bij de controlegroep. Ook door deze onderzoekers werden evenwel onregelmatige proefuitkomsten waargenomen; zij merken naar aanleiding hiervan op: "It seems probable, that irregularity in

the amount of virus which escapes into the circulation from the primary lesions is a cause of the uncertain results". Ook bij toediening van het virus met behulp van intraperitoneale of intramusculaire injectie werden geen constante uitkomsten verkregen.

Bij gebruik van een neutralisatieproef, eveneens in caviae, kregen BEDSON en zijn medewerkers meer bevredigende resultaten. Serum werd gemengd met een gelijke hoeveelheid van verschillende virusverdunningen, het mengsel werd vervolgens 20 tot 30 minuten bij kamertemperatuur bewaard en daarna intraplantair ingespoten. Verlenging van incubatietijd van het serum-virusmengsel of incubatie bij hogere temperatuur bleken de uitkomst van de proef niet te beïnvloeden. Het was gewenst een virussuspensie te gebruiken, die niet ten gevolge van bewaren in infectiositeit achteruit was gegaan, aangezien dan namelijk een te laag neutraliserend vermogen van het serum werd gevonden. Het virus was ongeveer een week houdbaar bij koelkasttemperatuur. De proef werd zo uitgevoerd, dat onverdund serum werd onderzocht t.o.v. 2, 4, 8, 16 enz. m.i.d., waarbij deze waarde voor de gebruikte virussuspensie tevoren was bepaald. De waarde van het serum werd uitgedrukt in het aantal geneutraliseerde m.i.d.

Sera van reconvalescente caviae, verkregen drie tot vier en twaalf tot achttien weken na infectie, werden vergeleken. Tussen de beide groepen dieren bestond niet veel verschil, de meeste sera inactiveerden tussen 25 en 125 m.i.d. Het neutraliserend vermogen van sera van een aantal caviae, welke na vaccinatie door middel van injecties met virulent materiaal waren gehyperimmuniseerd, lag eveneens tussen 25 en 125 m.i.d. Deze dieren bleken volkomen resistent tegen intraplantaire injectie van 8 000—40 000 m.i.d.

BEDSON en zijn medewerkers concludeerden dat de uitkomsten, verkregen met behulp van de neutralisatieproef, duidelijker en beter reproduceerbaar zijn dan die verkregen met de protectieproef. De mogelijkheid de gebruikte serum- en virusdoses te variëren, alsmede het kunnen uitvoeren van de neutralisatie onder gecontroleerde omstandigheden, achten zij verdere voordelen van deze werkwijze.

In sera van slechts éénmaal gevaccineerde, en ook van gerevaccineerde caviae, werden door MAITLAND en BURBURY (1928) slechts minieme hoeveelheden antistoffen aangetroffen, hoewel enkele van de met entstof behandelde dieren wel resistent bleken bij proefinfectie.

GIBBS (1931) kon caviae wel passief beschermen door injectie van relatief grote doses serum van gevaccineerde soortgenoten.

In de inleiding van zijn in 1949 gepubliceerde studie "The antibodies in foot-and-mouth disease", constateert BROOKSBY, dat de moeilijkheden van vroegere onderzoekers voor een groot deel veroorzaakt werden door het ontbreken van een goede methode om het virus te titreren. In dit opzicht bleek de vervanging van de m.i.d. door een 50%-titratie-eindpunt een belangrijke stap voorwaarts.

In het algemeen bestaat er een sigmoid verband tussen het percentage proefdieren, dat positief reageert na injectie van een bepaald preparaat, en de toegediende dosis. In een grafiek nadert een dergelijke kromme de 0%- en 100%-lijnen asymptotisch, zodat het onmogelijk is nauwkeurig die dosis te bepalen, welke juist alle ermee behandelde proefdieren zou infecteren. Het aantal beschikbare dieren zal op de uitslag van een dergelijke titratie een belangrijke invloed hebben.

Een 50%-eindpunt, d.w.z. die dosis, welke bij de helft van het ermee geïnfecteerde aantal proefdieren een positieve uitslag zou geven, is ten gevolge van de ligging van dit punt op het steilste gedeelte van de zg. *dose-response*-curve, nauwkeuriger te bepalen dan de m.i.d. Het is minder afhankelijk van het aantal gebruikte dieren en minder gevoelig voor individuele variaties in hun weerstand.

Voor de schatting van het 50%-eindpunt uit de reactiepercentages verkregen met verschillende doses van het onderzochte materiaal, staan meerdere methoden ter beschikking. Die welke REED en MUENCH in 1938 publiceerden is wel een van de meest toegepaste. Deze berekeningswijze werd oorspronkelijk ontwikkeld voor de bepaling van de beschermende dosis van vaccins en gaat uit van de veronderstelling, dat dieren, die door een bepaalde dosis beschermd worden tegen een zekere proefinfectie, ook geïmmuniseerd zouden zijn door een grotere hoeveelheid van dezelfde entstof.

Bij een titratie speelt, naast een dergelijke variatie in gevoeligheid, ook de toevallige verdeling van de infectieuze eenheden over de proefmonsters een rol bij de bepaling van de uitkomst van het experiment. Bij de door REED en MUENCH toegepaste wijze van berekening wordt daaraan evenwel geen aandacht besteed.

Voor een deel van zijn studie maakte BROOKSBY gebruik van caviae, waarbij, op grond van de reeds door MINETT (1927) aangevoerde argumenten, een protectieproef werd gebruikt. De proefdieren waren uniform van gewicht, afstamming en geslacht. Het serum werd subcutaan geïnjicieerd, terwijl het virus, in de vorm van gefiltreerde en met glycerol en fosfaatbuffer van pH 7,6 verdunde caviablaarinhoud, intracutaan in de zool van een van de achterpootjes werd ingespoten. In de regel werden hoeveelheden van 1000 tot 10 000 m.i.d. gebruikt. BROOKSBY gaf er de voorkeur aan meerdere steekkanalen aan te brengen, aangezien deze werkwijze de kans op moeilijkheden bij gebruik van minder goed aan caviae geadapteerde virusstammen verlaagde.

Vroegere onderzoekers drukten de serumactiviteit meestal uit in m.p.d., de *minimal protective dose*, d.i. die hoeveelheid serum die nog juist voldoende was om alle proefdieren te beschermen. Deze dosis is niet nauwkeurig te bepalen.

MINETT poogde hier verbetering in te brengen door de graad van generalisatie kwantitatief uit te drukken, nl. als partieel of totaal, waarna dan die serumdosis werd berekend, die 90% bescherming gaf. Dezelfde auteur heeft ook voorgesteld gebruik te maken van de tijd verlopend tussen de infectie en het optreden van generalisatieverschijnselen voor het waarderen van de

graad van protectie. Hij meende een cavia waarbij zich wel een blaar op de entplaats ontwikkelde, doch die niet binnen vier dagen generalisatieverschijnselen vertoonde, als partieel immuun te moeten beschouwen.

BROOKSBY onderzocht de bruikbaarheid van deze methoden, waarbij hij echter enkele modificaties invoerde.

Om de uitbreiding van de generalisatie tot uitdrukking te brengen gebruikte hij een werkwijze overeenkomend met de door HORSFALL (1939) bij het influenza-onderzoek ingevoerde *lesion score*-methode. Afhankelijk van hun uitbreiding werden de secundaire laesies gewaardeerd met 1, 1½, 2, 2½ of 3. Of de veranderingen gelokaliseerd waren aan de achterpoot, een van beide voorpootjes of de tong, werd niet van betekenis geacht. De dieren werden acht dagen in observatie gehouden, waarna per cavia een totaal werd gekregen door optelling van de waarden toegekend aan de op verschillende praedilectieplaatsen ontstane laesies. Er werden in de regel vier dieren per serumverdunning gebruikt. Door de waarden verkregen voor verschillende tot een groep behorende dieren bij elkaar te tellen, werd een indruk verkregen van de protectiegraad, verleend door elk van de onderzochte serumhoeveelheden. Met behulp van deze cijfers kon ten slotte die dosis serum berekend worden, welke 50% bescherming gegeven zou hebben, waarbij het totaal van de niet met serum behandelde controlegroep beschouwd werd als de hoogst bereikbare score.

Op deze wijze werden goed reproduceerbare uitkomsten verkregen. Teneinde tot een schatting van de betrouwbaarheid der gevonden resultaten te komen, indien voor de sera een verdunningsfactor 2 werd gebruikt, voerde BROOKSBY een variantie-analyse uit, waartoe hij de caviae, gebruikt in een twintigtal experimenten met één virusstam, over twee groepen verdeelde. Werd de serumverdunning logaritmisch aangegeven, dan werd een standaarddeviatie gevonden van $\pm$ 0,1095. Een tussen twee sera gevonden verschil mocht dus als significant worden beschouwd, indien de eindpunten tenminste 0,22 verschilden volgens de logaritmische verdunningsschaal. BROOKSBY wijst erop, dat het gebruik van een gelijke waardering voor generalisatie-afwijkingen, gelokaliseerd op verschillende praedilectieplaatsen, geheel willekeurig is. De mogelijkheid bestaat, dat de affiniteit van het virus voor onderscheidene huidgedeelten van stam tot stam uiteenloopt.

De resultaten verkregen met de *lesion score*-methode, werden vergeleken met die gevonden met een techniek, waarbij de resistentie werd gemeten met behulp van de tijd verlopen tussen injectie en het optreden der generalisatieverschijnselen. Een waarde 3 werd toegekend aan die caviae, waarbij de generalisatie compleet was in minder dan vier dagen. Indien binnen dezelfde tijd wel generalisatie optrad, doch deze niet totaal was, werd een waarde 2 gegeven, terwijl dieren die de eerste generalisatieverschijnselen vertoonden na meer dan vier dagen met 1 en resistente dieren met 0 werden gewaardeerd. Ook bij deze methode werd een groepstotaal berekend.

De met beide werkwijzen verkregen resultaten vertoonden een duidelijk

positieve correlatie (r = 0,91). BROOKSBY prefereert de eerste, omdat hij verwacht, dat deze minder dan de *time score*-methode, beïnvloed zal worden door de graad van aanpassing van de gebruikte virusstam aan de cavia.

Aangaande de bruikbaarheid van deze diersoort wordt verder door BROOKSBY geconcludeerd, dat de uitkomsten die van MINETT bevestigen. In verband met de zeer ongelijke reactie van verschillende caviae, moeten er ten minste vier per serumverdunning gebruikt worden. Bij toepassing op grotere schaal zal het aanbeveling verdienen ter vergelijking gebruik te maken van een standaardserum.

Een belangrijk nauwkeuriger kwantitatieve bepaling van de mond- en klauwzeervirusneutraliserende antistoffen bleek mogelijk door gebruik te maken van de door HENDERSON (1949) ontwikkelde titratiemethode in runderen. Hierbij worden meerdere virusverdunningen onderzocht door middel van een aantal intradermale injecties in de tong van een of meer gevoelige dieren. Er wordt daarbij uitgegaan van de veronderstelling dat, indien de ingespoten hoeveelheid vloeistof infectieuze smetstof bevat, zich op de injectieplaats een blaar zal ontwikkelen. De aflezing vindt plaats na 24 tot 30 uur. Deze dient in elk geval te geschieden voordat generalisatie optreedt. Eén proefdier kan gebruikt worden voor het onderzoek van een aantal virusverdunningen gelijktijdig. Door de Britse onderzoekers worden in de regel vier verschillende virusconcentraties gebruikt, die elk in vijf injecties onderzocht worden. Het gebruik van meer dan een rund voor een serie verdunningen verdient aanbeveling, aangezien daardoor de mogelijkheid geboden wordt, de verschillen, welke kunnen optreden ten gevolge van variatie in gevoeligheid van de individuele dieren, althans ten dele op te vangen. Er kan een 50%-eindpunt berekend worden, waarbij de virustiter meestal wordt uitgedrukt als het aantal ID_{50} per ml. Bij de neutralisatieproef worden een aantal serum-virusmengsels ingespoten.

Er zijn twee methoden om het neutraliserend vermogen van sera te vergelijken. Bij de ene wordt die hoeveelheid virus bepaald, welke door een zekere constante serumconcentratie geneutraliseerd kan worden, terwijl bij de andere gemeten wordt, hoeveel serum nodig is om een zeker aantal infectieuze eenheden te neutraliseren. Uitkomsten verkregen volgens de ene, zijn niet te vergelijken met die gevonden met de andere proefopstelling zonder een uitgebreid onderzoek, dat zich dient uit te strekken over verschillende virus- en serumconcentraties. Bij gebruik van een constante virusdosis wordt nagegaan, welke de titer van de gebruikte virussuspensie was, eventueel in aanwezigheid van normaal serum, en welke smetstoftiter werd gevonden na inwerking van het te onderzoeken serum. De uitkomsten worden uitgedrukt in het aantal ID_{50} per ml virussuspensie, waarbij deze waarden dan logaritmisch worden aangegeven. Het verschil tussen beide titers is de neutralisatietiter van het serum. Indien b.v. virus alleen een titer van 10^7 had, en na inwerking van het serum 10^4 werd gevonden, is de titer van het serum 10^3.

De tweede werkwijze werd door BEDSON c.s. (1927) gebruikt. De eerste is o.a. toegepast bij het onderzoek van influenza en vaccinia-antisera.

In inleidende proeven vergeleek BROOKSBY (1949) de twee methoden, zonder dat hierbij een definitieve conclusie aangaande hun verschillende voor- en nadelen werd bereikt. Mede in verband met het doel van zijn onderzoek, dat ten dele betrekking had op het concentreren van antistoffen en hun voorkomen in verschillende serumfracties, meende BROOKSBY de methode waarbij sera vergeleken worden in hun activiteit ten opzichte van een constante virushoeveelheid, te moeten prefereren.

De waarneming van BEDSON, MAITLAND en BURBURY (1927), dat voor inactivering van een bepaald aantal infectieuze eenheden in een virussuspensie die enige tijd bewaard is, meer serum nodig is dan voor eenzelfde hoeveelheid smetstof in een vers bereid filtraat, kon daarbij bevestigd worden.

Sterke verdunning van een bijna neutraal virus-serummengsel leidt volgens BROOKSBY tot reactivering. In de proef die dit demonstreerde, bleek een bepaald serum-virusmengsel in vijf van de twintig injecties infectieus te zijn. Toen dezelfde suspensie honderd maal verdund werd, bleek dit nog het geval te zijn bij drie van de twintig met dit verdunde materiaal gegeven inoculaties. Werden zowel serum als virus eerst honderd maal verdund en vervolgens gemengd, dan waren zeven van de twintig infectieus. Deze twee laatste uitkomsten verschillen niet significant, hoewel het resultaat van de proef suggereert, dat de reactivering niet compleet was.

BROOKSBY besteedde speciaal aandacht aan het verband tussen de gebruikte virusconcentratie en de voor neutralisatie daarvan benodigde serumhoeveelheid. Hiertoe werden o.a. in een grafiek de in verschillende experimenten van een bepaald serum gebruikte verdunningen logaritmisch uitgezet tegen het percentage negatieve injecties verkregen bij gebruik van verschillende virusconcentraties. De aldus verkregen *dose-response*-krommen zijn weer sigmoid van vorm. Door toepassing van de door GADDUM (1933) en BLISS (1935) ontwikkelde *probit*-methode zijn dergelijke curven in rechten om te zetten. Deze lijnen bleken bij BROOKSBY's onderzoek voor verschillende sera evenwijdig te lopen, waarbij de beste schatting voor de helling 2,64 was. Het was zodoende mogelijk uit een enkel punt, gelegen tussen de reactiepercentages 25 en 75, de gehele lijn te voorspellen en dus die serumverdunning welke in 50% van de gevallen de gebruikte virusdosis geneutraliseerd zou hebben, te berekenen.

Voor een drietal sera werd het verband tussen de toegevoegde hoeveelheid virus en de serumverdunning, nodig om deze te neutraliseren, onderzocht. Werden beide grootheden logaritmisch uitgezet, dan bleek de best passende verbindingslijn tussen de drie punten die voor elk serum bekend waren een kromme te zijn. Bij verhoging van de virusdosis van 20 tot b.v. 200 ID_{50} verdubbelde de benodigde hoeveelheid serum. Naarmate grotere hoeveelheden smetstof werden gebruikt, werden de sera minder effectief en waren relatief hogere concentraties nodig voor inactivering.

De drie gevonden lijnen lopen vrijwel evenwijdig.

Het hier voor mond- en klauwzeervirus beschreven verband tussen smetstofhoeveelheid en voor neutralisatie daarvan nodige serumdosis, verschilt in sommige opzichten van dat wat door verschillende onderzoekers bij andere filtreerbare smetstoffen werd waargenomen. Wij zullen hierop bij een nadere bespreking van de virusneutralisatie nog terugkomen.

De reproduceerbaarheid van de uitkomst van de neutralisatieproef in runderen zou volgens BROOKSBY beïnvloed worden door de gebruikte virussuspensie, de temperatuur waarbij het serum-virusmengsel geïncubeerd wordt, alsmede door de contacttijd en de pH en samenstelling van de verdunningsvloeistof. Verder kunnen de proefdieren een belangrijke bron van variatie vormen.

Volgens HENDERSON (1949) bedraagt de standaardafwijking van de virustitratie bij gebruik van twee runderen $\pm$ 0,34 indien de titer logaritmisch wordt uitgedrukt. In feite is dit een schatting voor de boven genoemde variabiliteit van de proefdieren. Deze zal ook zijn invloed doen gelden bij de bepaling van neutraliserende antilichamen. Bij de door BROOKSBY gebruikte proefopstelling kan de virussuspensie op twee wijzen de proefuitslagen beïnvloeden. Ten eerste zal een foutieve uitkomst bij de voortitratie van de smetstof leiden tot het gebruik van een verkeerde virusdosis in de eigenlijke proef, welke op zijn beurt de gevonden serumtiter zal beïnvloeden. In de tweede plaats kan activiteitsverlies ten gevolge van bewaren een bron van fouten zijn. Beide moeilijkheden zijn ten dele te corrigeren door gebruik te maken van een controle-immuunserum. Daarnaast tracht BROOKSBY de tweede complicatie te ondervangen door smetstofsuspensies te gebruiken, die niet langer dan vier dagen bewaard zijn.

Variaties in de incubatietemperatuur van het serum-virusmengsel in het gebied tussen 12 en 20° C schijnen niet veel invloed op de neutralisatie te hebben, terwijl verder bevredigende resultaten worden verkregen bij pH-waarden tussen 7,2 en 8,0 en gebruik van Hartley-bouillon als verdunningsmiddel. Ook de lengte van de contacttijd van serum en virus schijnt niet van grote betekenis te zijn, indien voldoende aandacht aan het mengen wordt besteed.

Teneinde tot een zo goed mogelijk gebruik van de beschikbare runderen te komen, analyseerde BROOKSBY een aantal van zijn neutralisatieproeven nader. Zijn conclusie luidde, dat verdeling van het te onderzoeken materiaal over ten minste vier dieren de betrouwbaarheid van de uitkomsten in belangrijke mate verhoogt. Werden b.v. twee sera vergeleken met behulp van vier in plaats van twee dieren, terwijl vier verschillende serumverdunningen onderzocht werden, elk door middel van acht injecties, dan was in het eerste geval een verschil tussen beide serumverdunningseindpunten van 2,4-maal significant, in het tweede pas een van 4,5-maal.

BROOKSBY meent dat de resultaten verkregen in runderen betrouwbaarder zijn dan die gevonden met caviae.

Het bleek mogelijk in de gemengde sera van een aantal runderen 18 dagen

na vaccinatie antistoffen aan te tonen. Het materiaal, dat onderzocht werd tegenover 40 ID_{50}, had een 50%-eindpunt van 1/5. Bij de contactinfectie, die vier dagen later plaats vond, bleken slechts drie van de vier dieren resistent. Reconvalescentenserum geeft, indien eveneens onderzocht t.o.v. 40 ID_{50}, een eindpunt van 1/32 tot 1/64. Normaal serum is niet in staat een dergelijke virusdosis te neutraliseren. Bij gebruik van 300 ID_{50} gaven reconvalescenten- en hyperimmuunsera eindpunten van resp. 1/10 en 1/16.

Naar aanleiding van een mededeling van ANDREWS en medewerkers (1931), waarin aangegeven wordt, dat in serum van één van 51 herstelde runderen met behulp van de caviaprotectieproef nog na twintig maanden antistoffen konden worden aangetoond, werd ook een onderzoek ingesteld naar het persisteren van de neutraliserende immuunlichamen. Rundersera afgenomen vier en zestien maanden na doormaken van de infectie hadden titers van 1/20 en 1/6, indien zij onderzocht werden tegenover 5 ID_{50}. Bij gebruik van 100 ID_{50} werden waarden van 1/2,5 en 1/1,2 gevonden.

BROOKSBY, GALLOWAY en HENDERSON (1948) gebruikten de neutralisatieproef in runderen ook voor het vergelijken van virusstammen afkomstig van mond- en klauwzeergevallen in Mexico.

Een belangrijke verdienste van BROOKSBY's werk ligt in de toepassing van kwantitatieve methoden, die een schatting van de verkregen graad van nauwkeurigheid toestaan. Betekende dit op zichzelf reeds de mogelijkheid de protectieproef in caviae aanzienlijk gevoeliger te maken, de combinatie ervan met het gebruik van een gevoelig proefdier als het rund bracht ook het aantonen van zeer kleine hoeveelheden antilichamen binnen het bereik, terwijl tevens het onderzoek van niet aan caviae geadapteerde virusstammen mogelijk werd.

Dat de neutralisatieproef in runderen slechts een beperkte toepassing heeft gevonden is ten dele te wijten aan de kostbaarheid van het gebruikte proefdier. Daarnaast heeft de ontdekking van de gevoeligheid van ongespeende muizen voor het mond- en klauwzeervirus de weg geopend tot een aanzienlijk eenvoudiger techniek.

In 1951 stelde SKINNER vast, dat drie tot tien dagen oude muizen, één tot vier dagen na intraperitoneale injectie van de smetstof onder verschijnselen van een voortschrijdende paralysis stierven. Mortaliteit na kunstmatige infectie met mond- en klauwzeervirus was reeds eerder waargenomen bij jonge katten, honden en caviae, zonder dat dit echter tot een praktische toepassing geleid had (ERNST, 1921; STOCKMANN en MINETT, 1927).

De incubatietijd van de ziekte bij muizen is, behalve van de gebruikte virusstam, afhankelijk van het smetstofgehalte van het inoculum. Bij injectie van grote virusdoses treedt de dood binnen 24 uur in. De gevoeligheid van deze proefdieren is van dezelfde orde van grootte als die van runderen. Naarmate de muizen ouder worden neemt hun resistentie tegen het virus toe en wordt de reactie op de infectie minder uniform. De door SKINNER onder-

zochte smetstofstammen verschilden onderling in vermogen om bij wat oudere muizen ziekte te verwekken. Bij jongere dieren bestond een uniforme gevoeligheid voor verschillende aan caviae en runderen geadapteerde stammen. Muizen die na infectie geen ziekteverschijnselen vertoonden, reageerden soms met de vorming van antilichamen. Met van runderen afkomstige virusstammen en rundersera werden in muizen hogere neutralisatietiters gevonden, dan bij onderzoek van hetzelfde materiaal in runderen het geval was. SKINNER's waarnemingen werden spoedig door andere auteurs bevestigd.

GARCIA MATA, PIZZI en ARAMBURU (1952) gebruikten met succes jonge ratten en muizen voor het aantonen van typespecifieke antilichamen tegen mond- en klauwzeervirus, zowel in sera van reconvalescente, als in die van gevaccineerde en hyperimmune dieren. Zij stelden vast, dat subklinisch geïnfecteerde dieren immune jongen grootbrachten. In een latere publikatie beschreven dezelfde auteurs een methode voor het controleren van vaccins gebaseerd op het gebruik van volwassen muizen. Deze werden gevaccineerd en na drie weken werden de sera in een neutralisatie- of protectieproef met behulp van jonge dieren onderzocht; 6—7 dagen oude muizen, die 0,2 ml serum subcutaan toegediend hadden gekregen, werden hiertoe intraperitoneaal geïnjicieerd met 10^5 muizen-ID_{50}. De aanwezigheid van antistoffen in de sera kon worden vastgesteld, doordat de ermee behandelde dieren minder snel stierven dan de niet met serum ingespoten controles. Sera van gevaccineerde runderen werden op dergelijke wijze onderzocht, ook deze bleken een beschermende werking te hebben.

NAGEL (1952) onderzocht met behulp van de neutralisatieproef in muizen een aantal sera van herstelde dieren en vergeleek deze met die van normale runderen. De techniek bleek geschikt voor het selecteren van gevoelige runderen voor laboratoriumgebruik.

SKINNER, HENDERSON en BROOKSBY bevestigden in 1952 de eerder gepubliceerde waarneming, dat de neutralisatietiter gevonden in muizen hoger is dan die verkregen met behulp van de intradermale titratie in de tong van gevoelige runderen. Het bleek mogelijk vier dagen na het optreden van ziekteverschijnselen in runderen antistoffen aan te tonen in hun sera. Naar de mening van deze onderzoekers zijn jonge ratten minder bruikbaar dan muizen, daar de gevoeligheid van deze diersoort voor het virus reeds ongeveer 36 uur na de geboorte begint af te nemen.

Tijdens het Veterinaire Congres te Stockholm deed SKINNER (1953) verdere mededelingen over de door hem gebruikte neutralisatieproef. Het te onderzoeken serum werd, evenals een normaal controleserum, in de verdunning 1/5 gemengd met een gelijk volume van verschillende virusconcentraties, waarbij voor de smetstof een tienvoudig verdunningsinterval werd gebruikt. Hoogwaardige sera werden onderzocht in de verdunningen 1/5, 1/25 en 1/125 tegenover 500 tot 5000 ID_{50}. Er werden 50%-eindpunten berekend en het aantal geneutraliseerde ID_{50} werd bepaald door vergelijking van de gevonden uitkomst, met die van de controleserie welke normaal serum bevatte.

Uit de op deze wijze verkregen neutralisatie-index kon die van het niet-verdunde serum berekend worden door vermenigvuldiging met de verdunningsfactor. Er werd hierbij dus aangenomen, dat de hoeveelheid geneutraliseerd virus omgekeerd evenredig was met de verdunningsgraad van het serum. De gevonden waarde werd logaritmisch uitgedrukt, waarbij werd afgerond op de dichtstbijzijnde eenheid. Volgens SKINNER zijn waarden kleiner dan 2 niet significant. Met de gebruikte methodiek was het mogelijk nog 43 tot 84 weken na infectie homologe antilichamen aan te tonen. Heterologe immuunstoffen werden alleen in de eerste weken gevonden en dan nog slechts in lage titer.

SCHNEIDER (1953) voerde de serumneutralisatieproef in muizen eveneens kwantitatief uit, waarbij hij zowel verzamelmonsters van hoogimmuun- en reconvalescentensera, als sera van gevaccineerde dieren titreerde. Dit materiaal werd ook in caviae en, met behulp van aan kippeëmbryo's geadapteerde stammen, in bebroede eieren onderzocht. Het virus werd in de vorm van fijngemaakte blaarwand bij —50° C bewaard. Het toonde dan, ook na maanden, geen vermindering van infectiositeit. De serumverdunningen werden bereid met een viervoudig interval; de verdunning die 50% van de dieren beschermde werd als eindpunt genomen. Alle serum-virusmengsels werden ten minste vijftig minuten bij 14—16° C bewaard alvorens injectie plaats vond. Bij alle proeven in muizen werd een constante virushoeveelheid gebruikt, nl. 631 ID_{50}. De dieren waren 3 tot 4 dagen oud en er waren er 6 tot 8 per verdunning beschikbaar. De injectiedosis bedroeg 0,1 ml. Een schatting van de betrouwbaarheid van de proefresultaten ontbreekt.

De eindpunten van een trivalent hoogimmuunserum liggen voor de drie gebruikte virusstammen, welke behoorden tot de typen en varianten 0_2, A_5 en C, tussen 1/2000 en 1/5700. Voor monovalente reconvalescentensera van dieren, die negen dagen tevoren aan een gegeneraliseerde infectie hadden geleden, werden waarden tussen 1/1250 en 1/2040 gevonden. Ten slotte bedroegen de titers van 14 dagen tevoren gevaccineerde runderen 1/40 tot 1/270, in één geval werd een waarde van 1/450 gevonden. De gegevens verkregen uit deze laatste proef wekken de indruk, dat bivalente vaccins een betere protectie gaven dan trivalente. Vooral de reactie op de A_5 en C-antigenen was zwak. Het onderzoek had echter slechts betrekking op twee runderen en deze dieren werden niet aan een proefinfectie blootgesteld. Wat betreft de verhouding van de neutralisatietiters van sera van gevaccineerde en reconvalescente dieren stemmen de resultaten van SCHNEIDER overeen met die van BROOKSBY. Volgens SCHNEIDER's mening zijn jonge muizen als proefdier voor het bepalen van neutraliserende antistoffen te prefereren boven caviae of bebroede eieren. Er werd weinig informatie verkregen over het verband tussen resistentie bij infectie en immuunlichaamgehalte van het serum. Om deze reden werd geen oordeel uitgesproken over de bruikbaarheid van de neutralisatieproef voor de beoordeling van het immuniserend vermogen van vaccins.

UBERTINI (1953) en zijn medewerkers gebruikten voor een vergelijkende studie over vaccins, bereid met in vitro gekweekt virus en met smetstof verkregen van kunstmatig geïnfecteerde runderen, zowel een proefopstelling met verschillende virusconcentraties als een serumverdunningstechniek. Hun mededelingen laten echter geen conclusie aangaande de relatieve merites van beide methoden toe. Dit geldt eveneens met betrekking tot het verband tussen de gevonden neutralisatietiters en de immuniteit tegen infectie.

Er zijn twee weefselcultuurmethoden ontwikkeld welke zich lenen voor het kwantitatief onderzoek van mond- en klauwzeervirus.

De eerste hiervan, welke werd beschreven door BROOKSBY en WARDLE (1954), maakt gebruik van de door FRENKEL (1947, 1949, 1950, 1951, 1952) ontwikkelde methode voor het kweken van het virus in overlevend geëxplanteerd rundertongepitheel. Te onderzoeken virusverdunningen worden bij weefselstukjes gevoegd, die zich in een voedingsmedium in uithollingen van een plastic plaat bevinden. Een infectieus inoculum zal gedurende de enkele dagen durende incubatie aanleiding geven tot de vorming van complementbindend antigeen. Dit komt vrij in de kweekvloeistof en kan daarin worden aangetoond. BROOKSBY en zijn medewerkster gebruikten deze methode o.a. voor het aantonen van typespecifieke antistoffen. Deze mogelijkheid werd later bevestigd door GILLESPIE en FRENKEL (1955) en door ZAHRAN (1956).

GILLESPIE en FRENKEL gebruikten de door BROOKSBY en WARDLE beschreven techniek in enigszins gewijzigde vorm voor het bepalen van neutraliserende antilichamen in sera van enkele reconvalescente runderen. Zeventien dagen na infectie met een aan eieren geadapteerde C-stam, inactiveerden deze sera in een verdunning van 1/10 meer dan $10^{5,4}$ ID_{50}. Materiaal van dezelfde dieren afgenomen voor de besmetting had geen waarneembaar effect op het virus.

Titratie van het virus is eveneens mogelijk gebleken in de cultures verkregen van getrypsiniseerde runder- en varkensnier. Deze techniek, die gelijktijdig werd toegepast door de Engelse onderzoeker SELLERS (1955) en door BACHRACH, HESS en CALLIS (1955) van het Amerikaanse mond- en klauwzeer instituut op Plum Island, maakt gebruik van het destruerend effect dat de smetstof uitoefent op in vitro gekweekte niercellen. De voor het cultiveren van het weefsel gebruikte methoden zijn ontwikkeld uit een eerder door DULBECCO c.s. (1954) o.a. voor het kweken van poliomyelitisvirus aangegeven werkwijze. De virustitratie is zowel mogelijk door gebruik te maken van buizen — waarbij de titer wordt uitgedrukt in een aantal weefselcultuur-ID_{50} per volume-eenheid — als met behulp van petrischalen, waarbij het aantal in de onderzochte virussuspensie aanwezige infectieuze eenheden geteld kan worden. De Amerikaanse onderzoekers, die hun studie in eerste instantie beperkten tot een virusstam van het A-type, konden aantonen, dat caviaimmuunserum in staat was het cytopathogeen effect van de smetstof te onderdrukken. Deze waarneming is door WESSLÉN en DINTER (1956) in Zweden

bevestigd met rundersera, waarbij tevens bleek dat de reactie typespecifiek was.

De titratiemethode in runderniercultuur is de laatste tijd o.a. door MACKOWIAK en LANG, (1958), door MAZZARACCHIO en medewerkers (1957), alsmede door DINTER en WESSLÉN (1958), ook gebruikt voor het onderzoek van sera van gevaccineerde runderen.

Eerstgenoemde auteurs namen waar, dat verschillende dieren zeer ongelijk reageerden op een zelfde vaccin. In enkele gevallen waren de uitkomsten na proefinfectie geheel verschillend van wat de resultaten van de neutralisatieproeven hadden doen verwachten.

DINTER en WESSLÉN vervolgden de ontwikkeling van de neutraliserende antistoffen gedurende enkele weken bij een twaalftal gevaccineerde runderen. Ze konden ze na één week aantonen en vonden maxima na 4 tot 5 weken. Het onderzoek werd echter niet verder voortgezet en een proefinfectie werd niet uitgevoerd.

Publikaties over het gebruik van de methode op groter schaal zijn nog niet verschenen, wat vermoedelijk voor een niet onbelangrijk deel is toe te schrijven aan de gecompliceerde en zeer bewerkelijke techniek, een bezwaar dat in veel mindere mate geldt voor de methode van BROOKSBY en WARDLE.

Samenvattend kan men vaststellen, dat de neutralisatieproef met ongespeende muizen, evenals de methode welke van runderen gebruik maakt, de aanzienlijk grotere gevoeligheid op de caviaproef voor heeft. Daarnaast betekent ook de mogelijkheid om te werken met niet aan caviae geadapteerde stammen een belangrijk voordeel. In vergelijking met de proef met runderen is bij het onderzoek naar virusneutraliserende immuunstoffen het gebruik van jonge muizen verder zeer economisch.

De methode heeft echter een nadeel. De meeste auteurs gebruiken één worp voor elke onderzochte virus- of serumverdunning. Naar onze ervaring is vooral bij gebruik van zeer jonge dieren enige aspecifieke sterfte niet te voorkomen, een waarneming die o.a bevestigd wordt door MERETTIG (1957), terwijl verschillende nesten ook vrij aanzienlijk in gevoeligheid uiteen kunnen lopen. Deze laatste mening wordt niet gedeeld door SKINNER.

Wij zouden ons in dit verband willen aansluiten bij een uitspraak van BESWICK (1955), die in een artikel over de titratie van verschillende virussen in ongespeende muizen schrijft: "The litter rather than the individual baby mouse should be regarded as the unit". Indien men hiermede instemt, wordt het gebruik van grote aantallen muizen noodzakelijk wanneer nauwkeurige uitkomsten verlangd worden. De beperktheid van het beschikbare fokmateriaal kan dan een belemmerende factor worden, die het routinegebruik van dit proefdier in de weg staat.

De mogelijkheid de complementbindingsreactie te gebruiken voor het aantonen van antilichamen in sera van reconvalescente en hyperimmune caviae werd voor het eerst aangetoond door CIUCA (1929). Herstellende dieren hadden 7 dagen post infectionem complementbindende antilichamen in hun

serum. Deze bereikten een maximum na drie weken en waren ongeveer zeven weken later niet meer aantoonbaar. De reactie was typespecifiek. Bij hoogimmune dieren verdwenen de complementbindende stoffen ongeveer twintig weken na het toedienen van de laatste injectie.

Deze waarnemingen werden bevestigd door TRAUB en MÖHLMANN (1943), die regelmatig bevredigende uitkomsten kregen met hun aan caviae geadapteerde virusstammen, maar met sommige pas geïsoleerde smetstoffen niet tot een bevredigende classificatie konden komen, indien zij deze onderzochten ten opzichte van de typespecifieke caviasera.

De complementbindingsreactie is voornamelijk toegepast voor het bepalen van het virustype bij ziektegevallen, waarbij dan gebruik wordt gemaakt van caviahyperimmuunsera. Bij pogingen antilichamen aan te tonen in rundersera hebben vele onderzoekers moeilijkheden ondervonden.

Volgens MERRILL (1936) zijn de concentraties van antigeen en antilichaam bepalend voor de uitslag van de reactie. Op grond van deze overwegingen onderzocht BROOKSBY, toen runderreconvalescentensera slechts twijfelachtige resultaten gaven, zowel de mogelijkheid globulinefracties uit sera van herstelde dieren als hyperimmuunsera te gebruiken. Geen van deze pogingen had echter succes.

Meerdere auteurs hebben methoden beschreven waarmede bij gebruik van rundersera positieve complementsbindingreacties met mond- en klauwzeerantigenen verkregen zouden worden, maar geen van deze werkwijzen heeft algemeen ingang gevonden.

FREDERIKS (1949) vermeldde het succesvol gebruik van niet-geïnactiveerde sera van hyperimmune, reconvalescente en gevaccineerde dieren, waarbij de reactie typespecifiek was.

NORDBERG en SCHJERNING-THIESEN (1953) pasten, in navolging van SERRA en GUARINI (1951), een methode toe, waarbij rundersera in plaats van door verwarming, door verhoging van de natriumchlorideconcentratie werden geïnactiveerd. Zij wijzigden de door de Italiaanse onderzoekers gebruikte techniek in die zin, dat de hypertonie na enige tijd door toevoeging van gedestilleerd water weer werd opgeheven. Op deze wijze behandelde hyperimmuunsera gaven een typespecifieke complementbindingsreactie. In een van de beschreven proeven trad bij geringe verdunning van het onderzochte serum binding op met alle drie virustypen, bij hogere verdunningen werd de reactie evenwel specifiek. Werden de sera door verwarming gedurende een half uur op 56° C geïnactiveerd, dan was geen complementbindend vermogen meer aan te tonen. Ook sera afkomstig van reconvalescente dieren gaven bij deze methode van onderzoek positieve resultaten, die, althans ten dele, typespecifiek waren. Slechts serum van een van de zeven runderen uit deze groep gaf ook na inactivering door verwarming nog een positieve reactie. Ter controle werden sera van een twintigtal Zweedse dieren onderzocht, die nooit met mond- en klauwzeersmetstof in aanraking waren geweest. Deze reageerden alle negatief.

In een meer recente publikatie beschrijven dezelfde onderzoekers (1956) nog enkele verdere resultaten verkregen met dezelfde methodiek. Zij konden nu in sera van O-reconvalescente runderen, tussen de zevende en de twee en zestigste dag na de infectie, typespecifieke antilichamen aantonen. Deze sera bonden complement in verdunningen tussen 1/4 en 1/32. De uitkomsten, verkregen met materiaal dat 62 dagen post infectionem was gewonnen, waren slechts dubieus, evenals die met sera van dieren die twaalf dagen te voren een infectie met smetstof van de typen A en C hadden doorgemaakt.

De meest bevredigende proefuitslagen werden verkregen met een O- en een A_5-stam, terwijl bij gebruik van een andere tot het A-type behorende smetstof, alsmede met een van het type C, met sera afgenomen 12 dagen post infectionem, geen duidelijk positieve resultaten werden waargenomen. Na inactivering door verwarming werd nog slechts in een enkel geval een spoor van binding geconstateerd. Rundersera, verkregen 96 dagen na injectie van monovalente vaccins, gaven na hypertonisering positieve reacties in verdunningen van 1/8; in deze gevallen was de binding evenwel niet typespecifiek. Deze uitkomsten suggereren, dat na vaccinatie de complementbindende antistoffen zich langer handhaven dan na doormaken van de infectie, hetgeen op zijn minst onwaarschijnlijk is.

In verband met het geringe percentage positieve reacties dat de meeste onderzoekers, ondanks verschillende modificaties in de gebruikte techniek, bij gebruik van rundersera vinden, vergeleken Rice en Brooksby (1953) bij het onderzoek van materiaal afkomstig van de in 1952 in Canada waargenomen mond- en klauwzeergevallen, de gebruikelijke directe met de zg. indirecte complementbindingsproef.

De met behulp van deze laatste reactie opgespoorde antilichamen kunnen niet met de gebruikelijke proefopstelling worden aangetoond, daar zij het vermogen missen in aanwezigheid van specifiek antigeen caviacomplement te binden. Wel blokkeren zij het antigeen, zodat dit niet langer in staat is te reageren met andere antistoffen, welke wel een positieve complementbindingsreactie zouden kunnen geven. In een op de juiste wijze samengesteld proefsysteem zullen immuunlichamen van het hier besproken type hun aanwezigheid dus verraden door het optreden van haemolyse.

Deze oorspronkelijk door Rice (1953) ontwikkelde methode is o.a. met succes toegepast voor het onderzoek van pluimveesera op antistoffen tegen *Salmonella pullorum*, pseudovogelpestvirus en smetstoffen van de psittacosisgroep. In uitvoering onderscheidt de reactie zich van de directe methode, doordat het te onderzoeken serum samen met het specifieke antigeen in afwezigheid van het complement wordt geïncubeerd. Later wordt dan gelijktijdig met dit laatste reagens een complementbindend antiserum — in het geval van mond- en klauwzeer zal dit cavia-hoogimmuunserum zijn — toegevoegd, waarna opnieuw wordt geïncubeerd. Ten slotte worden dan ook de gebruikelijke gesensibiliseerde schapeërythrocyten in de buisjes gebracht.

De indirecte reactie zal in de regel slechts toegepast worden, indien geen bruikbare modificatie van de directe methode beschikbaar is. In hoeverre de immuunlichamen, die met behulp van de twee werkwijzen worden aangetoond, identiek zijn, is niet bekend, maar er zijn aanwijzingen, dat beide voor kunnen komen in een zelfde serum.

Daar het aantal componenten gebruikt bij de indirecte reactie groter is dan dat gebruikt bij de directe, is eerstgenoemde methode moeilijker te hanteren. Dit is te meer het geval, daar slechts bij standaardisatie van alle ingrediënten een betrouwbare proefuitkomst te verwachten is.

De remmende werking van de rundersera is bij lage verdunningen minder specifiek dan bij hogere. Van de door RICE en haar medewerker onderzochte sera bevatten slechts enkele immuunstoffen die in staat waren een directe complementbindingsreactie te geven, terwijl met de indirecte reactie een groot percentage positieve uitkomsten werd verkregen.

Van belang is ook het recente werk van MARUCCI (1957), die met de directe reactie, ook bij onderzoek van rundersera, goede resultaten verkrijgt. Hij gebruikt voor het maken van alle verdunningen een veronalbuffer, voegt Ca^{++}- en Mg^{++}-ionen toe om een optimale concentratie daarvan te verzekeren en verder gelatine om niet-specifieke verliezen van bestanddelen uit het reactiesysteem ten gevolge van adsorptie aan de glaswand tegen te gaan. De gebruikte amboceptor, alsmede het complement en de erythrocytensuspensie, worden fotometrisch gestandaardiseerd. Complement wordt gebruikt in een constant aantal van 50%-eenheden. Als antigeen gaf alleen blaarinhoud, gebruikt in een verdunning van 1/40 tot 1/60, goede resultaten. Gesuspendeerde blaarwand en in vitro in tongepitheel gekweekt virus leverden minder bevredigende uitkomsten, hoewel het gehalte van de drie antigenen aan infectieuze smetstof niet verschillend was. De eigenlijke reactie werd bij lage temperatuur uitgevoerd. Serum en antigeen werden in aanwezigheid van het complement 18 tot 20 uur bij 2 tot 6° C geïncubeerd. Na toevoeging van een haemolytisch systeem, dat een bepaald constant aantal cellen bevatte, werd nog een uur bij 37° C bebroed.

Na infectie van runderen met O-, A_5- en C-stammen waren na ongeveer vier dagen complementbindende antilichamen in het serum aantoonbaar.

De titers bereikten een maximum na 2 tot 3 weken, daarna trad een aanvankelijk snelle, later langzamer daling in. Na twintig dagen werden verdunningseindpunten gevonden liggend tussen 1/700 en 1/1400; 64 dagen na infectie werden titers van O tot 1/200 geconstateerd. Er bestond verder een geringe heterotypische binding, vooral bij A_5-antiserum.

Tegen een O_2-stam gevaccineerde runderen vormden later immuunstoffen dan reconvalescente dieren, zodat deze na zeven dagen nog niet aantoonbaar waren. Na twee tot drie weken werden de hoogste titers, variërend van 1/30 tot 1/75, gevonden. Ze handhaafden zich enkele weken op dit niveau. Tussen de 29ste en 63ste dag na injectie van het vaccin verdwenen de complementbindende antistoffen uit het bloed. Bij een kunstmatige infectie, welke 75

dagen na vaccinatie plaats vond en waarbij smetstof intradermaal in de tong werd geïnjicieerd, bleek geen van deze runderen immuun.

Een andere groep dieren werd drie weken na injectie van een A_5-vaccin geïnfecteerd, eveneens door intracutane besmetting. Er werden geen generalisatieverschijnselen waargenomen. De titers van de complementbindende antistoffen in de sera stegen wel sterk, maar deze toeneming verliep niet sneller dan het geval was bij een groep controledieren, die nooit met vaccin was behandeld en ook lagen de bereikte waarden niet hoger. Na 83 dagen bleek serum van geen van de dieren in een verdunning van meer dan 1/60 een positieve reactie te geven.

Het is niet mogelijk op grond van deze literatuurstudie een gefundeerd oordeel uit te spreken over de bruikbaarheid van de hier beschreven serologische methoden voor de bepaling van de immunisatietoestand van de rundveestapel. Met betrekking tot de complementbindingsreactie moet geconstateerd worden dat er, ondanks de beperktheid van de beschikbare gegevens, enkele aanwijzingen zijn dat de hierbij betrokken antilichamen slechts geringe betekenis hebben voor de resistentie tegen de ziekte.

Zo vond CIUCA (1929), dat reconvalescente caviae slechts tussen de eerste en achtste week post infectionem complementbindende antilichamen in het serum hadden, terwijl volgens een mededeling van MAITLAND (1928) dergelijke dieren na 8 tot 9 maanden nog in staat zijn een infectie met 500 tot 1000 m.i.d. te weerstaan.

NORDBERG en SCHJERNING THIESEN (1956) vonden bij runderen de complementbindende antistoffen slechts tot ongeveer negen weken na infectie, een waarneming die niet in tegenspraak lijkt met de resultaten van MARUCCI. Deze laatste onderzoeker zag ook bij gevaccineerde dieren een opvallend snel negatief worden van de complementbindingsreactie.

Er zijn betrekkelijk weinig experimentele gegevens beschikbaar over de duur van de immuniteit bij reconvalescente runderen. De proefuitkomsten van WALDMANN en TRAUTWEIN (1921, 1928), geciteerd naar WALDMANN en NAGEL (1939), vestigen echter de indruk, dat de resistentie ten minste zes maanden en in de regel meer dan een jaar aanwezig blijft. De resultaten van ANDREWS en medewerkers (1937) en die van STOCKMAN en MINETT (1927) wijzen in dezelfde richting.

Hoewel een nader onderzoek van deze materie noodzakelijk zal zijn, lijkt het vermoeden gewettigd, dat de rol die de complementbindende antilichamen spelen bij de immuniteit tegen mond- en klauwzeer van geringe betekenis is, een situatie die zich ook bij meerdere andere virusinfecties voordoet.

Bij ons onderzoek werd daarom in de eerste plaats aandacht besteed aan de virusneutraliserende antistoffen. Van de verschillende voor de titratie hiervan in aanmerking komende methoden leek daarbij, op grond van de hierboven vermelde overwegingen, de door BROOKSBY en WARDLE (1953) beschreven techniek het meest geëigend. Op deze werkwijze, alsmede op

enkele erin aangebrachte modificaties, wordt in Hoofdstuk III nader ingegaan.

Daar voor een effectief gebruik van een dergelijke serologische methode echter enig inzicht in het mechanisme van de betreffende reactie gewenst is, worden eerst verschillende opvattingen over het wezen van de neutralisatie van virus door antistoffen nader besproken. Dit geschiedt in het volgende hoofdstuk.

II. DE REACTIE TUSSEN VIRUS EN NEUTRALISERENDE ANTILICHAMEN

(LITERATUUROVERZICHT)

De tegen filtreerbare smetstoffen gerichte antilichamen gedragen zich in vele opzichten als die tegen andere antigenen. Waren aanvankelijk slechts de virusneutraliserende antistoffen bekend, later konden t.o.v. vele virussen ook precipiterende, complementbindende en andere immuunlichamen worden aangetoond. Vermoedelijk zijn de serumeiwitten, die een rol spelen bij deze verschillende reacties, niet identiek. Klinisch zijn de neutraliserende antistoffen verreweg het belangrijkst.

De virusneutraliserende antilichamen zijn thermostabiel, ze worden door verwarming tot 55 of 60° C niet gedestrueerd. Hoewel verschillende auteurs menen een versterking van het neutraliserend vermogen waargenomen te hebben, indien niet-verwarmd serum werd toegevoegd, zijn in de regel thermolabiele serumfracties, met name complement, niet essentieel voor de virusinactivering. Dit was o.a. het geval bij de neutralisatie van *Western equine encephalitis*-virus [1], ROUS sarcoom-virus en herpes simplex-virus volgens WEDGWOOD (1956) en ook bij bofvirus volgens GOTLIEB en medewerkers (1953) en volgens LEYMASTER en WARD (1949). De mogelijkheid bestaat, dat hier niet zo zeer complement als wel thermolabiele serumcomponenten zoals het properdinecomplex, dat op sommige filtreerbare smetstoffen een inactiverend effect zou hebben, een rol spelen (zie o.a. GOTLIEB, BASHE, HENLE en HENLE, 1953, en WEDGWOOD en medewerkers, 1956).

Russische onderzoekers beschreven ook specifieke thermolabiele antilichamen o.a. gericht tegen vacciniavirus.

De virusneutraliserende antistoffen hebben globuline-eigenschappen, maar aangaande hun distributie over de serumfracties lopen de meningen van verschillende auteurs enigszins uiteen. Hierbij spelen de bij het onderzoek toegepaste techniek, de wijze van immunisatie en de gebruikte diersoort een rol.

Zo vonden BEDSON, MAITLAND en BURBURY (1927), en VON GARA en TRAUTWEIN (1930) bij onderzoek van mond- en klauwzeerimmuunsera het grootste deel van de tegen het virus gerichte activiteit in de euglobulinefractie. BROOKSBY (1949) stelde vast, dat weliswaar een groot deel van de serumactiviteit met de euglobulinen te concentreren was, maar dat, afhankelijk van de tijd verlopen sedert de infectie, de grootte van dit gedeelte varieerde.

JANSSEN (1951) constateerde bij electroforetisch onderzoek, dat de eiwitspectra van cavia- en rundersera van reconvalescente en hoogimmune dieren

---

[1] *Western equine encephalitus*-serum wordt in het vervolg afgekort als *W.e.e.*-serum

verschilden ten opzichte van die van normale dieren. Hierbij speelde ook de aard van het voor infectie en hyperimmunisatie gebruikte virus een rol.

BRADISH en zijn medewerkers (1954) vonden door middel van electroforetisch onderzoek, dat runderen na infectie met mond- en klauwzeervirus eerst een tijdelijke toename van de β-globulinen vertoonden. Na een dag of veertien trad een sterke vermeerdering van de γ-globulinen op, welke lange tijd bleef bestaan.

Na toepassing van een alcoholprecipitatiemethode vond BROOKSBY (1949), dat het grootste deel van de specifieke serumactiviteit met het γ-globuline, een deel echter ook met het β-globuline werd neergeslagen.

Volgens OPTON, NAGAKI en MELNICK (1955) gedragen de antilichamen tegen poliomyelitisvirus zich als β-globulinen.

De aard van het eigenlijke neutralisatieproces is lange tijd omstreden en is ook thans nog slechts ten dele bekend. De oudere literatuur over dit onderwerp werd samengevat door CRAIGIE (1939) en ook door HALLAUER (1939). Aanvankelijk werd aangenomen dat de antilichamen het virus zonder meer vernietigen, maar spoedig bleek dat de inactivering niet onder alle omstandigheden irreversibel is. Door verdunning en ook door adsorptie, door kataforese en door ultracentrifugeren, bleek het mogelijk infectieus materiaal uit een neutraal serum-virusmengsel terug te winnen. Het onderzoek van de vraag, of in vitro reeds een irreversibele binding optreedt, is lange tijd bemoeilijkt door het ontbreken van voldoend nauwkeurige kwantitatieve methoden. In de regel moest men zich beperken tot het aantonen van de resterende virusactiviteit, in plaats van in staat te zijn de werkelijke afneming van het aantal infectieuze eenheden te bepalen.

Een werking der antilichamen in vitro was eerst als bewezen te beschouwen, toen verschillende auteurs (BEDSON, ANDREWS, MC KINNON en FINDLAY, zie HALLAUER, 1939) vaststelden, dat met immuunserum gemengd virus progessief aan activiteit inboette, naarmate serum en virus langer samen geincubeerd werden en dat ook de hoeveelheid virus, die door verdunning weer vrij te maken was, met verlenging van de contacttijd afnam.

In recente Russische publikaties (zie SMORODINTSEV, 1957) wordt de inactiverende werking van de antilichamen zelf in vitro opnieuw in twijfel getrokken. Het beschermend effect zou volgens deze opvatting alleen het resultaat zijn van verhindering van de virusadsorptie aan de cel ten gevolge van de reversibele opname van antilichamen door het virus.

De adsorptie van antistoffen door smetstofdeeltjes is echter experimenteel overtuigend aangetoond (zie BURNET en medewerkers, 1937, alsmede CRAIGIE, 1939, en HALLAUER, 1939).

Een meer gedetailleerd onderzoek van het verloop van de reactie tussen virus en neutraliserende antilichamen is slechts mogelijk indien gevoelige titratiemethoden ter beschikking staan. In dit opzicht bood aanvankelijk het gebruik van bacteriofagen belangrijke voordelen, daar hierbij de mogelijk-

heid openstond het aantal per volume-eenheid aanwezige infectieuze eenheden nauwkeurig vast te stellen door uitstrijken van de vloeistof op een met gevoelige bacteriën beënte voedingsbodem. Bij juist gekozen verdunningen zal dan elk virusdeeltje aanleiding geven tot het ontstaan van een *plaque*.

De eerste kwantitatieve analyse van de virusinactivering, die werd uitgevoerd door ANDREWES en ELFORD (1933), geschiedde dan ook met behulp van dergelijke smetstoffen. De toepasselijkheid van de door hen opgestelde *percentage law* is later ook voor dierpathogene virussen onderzocht door MERRILL (1936) en vooral door BURNET en zijn medewerkers (1937).

Deze laatste auteurs gebruikten aanvankelijk eveneens bacteriofagen voor hun onderzoek, maar waren weldra, ten gevolge van de invoering van de *pock counting*-techniek, in staat een vergelijkbare graad van nauwkeurigheid te bereiken bij de titratie van dierpathogene virussen.

Volgens ANDREWES en ELFORD (1933) gedragen virusdeeltjes in een milieu dat een overmaat aan antilichamen bevat, zich onafhankelijk van elkaar. Daardoor is het percentage infectieuze eenheden dat geneutraliseerd wordt door een bepaalde serumconcentratie binnen wijde grenzen onafhankelijk van de gebruikte hoeveelheid smetstof.

De onderzoekers verklaarden de op deze regel waargenomen uitzonderingen door een natuurlijke variatie aan te nemen in de resistentie van de faagdeeltjes tegenover antilichamen.

BURNET, KEOGH en LUSH (1937), die o.a. werkten met de dysenteriefaag C 16, konden deze *percentage law* bevestigen, maar zij constateerden eveneens enkele afwijkingen. Deze traden vooral op bij hoge serumverdunningen en bij grote concentraties van een van beide reactiecomponenten.

Bij hun onderzoek werd o.a. nagegaan welke de invloed was van verschillende serumconcentraties, alsmede van variatie van incubatietijd en -temperatuur, op het verloop van het inactiveringsproces. Hierbij werd zorg gedragen voor uitschakelen van de werking van de antistoffen door verdunning aan het eind van de observatietijd. Hogere antilichaamconcentraties en temperatuurverhoging bleken de virusinactivering te versnellen. Bij verschillende serumverdunningen blijkt aanvankelijk een lineair verband te bestaan tussen de vermindering van het aantal infectieuze eenheden en de duur van incubatie van het serum-virusmengsel, indien eerstgenoemde waarde logaritmisch wordt uitgedrukt. Bij lagere antistofconcentraties komt het inactiveringsproces eerst op gang na een zekere *lag*-periode. Voor het onderling vergelijken van sera of verdunningen daarvan, is het bepalen van de reactiesnelheid gedurende de logaritmische fase de meest geschikte methode. Wordt de incubatie van het serum-virusmengsel voortgezet, dan buigen de lijnen, die de virusinactivering als functie van de incubatietijd geven, meer en meer om, d.w.z. het neutralisatieproces gaat op den duur minder snel verlopen.

De krommen, die het verband aangeven tussen de serumconcentratie en het percentage niet-geïnactiveerde fagen, variëren in vorm, afhankelijk van de tijd en de temperatuur waarbij het serum-virusmengsel geïncubeerd werd.

BURNET en medewerkers (1937) hebben deze als neutralisatielijn aangeduide curve getest aan de hypothesen dat

1. de faagpopulatie homogeen was en
2. de inactivering logaritmisch verliep met een snelheid evenredig aan de serumconcentratie, indien één uur bij 37° C geïncubeerd werd.

Tussen de experimenteel gevonden kromme en de hypothetische, bleken twee afwijkingen te bestaan. Ten eerste inactiveerde een verdund serum minder dan verwacht was, hetgeen kon worden verklaard uit de boven reeds genoemde *lag*-periode. Ten tweede bleek de theorie aanzienlijk van de praktijk te verschillen wanneer een hoge serumconcentratie werd gebruikt. Het aantal overlevende fagen was dan veel hoger dan verwacht werd. Dit zou een gevolg zijn van heterogeniteit van de faagpopulatie, ten gevolge waarvan een deel van het virus resistent was tegen alle onderzochte antilichaamconcentraties.

BURNET en medewerkers (1937) ontwikkelen het volgende concept van de inactivering van bacteriofagen door immuunserum:

1. Het virus bindt antilichaammoleculen, zoals volgt uit het feit dat de lengte van de tijd, gedurende welke serum en faag in afwezigheid van de bacteriën geïncubeerd worden, een rol speelt, alsmede uit de waarneming dat verdunning vrijwel geen reactivering geeft.
2. Voor inactivering is meer dan één antilichaammolecule nodig. Aan serum blootgestelde faag is moeilijk te filtreren en geeft ook onder bepaalde omstandigheden kleinere plaques dan normaal virus.
3. Bij hoge serum- en virusconcentraties blijven toch enkele fagen infectieus ten gevolge van verschillen in resistentie.
4. Geïnactiveerde faag kan worden geadsorbeerd aan de bacteriecel.
5. De antilichaammoleculen vertonen, evenals de bacteriofagen, onderling verschillen. Dit blijkt o.a. uit het optreden van minder specifieke reacties bij gebruik van hoogimmuunsera. Wanneer BURNET c.s. sera, verkregen na korte of langdurige immunisatie, vergeleken, bleek dat de gevonden neutralisatielijnen niet parallel liepen, indien incubatietijd en -temperatuur constant werden gehouden. Een dergelijke waarneming was reeds eerder door ANDREWES en ELFORD (1933) gedaan. Bij hoogimmuunsera werd nooit dissociatie van het antigeen-antilichaamcomplex waargenomen.

Wanneer aangenomen werd, dat de faagpopulatie homogeen was en de antilichaammoleculen onderling identiek waren, terwijl het aantal van deze laatste groot was ten opzichte van dat van de virusdeeltjes en indien dan tevens de virus-serumbinding als irreversibel werd beschouwd, was het mogelijk een op de wet van de massawerking gebaseerde mathematische formulering voor de inactiveringssnelheid te geven.

Onder de aangegeven omstandigheden is de reactiesnelheid evenredig met de serumconcentratie of met een hogere macht daarvan, al naar gelang er twee of meer moleculen aan de reactie deelnemen.

Volgens de Australische onderzoekers wordt het verband weergegeven door de formule

$$kc = \frac{1}{t} \cdot \log \frac{1}{p}, \qquad (1)$$

waarin p = het percentage overlevende faagdeeltjes na inwerking van het serum gedurende een tijd t, terwijl c = antistofconcentratie. Daar volgens BURNET en medewerkers in de regel meerdere antilichaammoleculen nodig zijn voor inactivering, is de hier gegeven formule volgens hen te eenvoudig. Wanneer complicerende factoren als faagheterogeniteit, aggregatie en voortgezette serumwerking uitgeschakeld worden, zou ze volgens de Australische auteurs echter goed voldoen.

Een groot aantal onderzoekers heeft zich na het baanbrekende werk van BURNET c.s. nog met verschillende aspecten van de inactivering van bacteriofagen door neutraliserende antilichamen bezig gehouden.

KALMANSON, HERSHEY en BRONFENBRENNER (1942) kwamen hierbij tot een enigszins andere interpretatie van de *percentage law* dan ANDREWES en ELFORD (1933). Zij menen namelijk dat slechts de kans dat een deeltje in een zekere tijd een bepaald aantal antilichaammoleculen ontmoet, constant is, een situatie welke zich alleen bij serumovermaat voordoet. Het rechte deel van de kromme, die het verband tussen het geïnactiveerde percentage fagen en de incubatietijd aangeeft, zou wijzen op een monomoleculaire reactie. In werkelijkheid vertoont de grafiek een geringe kromming, die varieert met de temperatuur. Bij 0° zou daarom een tweetal, bij 37° C een drietal moleculen voor inactivering nodig zijn. De door BURNET gegeven formule werd ontwikkeld tot

$$k = \frac{\text{serumverdunning}}{\text{tijd in sec}} \times 2{,}3 \times \log. \text{ hoeveelheid geneutraliseerd virus} \qquad (2)$$

Voor k werden waarden gevonden van 0,6 tot 0,8 bij 37° C. Bij 0° werd k = 0,05. De neutralisatiereactie is bij bacteriofagen dus in belangrijke mate afhankelijk van de temperatuur.

DELBRUCK (1945) meent, dat de binding tussen faag en immuunstoffen normaal irreversibel is en dat gebonden maar niet-inactiverende moleculen geen invloed op het virus hebben. De adsorptie van geïnactiveerde bacteriofagen aan de bacteriecelwand zou zeer gering zijn. De neutralisatiereactie zelf zou logaritmisch verlopen. Bij lage serumconcentraties werden geen afwijkingen van de *percentage law* waargenomen.

CANN en CLARK (1955) en ook andere auteurs, constateerden een belang-

rijke invloed van zoutconcentratie en pH op de inactivering van bacteriofagen. Zij verklaren deze door veranderingen in de elektrostatische invloeden die de reactie tussen antigeen en immuunlichaam beheersen aan te nemen. De over verschillende globulinefracties verdeelde antistoffen reageerden ongelijk op veranderingen in het reactiemilieu.

JERNE en AVEGNO (1956) concluderen uit hun onderzoekingen, dat een aantal antilichaammoleculen door het virus wordt geadsorbeerd, voordat een treffer op een kritieke plaats het infectieuze deeltje inactiveert. Bij sera verkregen na kortdurende immunisatie zou de binding nog reversibel zijn, bij hoogimmuunsera echter niet meer, zodat de indruk wordt verkregen, dat de antistoffen in verschillende sera niet alleen kwantitatief verschillen, maar ook kwalitatief.

Voor het onderzoek van de neutralisatie van een aantal dierpathogene virussen gebruikten BURNET, KEOGH en LUSH (1937) de titratie op de chorioallantoismembraan van het bebroede kippeëi. Deze werkwijze biedt als belangrijk voordeel boven de methoden die gebruik maken van een eindpunt, dat zij een aanzienlijk nauwkeuriger schatting van het per volume-eenheid aanwezige aantal infectieuze eenheden toestaat. De *pock counting*-techniek is daardoor tot op zekere hoogte te vergelijken met de voor bacteriofagen gebruikte titratiemethoden; zij kan echter alleen worden toegepast voor het onderzoek van virussen die duidelijke laesies op de chorio-allantoismembraan doen ontstaan.

Uit de resultaten van BURNET c.s. blijkt, dat bij de inactivering door antilichamen deze smetstoffen zich ongeveer als bacteriofagen gedragen. Het proces verloopt in twee stadia, waarvan het eerste, waarbij zich antilichaammoleculen aan de virusdeeltjes binden, het best onderzocht is. Deze adsorptiefase is volgens BURNET reversibel, zodat geconcludeerd moet worden, dat de opneming van immuunstoffen op zichzelf niet tot verlies van infectiositeit van de smetstof leidt. Bij de adsorptie wordt ten slotte een evenwichtstoestand bereikt, welke wordt gekenmerkt doordat het door een bepaalde hoeveelheid serum "geïnactiveerde" percentage virusdeeltjes constant is en onafhankelijk van de gebruikte virusconcentratie. Verder is in het ideale geval de snelheid waarmee het systeem zijn evenwichtstoestand bereikt recht evenredig met de antilichaamconcentratie en is het percentage niet geïnactiveerde infectieuze eenheden omgekeerd evenredig daarmee.

$$\text{Concentratie antistoffen} \times \text{percentage overlevend virus} = \text{constant} \quad (3)$$

De neutralisatielijn zou dus een rechte zijn met een helling van 45°. Alleen in verdunde sera wordt het percentage "overlevende" deeltjes beïnvloed door de lengte van de incubatietijd.

Ook bij de onderzochte dierpathogene virussen was een deel van de viruspopulatie resistent tegen neutralisatie door antilichamen. De door BURNET en

zijn medewerkers onderzochte antistoffen verschillen onderling in de mate waarin zij voldoen aan het theoretisch verwachte model. Afwijkingen daarvan kunnen ontstaan door heterogeniteit van de smetstof en door ten dele irreversibel worden van de adsorptie bij langere contacttijd.

Vooral *louping-ill*-virus gedraagt zich volgens de theoretische verwachting. De neutralisatielijn wordt echter bij hogere serumverdunningen aanzienlijk steiler dan 45° ten gevolge van de lange tijd die dan nodig is voor het bereiken van het evenwicht.

In een andere publikatie beschreef BURNET (1943) een neutralisatie-experiment met influenzavirus, waarbij het serum-virusmengsel in de allantoisholte van bebroede eieren werd geënt. Voor de titratie werd een eindpuntmethode gebruikt. De neutralisatielijn was hier aanzienlijk steiler dan die gevonden bij enting op de chorio-allantoismembraan, een waarneming die later door verschillende auteurs, ook met andere smetstoffen, bevestigd werd.

De *pock counting*-techniek is voor het onderzoek van talrijke dierpathogene virussen niet bruikbaar. Voor het aantonen van neutraliserende antilichamen zal dan in de regel een andere minder gevoelige titratiemethode, waarbij bij voorkeur gebruik gemaakt zal worden van een 50%-eindpunt, toegepast moeten worden. Een dergelijk proefsysteem is minder gevoelig dan een, dat de onderzoeker in staat stelt het aantal infectieuze eenheden dat in een bepaald volume vloeistof aanwezig is, te tellen.

MORGAN (1945) gebruikte een dergelijke methode bij neutralisatieproeven met *W.e.e.*-virus in muizen. Hierbij bleek dat de neutralisatielijn, die bij niet-geïnactiveerd serum recht was, een kromme werd bij gebruik van verwarmd materiaal. Inactiveren van het serum gedurende een half uur bij 56° C veranderde het verdunningseindpunt van het serum niet, maar de hoeveelheid virus die geneutraliseerd werd door onverdund serum, werd wel verlaagd.

Zoals reeds eerder vermeld vond BROOKSBY (1952) bij neutralisatieproeven met mond- en klauwzeervirus in runderen een dergelijk verloop. Ook JAWETZ en COLEMAN (1952) deden overeenkomstige waarnemingen bij experimenten met herpes simplex-virus in eieren. In dit laatste geval bleek de reactie in belangrijke mate van de temperatuur afhankelijk te zijn, terwijl ook de duur van de incubatie van het serum-virusmengsel van belang was.

Bij de door BLACK en CLARKE (1955) onderzochte neutralisatie van het Bwamba-virus bestond eveneens een duidelijke temperatuurinvloed. Hierbij speelde echter de lengte van de incubatieperiode alleen bij niet-verdunde sera een rol en was complement niet essentieel.

TYRRELL en HORSFALL publiceerden in 1953 een aantal met een eindpuntmethode verkregen resultaten, op grond waarvan zij enige nieuwe inzichten naar voren brachten. In voorafgaande proeven verricht met een dergelijke techniek was gebleken, dat er een lineair verband bestond tussen de logaritme van een hoeveelheid geneutraliseerd virus en de bijbehorende

serumverdunning, indien deze laatste waarde eveneens logaritmisch werd uitgedrukt. Voor influenzavirus, getitreerd door middel van intranasale injectie in muizen, was de helling van deze lijn 1,4, indien de hoeveelheid geneutraliseerd virus op de verticale en de serumverdunning op de horizontale as werd uitgezet. Ook met verschillende andere smetstoffen werden in muizen waarden groter dan 1,0 gevonden. Werd bij influenza A-virus de titratie uitgevoerd op de chorio-allantoismembraan van bebroede kippeeieren, dan werd een helling van 3,0 vastgesteld, terwijl waarden liggend tussen 3,0 en 4,7 met verschillende andere virussen verkregen werden, indien in de allantoisholte geënt werd. Bij infectie van embryo's met hetzelfde materiaal langs andere weg lagen de uitkomsten weer veel lager. De door BURNET voor titraties met behulp van de *pock counting*-techniek gevonden waarde van 1,0, zou volgens TYRRELL (1953) alleen gelden voor dat speciale geval.

Resultaten verkregen met de colifaag T3 bevestigden opnieuw de *percentage law*. De richting van de neutralisatielijn bleek hierbij niet, de plaats echter wel beïnvloed te worden door het aantal niet-geneutraliseerde virusdeeltjes dat als eindpunt werd gekozen.

Bij de onderzochte dierpathogene smetstoffen, waaronder pseudovogelpestvirus, hadden verschillen in gevoeligheid van het voor de titratie gebruikte celsysteem zowel invloed op de helling van de neutralisatielijn als op de ligging. Hieruit worden de volgende praktische conclusies getrokken. Voor het aantonen van een grote hoeveelheid antistoffen kan een gevoelig celsysteem benut worden. Bij kleine concentraties immuunstoffen verdient het gebruik van kleine virushoeveelheden aanbeveling; het is dan tevens van belang een proefsysteem te gebruiken van betrekkelijk geringe gevoeligheid, d.w.z. een dat slechts door grotere hoeveelheden smetstof geïnfecteerd kan worden. Een serum-virusmengsel, dat bij onderzoek in een bepaald celsysteem neutraal lijkt, kan bij gebruik van een ander weefsel nog infectieus zijn.

Bij een proefopstelling met constante serumhoeveelheid en verschillende virusdoses en een helling van de neutralisatielijn van meer dan 1,0 geeft een verandering van de gebruikte antilichaamconcentratie een groter verschil in de hoeveelheid geneutraliseerd virus. Het is in de meeste gevallen echter slechts mogelijk de serumtiters over een beperkt gebied te meten, omdat in de praktijk de virusconcentratie van het uitgangsmateriaal een beperkende factor wordt.

Bij gebruik van een constante virusdosis en verschillende serumverdunningen ontbreekt dit nadeel, terwijl deze proefopstelling daarnaast nog het voordeel biedt van grote nauwkeurigheid ten gevolge van de in de regel vrij grote helling van de neutralisatielijn. Kleine schommelingen in de gebruikte virushoeveelheid zullen het serumverdunningseindpunt daardoor meestal maar weinig beïnvloeden.

Met zijn experimentele waarnemingen als basis, bouwde TYRRELL (1953) een nieuw theoretisch model van de neutralisatie van virus door immuunlichamen op, dat in feite een uitbreiding was van het door BURNET en

medewerkers (1937) ontwikkelde. Volgens deze opvattingen zou één virusdeeltje in staat zijn één of meer antilichaammoleculen op te nemen. Deze reactie zou voldoen aan de wet van de massawerking. Er was geen methode beschikbaar om de frequentiedistributie van de per infectieuze eenheid geadsorbeerde aantallen te bepalen, maar de veronderstelling welke ontwikkeld werd in analogie met een eerder door HEIDELBERGER en KENDALL (zie TYRRELL 1953), en ook door JERNE (1951) voor andere antigeen-antilichaamsystemen opgestelde theorie, luidde, dat deze verdeling asymmetrisch was. De meeste virusdeeltjes zouden n moleculen opnemen, zeer enkele meer en andere minder, zodat n vaker zou voorkomen dan n — 1, dit aantal weer meer dan n — 2, etc. Bij adsorptie van n — x antilichaammoleculen zou inactivering optreden. Volgens de wet van de massawerking wordt $[va_{n-x}][a]^x = K[va_n]$. Bij de verdere uitwerking van de hypothese werd dan verondersteld, dat een grote overmaat antilichaam in het reactiesysteem aanwezig was, zodat $[va_n]$ veel groter is dan $[va_{n-1}]$ etc. Bovenstaande vergelijking werd dan:

$$vA^x = K.V \qquad \text{of} \tag{4}$$

$$\log V = x \log A + \log v - \log K, \tag{5}$$

waarin v = de concentratie van infectieus virus, A die van de antilichamen, en V die van het oorspronkelijk toegevoegde virus; verder is x = de helling van de neutralisatielijn. Onder de bij deze proeven gebruikte omstandigheden zou er volgens WALKER en HORSFALL (1950) inderdaad meestal een grote antilichaamovermaat aanwezig zijn, zoals o.a. bleek uit de waarneming dat indien door centrifugeren het virus en de eraan geadsorbeerde immuunstoffen gesedimenteerd werden, er nauwelijks een afname van de oorspronkelijk aanwezige hoeveelheid antistoffen was vast te stellen.

De ontwikkelde formule werd gecontroleerd met behulp van de proefresultaten. De voor de constante K gevonden waarden varieerden tussen 0,8 en 12,3. Vooral indien de titraties werden uitgevoerd door enting in de allantoisholte werden hoge uitkomsten gevonden. TYRRELL zag twee mogelijke verklaringen voor deze waarneming. De ene, die veronderstelde dat de opname van antilichaammoleculen door een virusdeeltje gemakkelijker zou worden naarmate er meer waren geadsorbeerd, leek hem weinig bevredigend. De andere, welke hij waarschijnlijker achtte, was dat de antistoffen die voor neutralisatie van in de allantoisholte geënt virus aansprakelijk zouden zijn, zouden verschillen van die welke bij gebruik van andere celsystemen het virus inactiveren. De waarneming, dat de haemagglutinatieremmende antilichamen niet identiek zijn met de virusneutraliserende, werd aangevoerd als steun voor dit laatste standpunt.

Door de recente ontwikkeling op het gebied van de weefselcultuur, is de laatste jaren de mogelijkheid geschapen ook vele dierpathogene virussen te

titreren met een nauwkeurigheid, overeenkomend met die van de voor bacteriofagen beschikbare methoden. Hierbij wordt gebruik gemaakt van de door DULBECCO (1952) uitgewerkte *monolayer*-techniek.

Door behandeling met trypsine kunnen cellen uit weefsel losgemaakt worden en het is mogelijk deze dan op glas te kweken. Bij gebruik van een geschikt medium vormt zich na verloop van enkele dagen een dunne membraan van aaneengesloten cellen, welke meestal niet één, zoals de gebruikte benaming suggereert, maar meerdere cellen dik is. Talrijke dierpathogene virussen bezitten het vermogen zich in aldus uit een of ander weefsel gekweekte celcultures te kunnen vermeerderen, waarbij de cellen dan dikwijls te gronde gaan. Wanneer de verdunning van de voor infectie gebruikte virussuspensie goed gekozen wordt, en er tevens zorg voor wordt gedragen, dat de geproduceerde smetstof gelokaliseerd blijft en zich niet vrij door het milieu kan verspreiden, ontstaan omschreven defecten in de cellaag, welke geteld kunnen worden.

DULBECCO en VOGT (1954) wisten aannemelijk te maken, dat één infectieuze eenheid in staat is een dergelijke plaque te vormen.

In samenwerking met STRICKLAND (1956) bestudeerden deze onderzoekers ook het proces van de virusneutralisatie met behulp van deze techniek, zowel wat betreft *W.e.e.*-virus, als voor een stam van het type 1 van de poliomyelitissmetstof. Eerstgenoemd agens werd onderzocht met cultures van getrypsiniseerd kippeëmbryo, het tweede in nierweefselcultures van rhesusapen.

De verkregen resultaten tonen aan, dat inactivering een direct gevolg is van antilichaamadsorptie door het virusdeeltje. Agglutinatie of aggregatie zijn van weinig betekenis bij het proces. In aanwezigheid van een overmaat aan serum is de reactie er een van de eerste orde, waarbij de inactiveringssnelheid rechtstreeks afhankelijk is van de antilichaamconcentratie. Opneming van één molecule per virusdeeltje kan voldoende zijn voor inactivering, adsorptie van een groter aantal is echter mogelijk. De reactie is temperatuurgevoelig en de virus-antilichaambinding is volgens de Amerikaanse onderzoekers bij 37° C in isotonische zoutoplossing van pH 7,5 betrekkelijk stabiel. Terwijl het poliomyelitisvirus geen dissociatie vertoonde, trad bij de *W.e.e.*-smetstof een geringe reactivering op, indien serum-virusmengsels verdund werden. Dat het wel mogelijk was infectieuze smetstof vrij te maken uit neutrale complexen, kon gedemonstreerd worden door toevoeging van grote hoeveelheden met behulp van ultraviolet licht geïnactiveerd antigeen aan een dergelijk systeem. Op grond hiervan werd verondersteld, dat tussen virusdeeltjes overdracht van antilichaammoleculen kon plaats vinden. Het verloop van het neutralisatieproces zou niet afhankelijk zijn van het voor het aantonen van het virus gebruikte celtype.

Op grond van de proefresultaten wordt dan de volgende voorstelling van de virusinactivering door antilichamen ontwikkeld.

Elk virusdeeltje heeft aan zijn oppervlak een aantal (n) receptoren voor immuunstoffen. Adsorptie van één antilichaammolecule leidt tot inactivering.

In de beschreven gevallen was deze binding irreversibel, de mogelijkheid bestaat echter, dat dit niet steeds zo is. De aard van de gebruikte sera zou hier, evenals bij de eerder geciteerde proeven van JERNE, van invloed kunnen zijn.

Kinetisch wordt de verdwijning van de actieve virusdeeltjes gegeven door de formule

$$V_t / V_o = [Q_t / Q_o]^n , \qquad (6)$$

waarin $Q_o = V_o \cdot n$; V_o = de concentratie van virusdeeltjes in de buis welke het serum-virusmengsel bevat, ten tijde t=0 en Q_t = concentratie niet-bezette receptoren op tijd t. Voor het quotient Q_t / Q_o en voor verschillende daarmee samenhangende grootheden kunnen formules worden afgeleid, waaruit volgt, dat de grafiek welke de virusinactivering geeft als functie van de incubatietijd, een rechte moet zijn, die bij gebruik van grote antistofconcentraties een hoek $-nk_1A_0$ maakt met de horizontale as. Worden minder antilichamen toegevoegd, dan wordt de lijn gebogen, hoewel het begin dezelfde richting blijft behouden. Dit gedeelte is altijd van de eerste orde en de helling is evenredig met de antistofconcentratie. Indien antigeenovermaat bestaat, wordt de formule voor V_t / V_o voor $t \to \infty$:

$$\ln (V/V_o) = n \ln (1 - m/n). \qquad (7)$$

Hierin stelt m voor het aantal geadsorbeerde antilichaammoleculen. Voor t = oneindig, is $m = m_o$. Naarmate n toeneemt, nadert deze formule tot

$$V / V_o = e^{-m}. \qquad (8)$$

DULBECCO en zijn medewerksters voeren dan een nieuw begrip in, dat van de multipliciteitskromme, ter vervanging van de door andere auteurs gebruikte neutralisatielijn. Per definitie is deze *multiplicity curve:* "the plot of the logarithm of the final survival as a function of the serum-virus ratio in the neutralization tube". Beredeneerd kan worden, dat de multipliciteitscurve begint met een helling van 45° en later steiler gaat lopen, tenzij n een hoge waarde heeft. In de praktijk tonen zowel de kromme, die de invloed van de incubatietijd op de inactivering aangeeft, als de multipliciteitscurve, ten slotte een theoretisch niet verwachte horizontale afbuiging. Deze zou ten dele worden veroorzaakt door een resistente virusfractie, maar daarnaast zou ook variatie in gevoeligheid van de virusdeeltjes een rol spelen. In beide gevallen zou een afwijkend gedrag kunnen berusten op verschillen in aantal of aard van de per viruseenheid aanwezige receptoren. Het horizontale deel van de multipliciteitskromme geeft de eindtoestand. De resterende hoeveelheid virus wordt, naar de mening van DULBECCO en zijn medewerksters, niet bepaald door de virusconcentratie alleen, zoals de *percentage law* aangeeft, maar door de verhouding tussen de aantallen antilichaammoleculen en virusdeeltjes, de z.g. multipliciteit.

De antilichaamconcentratie wordt uitgedrukt in equivalenten. Voor een bepaalde virussuspensie is het antilichaamequivalent die hoeveelheid antistoffen, die een multipliciteit 1 geeft (m=1). De nog infectieuze virusfractie is dan, indien wij aannemen, dat de antilichaammoleculen volgens een POISSON-distributie verdeeld zijn, $e^{-1} = 0{,}37$.

Verschillende grootheden, zoals het gemiddelde aantal antilichaammoleculen, dat door de deeltjes van een virussuspensie werd geadsorbeerd en het aantal in een bepaald serum aanwezige equivalenten, werden berekend.

Tegen elke eindpunttechniek en tegen de *pock-counting*-methode hebben DULBECCO en zijn medewerksters het bezwaar, dat het proefsysteem altijd wordt beïnvloed door de met het virus geïntroduceerde antistoffen. De door verschillende auteurs beschreven reactivering ten gevolge van verdunning, zou toe te schrijven zijn aan het uitschakelen van deze voortgezette serumwerking.

De vermeerdering van het virus in opeenvolgende generaties wordt bij de door anderen gebruikte proefopstellingen een functie van de antistofconcentratie. Het eindpunt wordt ten slotte bereikt, wanneer in de cellen geen verdere virusproduktie plaats vindt of de proef op een willekeurig moment wordt beëindigd omdat de proeftijd is afgelopen. Of een systeem al dan niet als besmet wordt beschouwd, hangt er van af of een zeker minimaal aantal cellen geïnfecteerd werd. Zodoende zal de gevonden antistoftiter in belangrijke mate bepaald worden door het vermogen van het gebruikte celsysteem snel en veel smetstof te produceren.

Met behulp van een formule, welke het verband geeft tussen de virusconcentratie aan het begin van de proef en de gebruikte serumverdunning, tracht DULBECCO aannemelijk te maken dat het aantal virusgeneraties dat zich heeft kunnen ontwikkelen de helling van de neutralisatielijn beïnvloedt. En dit aantal zou op zijn beurt zowel bepaald worden door het gebruikte virus, als door de cellen. De helling zou nl. toenemen, wanneer het beschikbare aantal gevoelige cellen groter wordt, een resultaat, dat in overeenstemming is met de proefuitkomsten van TYRRELL en HORSFALL (1953).

In een tweetal kortgeleden verschenen publikaties wordt de juistheid van de interpretatie, welke DULBECCO, VOGT en STRICKLAND aan hun proefuitkomsten gaven, bestreden door enkele Australische onderzoekers. FAZEKAS DE ST. GROTH, WATSON en REID (1958) menen de Amerikaanse waarnemingen op meer bevredigende wijze te kunnen verklaren met behulp van een reactiemodel, waarin de binding van virus en antilichaam wel reversibel is. De beide hulphypothesen van DULBECCO, nl. het bestaan van een niet neutraliseerbare smetstoffractie en antilichaamoverdracht tussen botsende virusdeeltjes, zouden dan overbodig zijn. De opvatting, dat één antistofmolecule in staat is een virusdeeltje te inactiveren, wordt wel onderschreven.

In het algemeen kunnen zowel de Amerikaanse verklaring, als deze zg. dissociatietheorie, het verloop van DULBECCO's kinetische en multipliciteitscurven verklaren. Wat betreft verschillende onderdelen voldoet laatstgenoemde

opvatting echter beter, zoals door FAZEKAS DE ST. GROTH en zijn medewerkers aan de hand van een mathematische uitwerking van verschillende van de Amerikaanse gegevens wordt gedemonstreerd. Van sommige van deze proefuitkomsten kan overigens ook zonder ingewikkelde analyse waarschijnlijk gemaakt worden, dat ze pleiten tegen de hulp-hypothesen. Zo is het bestaan van een tegen elke antistofconcentratie resistente virusfractie in strijd te achten met de praktijk van de immunologie. Daarbij volgt nog uit DULBECCO's gegevens, dat dit deel van de smetstofpopulatie bij gebruik van verschillende immuunsera niet steeds even groot zou zijn.

Volgens de dissociatietheorie zal verdunning van het serum-virusmengsel aanleiding zijn tot virusreactivering. Dit zou het vinden van een schijnbaar resistente fractie wel kunnen verklaren.

Dat DULBECCO in bepaalde proefopstellingen tot foutieve conclusies kwam, wordt toegeschreven aan verschillende omstandigheden, waarvan wij o.a. de volgende willen noemen. Het optreden van dissociatie werd onderzocht in een proefsysteem met belangrijke antistofovermaat. Aangezien de fout ten gevolge van verdunning evenredig zal zijn met het aantal bezette receptoren, werd dit effect bij de gebruikte proefopstelling geheel gemaskeerd. Het systematisch wassen van de weefselcultures na adsorptie van de smetstof zal verder steeds een eenzijdige verdunning van het virus-serumsysteem ten gevolge hebben, welke aanleiding zou kunnen zijn tot verschuiving van het evenwicht.

In een recente publikatie deelt SMORODINTSEV (1957) de resultaten mede, welke in de afgelopen jaren in zijn laboratorium te Leningrad werden verkregen. Deze verschillen in enkele opzichten van de elders gedane waarnemingen.

Volgens de Russische onderzoekers spelen naast andere factoren, temperatuur, thermolabiele specifieke en niet-specifieke remstoffen, alsmede thermostabiele neutraliserende antilichamen een rol bij de bescherming tegen virusinfecties.

De werking van de specifieke antistoffen zou berusten op reversibele adsorptie, die binding van de infectieuze eenheid aan de gevoelige cel zou verhinderen, waarna een niet op enzymatische basis berustend temperatuureffect voor de uiteindelijke inactivering van de smetstof zorg zou dragen.

Met behulp van de ultracentrifuge en door middel van uitwassen op membraanfilters was het mogelijk een aanzienlijk deel van de schijnbaar geneutraliseerde smetstof te reactiveren.

Bij grotere virussen zouden ook thermolabiele inactiverende immuunlichamen van belang zijn.

De mening, dat geneutraliseerd virus niet meer door gevoelige cellen geadsorbeerd zou worden, is in tegenspraak met de door verschillende andere onderzoekers verkregen resultaten.

Volgens HULTIN en MCKEE (1952) wordt influenzavirus na opname van antilichaammoleculen nog wel geadsorbeerd door de cellen van de allantois van het kippeëmbryo, terwijl RUBIN en FRANKLIN (1957) derge-

lijke waarnemingen deden met pseudovogelpestvirus en NAGANA en MUTAI (1954) met een bacteriofaag.

In een publikatie van meer recente datum heeft RUBIN (1957) de inactivering van pseudovogelpestsmetstof door immuunserum nog nader geanalyseerd. Bij dit onderzoek werd gebruik gemaakt van met P^{32} gemerkt virus.

Het infectiositeitsverlies van de smetstof bleek bij adsorptie aan kippeerythrocyten op gelijke wijze te verlopen als bij opname van het virus door voor smetstofvermeerdering geschikte cellen. Bij pseudovogelpestvirus zou opname van een antistofmolecule niet automatisch tot inactivering leiden. Dergelijke smetstof kon nog wel door de cellen worden geadsorbeerd maar penetreerde niet. Het virus was door desintegratie van de cellen terug te winnen; het bleek dan nog gevoelig te zijn voor antistoffen.

De oorspronkelijke publikaties van ANDREWES en ELFORD (1933), alsmede die van BURNET en medewerkers (1937), vermeldden geen complete details van de proefuitslagen waarop de *percentage law* gebaseerd werd. Het is daarom niet mogelijk na te gaan in hoeverre hun resultaten in overeenstemming kunnen zijn geweest met sommige meer moderne theorieën betreffende de virusneutralisatie.

De door BURNET (1937) gebruikte titratiemethode voor de dierpathogene virussen, de *pock-counting*-techniek, staat in nauwkeurigheid waarschijnlijk niet gelijk met de plaque-methode. Later gepubliceerde bijzonderheden van de door BURNET verrichte titraties van vacciniavirus tonen volgens KAPSENBERG (1955) niet de theoretisch te verwachten POISSON-distributie. Ook verschillende andere onderzoekers slaagden er niet in bij enting op de chorioallantoismembraan distributies te verkrijgen, die aan de theoretische verwachtingen voldeden (REID, CRAWLEY en RHODES, 1949; VAN ZWOL, 1948; KAPSENBERG, 1955).

Hiertegenover staat, dat DULBECCO en medewerksters (1956) voor een deel van hun werk wel aannemen dat de aantallen plaques verkregen bij enting van bepaalde virusverdunningen op *monolayer*-cultures verdeeld zijn volgens POISSON, maar de enkele door hen gepubliceerde cijferreeksen lijken hier niet mee in overeenstemming.

De door de meeste andere onderzoekers gebruikte eindpuntmethoden zijn behept met een zo grote mate van onnauwkeurigheid, dat de ermee verkregen resultaten nauwelijks geschikt zijn als basis voor een oordeel over de juistheid van verschillende opvattingen.

In ten minste één opzicht hebben de moderne hypothesen een voordeel boven de oudere theorieën. Verscheidene onderzoekers stelden vast, dat grotere hoeveelheden niet-infectieus antigeen in de bij neutralisatieproeven gebruikte virussuspensies, de proefuitkomsten beïnvloeden. Een dergelijk effect is o.a. beschreven door BEDSON, MAITLAND en BURBURY (1927) bij mond- en klauwzeervirus, welke waarneming later door BROOKSBY (1952) bevestigd werd. MELNICK en OPTON (1956) deden overeenkomstige observaties bij hun onderzoek met poliomyelitisvirus.

In de regel traden moeilijkheden op, doordat smetstofsuspensies werden gebruikt die ten gevolge van bewaren belangrijk in activiteit waren achteruit gegaan.

Indien men de juistheid van de *percentage law* aanneemt, is het onmogelijk deze geringere serumwerking te verklaren, tenzij men zich op het standpunt stelt, dat niet-infectieus virus een vele malen groter bindingsvermogen voor antistoffen zou hebben dan infectieus materiaal. Aanwijzingen die deze veronderstelling zouden kunnen steunen zijn niet bekend.

Wanneer echter niet slechts de gebruikte serumconcentratie, maar het gehalte van beide reactiecomponenten, de graad van neutralisatie bepaalt, is te verwachten dat niet-infectieus virus, dat in staat is antistoffen te adsorberen — zoals blijkt uit de resultaten van KRECH (1956) en ook uit die van DULBECCO, VOGT en STRICKLAND (1956) — de proefuitkomsten zal beïnvloeden.

De hier besproken, door verschillende onderzoekers uitgevoerde, experimenten wijzen uit, dat de neutralisatie van talrijke voor dieren pathogene virussen weliswaar niet steeds op geheel identieke wijze verloopt, maar dat de antilichamen tegen dergelijke smetstoffen deze toch op ten dele overeenkomstige manier aangrijpen. Ook de door injectie van bacteriofaagsuspensies opgewekte antistoffen schijnen, althans gedeeltelijk, op dezelfde wijze met het antigeen te reageren.

Uit de literatuur blijkt verder, dat onze kennis met betrekking tot de reactie tussen het virus en de ertegen gerichte immuunlichamen, nog zeer onvolledig is. Over vele principiële punten bestaan sterk uiteenlopende meningen. Deze verschillen in opvatting blijken dikwijls hun oorsprong te vinden in de door de betreffende onderzoekers gebruikte technieken. De methode van onderzoek kan dus van invloed zijn op de verkregen resultaten.

De thans beschikbare gegevens bevestigen, dat de binding tussen virus en antilichaam in vitro plaats vindt en meestal reversibel is. De bereikte evenwichtstoestand wordt bepaald door de concentraties van de verschillende reactiebestanddelen volgens de wet van de massawerking. Hierbij zal onder andere de aanwezigheid van niet-infectieus antigeen de eindtoestand kunnen beïnvloeden. Volgens verschillende onderzoekers is opname van één antistofmolecule voldoende voor inactivering van een infectieuze eenheid. Bij pseudovogelpestvirus zou dit b.v. echter niet het geval zijn.

Speciaal onze gegevens betreffende het mechanisme van de eigenlijke virusinactivering behoeven dringend aanvulling.

De met betrekking tot de neutralisatie van de mond- en klauwzeersmetstof beschikbare gegevens zijn nog aanzienlijk minder volledig dan die, welke over enkele andere voor dieren pathogene virussen bekend zijn.

III. DE TECHNIEK

1. Inleiding (literatuuroverzicht)

Zoals in de beide voorafgaande hoofdstukken werd aangetoond, zijn de gegevens betreffende het voorkomen en de titer van mond- en klauwzeervirusneutraliserende antistoffen in de sera van reconvalescente en gevaccineerde runderen nog onvolledig en behoeven ook onze inzichten in de werkingswijze van deze afweerstoffen nog verdere aanvulling.

Verschillende voor de bepaling van genoemde immuunlichamen gebruikte technieken werden besproken, waarbij werd gewezen op enkele voordelen van de door Brooksby en Wardle (1954) uitgewerkte methode.

Deze techniek is nl. gevoeliger dan de caviaproef en ze kan ook met succes gebruikt worden voor niet aan dit proefdier geadapteerde virusstammen. Ze vergt minder ruimte en personeel dan de neutralisatieproef met ongespeende muizen en is belangrijk minder arbeidsintensief dan de methoden welke van in vitro gekweekte cellen gebruik maken. Een meer uitgebreide bespreking van het werk van deze onderzoekers en van dat van anderen, die een overeenkomstige werkwijze toepasten, is hier daarom op zijn plaats.

Brooksby en Wardle volgden de door Frenkel ontwikkelde methode voor het kweken van mond- en klauwzeervirus in geëxplanteerd rundertongepitheel.

Aanvankelijk voerden zij de virustitratie uit in series kleine cultuurtjes, die werden aangelegd in van schroefsluitingen voorziene flesjes. Indien hieraan bij het begin van de proef virus was toegevoegd, was het gedurende de incubatie gevormde complementbindende antigeen na enkele dagen in de kweekvloeistof aantoonbaar.

De aanwezigheid van het weefsel bleek geen storende invloed op de afleesbaarheid van deze reactie uit te oefenen. De cultuurtjes werden daarom later aangelegd in uithollingen van perspex tegels, in navolging van een reeds eerder bij het influenza-onderzoek door Fulton en Armitage (1951) toegepaste methode. De complementbindingsreactie werd dan rechtstreeks hierin uitgevoerd. De op deze wijze verkregen resultaten waren vergelijkbaar met die welke met de eerstbeschreven methode werden bereikt.

De tegels bevatten 80 in rijen van 10 gerangschikte uithollingen, elk ongeveer een centimeter diep.

Het perspex werd door behandeling met zoutzuur en bestraling met ultraviolet licht gesteriliseerd. Tenzij schimmelinfecties optraden bleek desinfectie met 1% HCl voldoende. Tijdens de bestraling en ook gedurende het aanleggen van de cultures werden de platen tegen infectie beschermd in een glazen kast.

Bij de toevoeging van de virusverdunningen maakten Brooksby en

WARDLE gebruik van een steriele metalen doos, welke slechts één rij uitholingen tegelijkertijd onbedekt liet (zie afbeelding no. 2 in hun publikatie).

Voor de virustitratie werd een aantal smetstofverdunningen toegevoegd aan series cultuurtjes. De platen werden daarna met een van een rubber binnenrand voorziene deksel gesloten. Ze werden, ten einde vochtverlies tijdens de incubatie te voorkomen, in een van polytheen vervaardigd zakje geplaatst, dat daarna werd dichtgesmolten. Tijdens de kweekperiode werden de cultures voortdurend geschud.

Bij het beëindigen van de proef werd de complementbindingsreactie in de platen uitgevoerd. Indien de aan het begin toegevoegde suspensie mond- en klauwzeervirus bevatte, had dit aanleiding gegeven tot de vorming van complementbindend antigeen, dat nu aangetoond kon worden. Uit de verdeling van geïnfecteerde en niet-geïnfecteerde cultuurtjes over verschillende verdunningen kon een ID_{50} berekend worden.

Als medium gebruikten BROOKSBY en zijn medewerkster het door PARKER (1938) beschreven glucosol, een tyrode-oplossing, welke geen bicarbonaat bevat. Toevoeging van serum aan dit medium bleek geen gunstig effect te hebben op de titratie-uitkomsten.

Bacteriële verontreinigingen konden voldoende onderdrukt worden door toevoeging van penicilline tot een concentratie van 1000 eenheden per ml.

Als weefsel werden de diepere epitheellagen van tongen van gevoelige runderen gebruikt. Dit materiaal werd verzameld volgens een door FRENKEL (1950) beschreven methode. Het werd fijngeknipt en per cultuurtje werden enkele stukjes, in totaal 12 tot 16 mg, toegevoegd aan 0,2 ml medium. Later werd dan in elk cultuurtje nog 0,1 ml virusverdunning gebracht. Enige variatie in de grootte van de gebruikte weefselhoeveelheid had geen invloed op de proefuitslagen.

BROOKSBY en WARDLE (1954) onderzochten de mogelijkheid weefsellagen van verschillende diepte te gebruiken. Zij kwamen hierbij tot de conclusie, dat de meer oppervlakkig gelegen cellen van het stratum spinosum, die bij de gebruikte methodiek samen met het verhoornde epitheel worden losgemaakt, de hoogste titratie-uitkomsten gaven.

Het weefsel bleek meerdere dagen in de ijskast bewaard te kunnen worden, zonder dat dit van invloed was op de verkregen resultaten. Gewoonlijk werd materiaal van meerdere dieren tezamen gebruikt.

Bij een beperkt onderzoek met tongepitheel van runderen van verschillend ras, geslacht en leeftijd bleken deze factoren geen duidelijke invloed op de titratie-uitslagen te hebben.

De kweekduur werd zo gekozen, dat ook indien uiterst kleine hoeveelheden virus werden gebruikt, een voldoend grote hoeveelheid complementbindend antigeen gevormd kon worden om een goed afleesbare reactie te geven.

Bij infectie met slechts enkele ID_{50} treden maximale concentraties van infectieus en complementbindend antigeen later op dan bij gebruik van een

groter inoculum het geval is. Na het bereiken van een top neemt het infectieus vermogen van de cultuur spoedig af, terwijl de hoeveelheid complementbindend antigeen zich volgens meerdere auteurs (UBERTINI, 1956; FRENKEL en RIBELIN, 1956) langere tijd op één niveau handhaaft.

Volgens HENDERSON (1953) en UBERTINI c.s. (1956) stijgt verder het gehalte aan complementbindend antigeen van het medium later dan dat van het weefsel, de hoogste waarden worden in de regel na ongeveer 48 uur bereikt.

BROOKSBY en WARDLE (1945) gebruikten een incubatietijd van 65 uur.

Bij de aan het eind van de kweekperiode uitgevoerde complementbindingsreactie werden achtereenvolgens 0,1 ml serum- en complementverdunning toegevoegd.

Het haemolytisch systeem, dat eveneens in deze hoeveelheid werd gebruikt, bestond uit een 1,7%-suspensie van gesensibiliseerde schape-erythrocyten. De complementconcentratie werd zo gekozen, dat alle erythrocyten, ook in aanwezigheid van weefsel, medium en caviaserum, geheel gelyseerd werden.

Voor en na de toevoeging van het haemolytisch systeem werden de platen een half uur resp. drie kwartier bij 37° C geïncubeerd. Ze werden hierbij op een geperforeerd platform in een van een roerinrichting voorzien waterbad geplaatst. De aflezing werd òf direct na de incubatie verricht, òf vond plaats nadat het reactiesysteem nog enkele uren in de ijskast was bewaard.

De gebruikte complementhoeveelheid kon binnen zekere grenzen gevarieerd worden, zonder dat dit de titratie-uitkomsten beïnvloedde, waaruit BROOKSBY en WARDLE (1954) afleidden dat in de geïnfecteerde cultuurtjes een aanzienlijke hoeveelheid complementbindend antigeen geproduceerd wordt.

Gebruik van overmaat of te weinig complement leidde echter tot onduidelijke uitkomsten.

De bij titratie in overlevend weefsel gevonden virustiters, vertoonden een bevredigende graad van overeenkomst met die, welke men vond indien hetzelfde materiaal door intradermale injectie in de tong van gevoelige runderen werd onderzocht.

Uit enkele neutralisatieproefjes bleek dat ook typedifferentiatie met behulp van dergelijke cultures mogelijk was.

GILLESPIE en FRENKEL (1955) introduceerden de door BROOKSBY en WARDLE uitgewerkte methode in Amsterdam. Hun onderzoek had o.a. betrekking op de mogelijkheid epitheel van geïmmuniseerde dieren voor titratie te gebruiken. Dit weefsel werd een aantal malen in kweekvloeistof gewassen alvorens in de platen te worden gebracht.

Dat dergelijk weefsel geschikt is voor smetstofproduktie in vitro was reeds tevoren door FRENKEL (1953) aangetoond. Het is aan deze mogelijkheid te danken, dat bij de huidige vaccinatietoestand van de Nederlandse rundveestapel de voortzetting van de entstofproduktie mogelijk blijft.

GILLESPIE en FRENKEL gebruikten virusstammen van drie typen. Het weefsel werd op twee verschillende methoden verkregen nl. met behulp van

de door BROOKSBY en WARDLE toegepaste werkwijze en met de meer geperfectioneerde techniek waarmee het epitheel, dat gebruikt wordt voor de virusproduktie op grote schaal, verzameld wordt (FRENKEL, 1951). Bij deze laatste werkwijze wordt van de tong, welke op een metalen trommel is gespannen, met behulp van een snijmachine het epitheel in lagen afgesneden. Het verhoornde oppervlakkige weefsel wordt niet gebruikt, dat van daaronder liggende lagen wordt, indien het voor virustitratie bestemd is, met een schaar verkleind.

De twee methoden werden vergeleken en over het geheel stemden de ermee verkregen resultaten onderling overeen.

Bij proeven met de in Nederland voor de vaccinbereiding gebruikte O-stam werden met glucosol als kweekvloeistof aanzienlijk lagere virustiters verkregen, dan wanneer als medium de gewijzigde BAKER-oplossing werd gebruikt, die in ons land bij de virusproduktie wordt toegepast (FRENKEL, 1955).

Naast penicilline in de concentratie van 1000 I.E./ml was soms toevoeging van 60 tot 70 microgram streptomycine wenselijk. Het bleek mogelijk ook tongepitheel van een rund, dat 6 weken tevoren een mond- en klauwzeerinfectie had doorgemaakt, voor virustitratie te gebruiken, indien het verkleinde weefsel in een grote hoeveelheid vloeistof gewassen werd.

De mogelijkheid weefsel van gevaccineerde runderen te gebruiken voor de virustitratie in vitro, is later door ZAHRAN (1956) en NARDELLI en PERINI (1956) bevestigd.

2. EIGEN METHODE

De door ons gebruikte techniek komt in hoofdzaak overeen met die van GILLESPIE en FRENKEL (1955), hoewel in verschillende onderdelen wijzigingen werden aangebracht.

a. De apparatuur

De perspex tegels zijn gelijk aan de door de eerder genoemde onderzoekers gebruikte.

Ze werden aanvankelijk op de door BROOKSBY en zijn medewerkster (1954) beschreven wijze behandeld. De platen werden daarbij opgeborgen in een 1% HCl-oplossing. In verband met het frequente voorkomen van schimmelinfectie is later overgegaan tot het gebruik van een 10%-oplossing van het zuur. Voor het aanleggen van cultures worden de platen tien keer gespoeld in leidingwater, waarna ze nog een nacht in gedestilleerd water worden geplaatst.

Aan drogen in de broedstoof bij 37° C wordt de voorkeur gegeven boven behandeling in een exsiccator met geconcentreerd zwavelzuur.

Niet alleen is deze werkwijze eenvoudiger, zij voorkomt ook de aantasting

van het plastic, welke optreedt wanneer dit met het zuur in aanraking komt.

De platen worden gesteriliseerd door bestraling in een afgesloten ruimte, waarin een Philips TUV 15W-lamp gemonteerd is. De bestralingsafstand bedraagt circa 45 cm.

Het bleek van belang de duur van deze behandeling te beperken, aangezien stralen van de gebruikte golflengte het plastic aantasten. Het wordt dan ondoorzichtig ten gevolge van het ontstaan van fijne barstjes. Ook door langdurige behandeling met geconcentreeerd zoutzuur en ultraviolet licht is dan geen bevredigende desinfectie meer te verkrijgen.

Bij uitvoering van de complementbindingsreactie in dergelijke beschadigde platen werden onregelmatige proefuitkomsten verkregen, mogelijk doordat, ten gevolge van depolymerisatie van het materiaal en het verlies van Ca^{++} en Mg^{++}-ionen uit het milieu, ook in afwezigheid van specifiek antigeen en immuunserum, de complementactiviteit geremd wordt.

Bij de thans in gebruik zijnde werkwijze nemen de behandeling met ca. 10% zoutzuur en het gebruik van antibiotica, waaronder mycostatine, een belangrijker plaats in dan de sterilisatie met behulp van ultraviolet licht.

Na toevoeging van medium, weefsel en de te onderzoeken virus- en serumverdunningen, worden de platen met gesteriliseerde deksels afgesloten. Tijdens de ongeveer 65 uur durende bebroeding bij 37° C worden de cultures in polytheenzakjes (Drakatyleen-naadloze buis van 0,05 mm dikte) tegen uitdroging beschermd. Ze worden continu geschud. Hiertoe zijn 2 verschillende apparaten gebruikt, die beide bevredigende en onderling vergelijkbare resultaten gaven.

In het ene geval was de beweging circulair met 140 slagen per minuut en een uitslag van ongeveer 2 cm. Het tweede apparaat, dat plaats biedt aan een groter aantal platen, bestaat uit een metalen doos, die door een hefboom, welke door middel van een excentriek gekoppeld is aan een elektromotor, een kantelende beweging over een hoek van ca. 90° maakt. De frequentie bedraagt hier 28 per minuut.

b. Het kweekmedium

Als medium voor het in leven houden van het weefsel, zowel als voor het maken van alle verdunningen, wordt de door FRENKEL (1955) gewijzigde voedingsvloeistof van BAKER gebruikt. De samenstelling van deze, grotendeels synthetische oplossing, blijkt uit tabel 1.

De eerste vijf aminozuren worden in warm water opgelost. Het medium wordt door filtratie gesteriliseerd.

De pH van de vloeistof wordt voor gebruik elektrometrisch bepaald en indien nodig, door toevoeging van isotonische NaOH- of HCl-oplossing, op een waarde van 7,6 gebracht.

Wanneer naast 1000 I.E. penicilline, per ml 50 microgram dihydrostreptomycinesulfaat en een zelfde hoeveelheid aureomycine werd toegevoegd,

TABEL 1. Samenstelling van het kweekmedium

l-histidine monohydrochloride	0,037 g
dl-tryptophaan	0,970 g
dl-phenylalanine	0,049 g
l-leucine	0,127 g
dl-methionine	0,194 g
l-arginine monohydrochloride	0,049 g
l-lysine hydrochloride	0,194 g
dl-threonine	0,083 g
l-cysteine hydrochloride	0,121 g
niacine	0,970 mg
d-calcium pantothenaat	0,243 mg
haemine	0,035 mg
thyroxine	0,008 mg
insuline	0,870 I.E. — *I.U.*
pepton	2,910 g
glucose	0,970 g
NaCl	7,000 g
KCl	0,175 g
$CaCl_2$ anh.	0,175 g
$MgCl_2$. $6H_2O$	0,087 g
NaH_2PO_4	0,120 g
Na_2HPO_4.$12H_2O$	1,055 g
$NaHCO_3$	0,970 g
Aqua dest.	ad 1000 ml

TABLE 1. *Composition of the tissue culture medium*

bleek het mogelijk de voordien nog sporadisch optredende bacteriële verontreinigingen geheel te onderdrukken. Ter bestrijding van schimmelinfecties wordt mycostatine in de concentratie van 100 eenheden per ml gebruikt.

Volgens WIGMORE en HENDERSON (1955) is deze stof werkzaam tegen vele gisten, welke normaal in de mondholte van het rund voorkomen. In lage concentraties is ze volgens deze auteurs niet toxisch voor tongepitheel.

In enkele gevallen deden zich schimmelinfecties voor, waartegen mycostatine in de gebruikte concentratie niet voldoende actief bleek. Het was echter in al deze gevallen mogelijk een herhaald optreden van deze verontreinigingen te voorkomen, door de voor het bewaren van de platen gebruikte HCl-oplossing te vervangen door een vers bereide, zodat het vermoeden gewettigd lijkt, dat de besmetting niet van het weefsel afkomstig was.

Per cultuurtje wordt een hoeveelheid medium van 0,2 ml gebruikt, welke met een geijkte druppelpipet in de platen wordt gebracht. Het weefsel wordt daarna met een spateltje toegevoegd.

c. Het weefsel

Voor het verzamelen van het epitheel bleek de door FRENKEL (1951) voor massaal gebruik ontwikkelde techniek goed te voldoen. De, bij voorkeur van

gevoelige dieren verkregen, rundertongen worden na oppervlakkige reiniging met lauw water op een metalen trommel gespannen. De bacteriële verontreiniging van het oppervlak wordt door borstelen met 70% alcohol en een kortdurende bestraling met bacteriedodende lampen gereduceerd. Met behulp van een snijmachine wordt daarna door geroutineerd personeel het oppervlakkige verhoornde weefsel verwijderd. De diepere epitheellagen worden afgesneden en opgevangen in de kweekvloeistof. Ze worden gewoonlijk in deze vorm voor de virusproduktie gebruikt. Voor het aanleggen van het grote aantal kleine cultuurtjes dat bij titraties gebruikt wordt, is evenwel verkleining van het weefsel tot stukjes van enkele kubieke millimeters noodzakelijk. Door meerdere stukjes te gebruiken in elk van de cups, is het mogelijk de verschillen tussen de op één dag aangelegde cultuurtjes, voor zover deze het gevolg zijn van uiteenlopende levensvatbaarheid of van ongelijke gevoeligheid van weefsel, afkomstig van verschillende gedeelten van één tong, tot een minimum terug te brengen. Gewoonlijk wordt materiaal van 2 of meer dieren tezamen gebruikt. Zoals door GILLESPIE en FRENKEL (1955) werd aangegeven, is wassen van het, in ons land in de regel van immune dieren afkomstige weefsel, noodzakelijk. Het verkleinde epitheel wordt daartoe 8 tot 10 maal gesuspendeerd in steriele kweekvloeistof, welke wordt afgegoten nadat het weefsel is gesedimenteerd. In de regel is na vijf of zes maal verversen, met ESBACH's reagens of met sulfosalicylzuur in deze vloeistof geen eiwit meer aantoonbaar. Na de laatste maal wassen worden weefsel en vloeistof gescheiden door gedurende enkele minuten bij ongeveer duizend omwentelingen per minuut te centrifugeren in een met een dop afgesloten buis.

Gedurende de gehele behandeling van het epitheel worden de nodige maatregelen genomen om infectie vanuit de lucht tot een minimum te beperken.

d. Het virus

Bij het onderzoek werd hoofdzakelijk gewerkt met O-smetstof. Het virus werd in vitro gekweekt in overlevend tongepitheel. Er werd gebruik gemaakt van materiaal van de 326ste t/m 386ste passages in vitro van de, oorspronkelijk van een rund afkomstige, stam.

Nadat virus van de 197ste passage nog eens op gevoelige ossen was doorgeënt, zijn ook nog de met dit materiaal als zaaivirus aangelegde 1ste t/m 6de passages in vitro gebruikt.

In vele gevallen was voor de doorentingen in cultuur slechts weefsel van gevaccineerde runderen beschikbaar, hoewel een wisselend aantal passages over epitheel van gevoelige dieren was voorafgegaan.

Het virus werd 20 uur na het aanleggen van de cultuur geoogst. Het weefsel werd met kwarts in een mortier verwreven of op andere wijze verkleind en vervolgens gesuspendeerd in het medium. Na centrifugeren werd de bovenstaande vloeistof gefiltreerd door een Seitz EKS-filter.

Aanvankelijk gebruikten wij, in navolging van BROOKSBY (1949), zoveel mogelijk verse virussuspensies. Daartoe werd een of tweemaal per week een nieuw virusfiltraat bereid, dat dan slechts enkele dagen in de koelkast werd bewaard. Meer bevredigende resultaten werden verkregen, indien voor de filtratie aan de suspensie enkele procenten runderalbumine werden toegevoegd en de smetstof daarna bij –30° C werd bewaard. Een dergelijke werkwijze werd reeds eerder door MACKOWIAK, GIRARD en LANG (1954) beschreven, het virus is maanden houdbaar, zonder dat de infectiositeit afneemt.

Bij enkele proeven met een virusstam van het C-type werd gebruik gemaakt van materiaal van de 4de passage in vitro in weefsel van gevoelige runderen van de stam C-Odoorn, terwijl voor proeven met het A-type de 469ste overenting van de voor de vaccinbereiding gebruikte stam, eveneens in gevoelig weefsel, werd gebruikt.

Teneinde langere tijd de beschikking te hebben over materiaal van zoveel mogelijk constante samenstelling, werd de steriele virussuspensie in hoeveelheden van enkele milliliters, in van schroefsluitingen voorziene flesjes opgeborgen. Eenmaal ontdooide smetstof werd dezelfde dag verbruikt.

In de meeste gevallen werden alle verdunningen gemaakt met behulp van kweekvloeistof van pH 7,6, waaraan penicilline en dihydrostreptomycinesulfaat waren toegevoegd.

Daar in enkele experimenten de indruk werd verkregen, dat de aanwezigheid van serum in het milieu een beschermende werking op het verdunde virus had, is later overgegaan tot het gebruik van een verdunningsvloeistof waaraan 2% geïnactiveerd paardeserum was toegevoegd.

Er werden twee verschillende proefopstellingen gebruikt voor het uittitreren van de smetstof. Bij de eerste, welke het meest is toegepast, werd 1 ml van het in ijswater ontdooide virus met een steriele 1-milliliterpipet toegevoegd aan een 9 ml verdunningsvloeistof bevattende buis, waaruit na grondig mengen met een schone pipet opnieuw 1 ml werd overgebracht in een buis met 9 ml vloeistof. Deze laatste bevatte dus het uitgangsmateriaal in de verdunning 10^{-2}. Tevens werd de verdunning $10^{-1,5}$ bereid door met een 5-milliliterpipet 3,16 ml uit de eerste buis te brengen in een buis met 6,84 ml verdunningsvloeistof. Vanuit de buizen met de verdunningen $10^{-1,5}$ en 10^{-2} werden dan verdunningsreeksen gemaakt met telkens 10-voudig interval, zodat de virusverdunningen 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4} enz., en $10^{-1,5}$, $10^{-2,5}$, $10^{-3,5}$, $10^{-4,5}$, $10^{-5,5}$ en $10^{-6,5}$ beschikbaar waren. In sommige proeven is van dit schema afgeweken, in die zin dat de verdunning $10^{-1,5}$ niet gebruikt werd. De tweede serie werd dan op analoge wijze klaargemaakt als bovenomschreven, maar de eerste buis van de tweede reeks bevatte de verdunning $10^{-2,5}$.

In een deel van de proeven is verder een eenvoudiger opstelling gebruikt, waarbij een enkele serie met alleen 10-voudig interval, dus $10^{-1,0}$, $10^{-2,0}$, enz., werd toegepast.

In alle gevallen wordt er zorg voor gedragen, dat voor het mengen en voor het overbrengen van een volume vloeistof naar de volgende buis, een schone steriele pipet wordt gebruikt.

Buizen met virusverdunningen worden in ijswater bewaard tot het ogenblik van toevoeging van het serum.

e. De sera

De neutralisatieproef werd voornamelijk gebruikt voor het onderzoek van rundersera. Het bloed wordt in de regel door venapunctie gewonnen. Het serum wordt door centrifugeren van fibrine en cellen gescheiden, het wordt geïnactiveerd en daarna in van schroefsluitingen voorziene flesjes bij −30° C bewaard. Het wordt op analoge wijze als het virus verdund.

Virus en serum-virusmengsels worden in de platen gebracht met behulp van 1 ml-pipetten, verdeeld in 100sten. Per cultuurtje wordt 0,1 ml toegevoegd. Voor elke virustitratie wordt een aparte pipet gebruikt. De suspensie welke het virus in de laagste concentratie bevat, wordt het eerst aan de cultuurtjes toegevoegd, daarna wordt de pipet uitgeblazen en enkele malen doorgezogen met de vloeistof van de volgende lagere verdunning.

De titratie-eindpunten worden berekend volgens de methode van REED en MUENCH (1938). De titers van de onderzochte sera worden uitgedrukt als het aantal door een bepaalde serumverdunning in de gebruikte proefopstelling geneutraliseerde ID_{50}, welke waarde wordt berekend uit het verschil tussen het verdunningseindpunt van het virus alleen en dat van de smetstof in aanwezigheid van het serum in de onderzochte concentratie. Beide proeven worden gelijktijdig uitgevoerd met eenzelfde weefselsuspensie.

f. De complementbindingsreactie

Aan het eind van de incubatieperiode wordt de complementbindingsreactie rechtstreeks in de platen uitgevoerd.

Per cultuurtje wordt 0,1 ml verdund cavia-immuunserum en een gelijke hoeveelheid complementverdunning toegevoegd.

Het O-serum wordt als volgt bereid. Een aantal vrouwelijke caviae van 400 tot 500 gram wordt subcutaan geënt met 4,0 ml van het voor runderen gebruikte vaccin, waarbij deze dosis verdeeld wordt over twee injectieplaatsen. Na ongeveer zes weken worden de dieren intraplantair geïnfecteerd met het aan caviae geadapteerde virus. Na nogmaals twee weken wordt van enkele van de dieren door middel van hartpunctie een serummonster verzameld. Dit wordt onderzocht op het gehalte aan complementbindende typespecifieke antilichamen met een proefopstelling, waarin alle reactiecomponenten worden gebruikt in de verhouding, waarin ze ook in de plastic tegels worden toegepast.

Het door verwarming gedurende een half uur op 56° C geïnactiveerde serum wordt daarbij tot 1/10 verdund in fysiologische zoutoplossing. In een

serie buizen worden hiervan hoeveelheden van 0,25; 0,20; 0,16; 0,12; 0,08; 0,06; 0,04 en 0,02 ml gedaan. Nadat in alle buisjes het volume op 0,25 ml is gebracht door middel van een 0,85% NaCl-oplossing, worden achtereenvolgens 0,75 ml van een O-antigeensuspensie en 0,25 ml van een 2%-complementverdunning toegevoegd.

Als antigeen dient een suspensie van in vitro gekweekt virus. De buizen worden 30 minuten in een waterbad bij 37° C geplaatst, waarna 0,25 ml haemolytisch systeem wordt toegevoegd. Dit bevat gewassen schape-erythrocyten in de concentratie van 1,7%, terwijl de hoeveelheid amboceptor zo wordt gekozen dat de rode bloedcellen maximaal gesensibiliseerd worden. Het haemolytisch systeem wordt gedurende 20 minuten in een waterbad bij 37° C gesensibiliseerd, voordat het aan de buizen wordt toegevoegd.

Aflezing van de reactie vindt plaats nadat de rekjes nog eens een half uur zijn geïncubeerd. Als eindpunt wordt genomen de serumhoeveelheid, in aanwezigheid waarvan nog juist geen haemolyse optreedt.

Bij deze proef worden de volgende controles gebruikt. Aan twee buizen wordt antigeen, doch geen serum, toegevoegd. In een ervan wordt de gebruikelijke hoeveelheid complement gedaan, in de andere de halve dosis. In een tweetal andere buizen wordt het serum in de verdunning 1/10 onderzocht ten opzichte van A- en C-antigeen.

De beide eerste buizen dienen voor het vaststellen van eventuele anticomplementaire eigenschappen van het antigeen, alsmede ter controle van de complementactiviteit. Alleen bij gebruik van de kleine dosis complement zal de haemolyse in de regel incompleet zijn. De laatste twee buizen hebben tot doel complementbindende antilichamen tegen andere dan het onderzochte virustype — indien deze aanwezig zijn — aan te tonen. Het gebruik van een voldoend specifiek immuunserum biedt het voordeel, dat eventuele verontreinigingen met mond- en klauwzeervirus van een ander type dan het onderzochte, geen aanleiding kunnen geven tot niet-specifieke positieve reacties.

Bij een bevredigende uitslag van de proef worden de caviae door verbloeding gedood. Het bloed wordt opgevangen en het eruit verkregen serum na inactivering geconserveerd door toevoeging van 10% van een 1‰ merthiolaatoplossing. Het serum wordt bewaard in de koelkast. De titratie van het cavia-immuunserum schept de mogelijkheid, die serumverdunning te selecteren welke nog in staat is al het gebruikte complement te binden in aanwezigheid van een overmaat specifiek antigeen.

De meeste cavia-immuunsera geven in de gebruikte proefopstelling in de verdunning van 1/30 of hoger nog een positieve reactie. Voor de aflezing van de proef in de plastic platen wordt een 2- tot 3-voudige overmaat gebruikt. Besparing van typespecifiek serum is van belang i.v.m. de betrekkelijk grote hoeveelheden, welke nodig zijn bij routinegebruik van de methode.

De hier aangegeven werkwijze voor de bereiding van typespecifieke cavia-immuunsera is aanzienlijk eenvoudiger dan de in de meeste andere

laboratoria gebruikelijke, waarbij een aantal intramusculaire of intraveneuze injecties van geconcentreerde antigeensuspensies gegeven wordt (zie o.a. BROOKSBY, 1952).

Mogelijk ten gevolge van nauwe verwantschap tussen de voor de vaccinbereiding gebruikte virusstam en het aan caviae geadapteerde virus — een relatie welke o.a. ook blijkt uit de goede protectie die het voor runderen bestemde vaccin aan caviae verleent, ook tegen infectie met caviavirus — zijn de resultaten bij gebruik van O-smetstof in de regel bevredigend.

De uitkomsten, verkregen met stammen van de beide andere in Europa voorkomende virustypen, zijn enigszins minder gunstig. Om deze reden werd het onderzoek in eerste instantie tot het O-type beperkt.

Als complement wordt een 2 of 2½%-verdunning van normaal caviaserum in fysiologische zoutoplossing gebruikt. 0,1 ml hiervan bevat in de regel meer dan tweemaal de hoeveelheid, die nodig is om alle in het haemolytisch systeem toegevoegde schape-erythrocyten te lyseren. Het complement wordt verkregen door bloed van 5 of 6 nuchtere mannelijke dieren te mengen en het serum te verzamelen. Dit wordt in kleine hoeveelheden ingevroren. Het is dan meerdere maanden houdbaar. Op deze wijze verkregen complementoplossingen kunnen wel enigszins in activiteit uiteenlopen, maar deze verschillen zijn niet van dien aard, dat ze zich storend merkbaar maken bij de uitvoering van de proef.

Na toevoeging van complement en serum aan de platen worden deze een half uur in een waterbad bij 37° C geïncubeerd. Het bad is voorzien van een geperforeerd platform, ongeveer 1 cm onder de waterspiegel gelegen, waar de tegels op worden geplaatst. Een roterende vin draagt zorg voor een gelijkmatige temperatuur van het water.

Aan het einde van deze eerste incubatieperiode worden de tegels uit het waterbad genomen. Ze worden dan ongeveer 15 minuten bij kamertemperatuur geplaatst, waarna het haemolytisch systeem in een hoeveelheid van 0,1 ml met een druppelpipet wordt toegevoegd. Daarna wordt opnieuw geïncubeerd.

De proef wordt afgelezen na 15, 30 en 45 minuten. Ongeveer 15 minuten nadat in de gelijktijdig uitgevoerde virustitratie een duidelijk reactiepatroon is waar te nemen, wordt de definitieve aflezing gedaan.

Oorspronkelijk werd de door BROOKSBY (1954) aangegeven tijd van 45 minuten ook door ons in acht genomen. Bij gebruik van weefsel van kortgeleden gevaccineerde dieren en bij onderzoek van bepaalde rundersera verloopt de haemolyse soms echter wat sneller, zodat dan na 45 minuten, ook indien de cultuurtjes met grote virushoeveelheden beënt zijn, de erythrocyten geheel of ten dele gelyseerd blijken. In dergelijke gevallen is meestal wel bij een eerder verrichte aflezing een duidelijk patroon waar te nemen.

Speciaal met het oog op deze mogelijkheid worden de platen enige tijd bij kamertemperatuur geplaatst voordat het haemolytisch systeem wordt

toegevoegd. De temperatuurdaling remt de complementactiviteit, zodat de haemolyse tijdens het toevoegen van het haemolytisch systeem aan de cultuurtjes vertraagd verloopt. De invloed van de tijd, welke nodig is om alle cups van haemolytisch systeem te voorzien, wordt zodoende verminderd.

g. De controles

Aanvankelijk werd bij elke proef gecontroleerd of weefsel of medium een storend effect hadden op de complementbindingsreactie. Toen bleek, dat dit nooit het geval was, en dat ook de geïnactiveerde rundersera in de gebruikte concentratie geen anticomplementaire invloed van betekenis hadden, zijn deze controles achterwege gelaten.

3. Onderzoek ter verbetering van de techniek

Bij het onderzoek naar de mogelijkheid om de door Brooksby en Wardle (1954) beschreven methode te ontwikkelen tot een, onder de Nederlandse omstandigheden, voor routinegebruik geschikte neutralisatieproef, diende aandacht geschonken te worden aan verschillende aspecten van genoemde techniek. Achtereenvolgens werden daarom in verschillende proeven een aantal onderdelen nader onderzocht.

a. De betekenis van het verdunningsinterval voor de nauwkeurigheid van de smetstoftitratie

De waarde van een kwantitatieve bepalingsmethode is, behalve van de gevoeligheid, in belangrijke mate afhankelijk van de nauwkeurigheid van de ermee verkregen uitkomsten.

Bij virustitraties wordt de gevoeligheid van een methode in de regel direct bepaald door het gebruikte proefsysteem, terwijl de betrouwbaarheid van de verkregen resultaten o.a. mede afhankelijk is van de proefopstelling. Factoren welke naast deze laatste van betekenis zijn, zijn de, in de regel geringe maar onvermijdelijke proeffouten, welke gemaakt worden bij het afmeten van volumina, en variaties in de gevoeligheid van het voor het aantonen van de smetstof gebruikte proefmateriaal.

De distributie van de infectieuze eenheden over verschillende monsters is afhankelijk van het toeval en het is deze potentiële foutenbron, welke te beïnvloeden is door de gekozen proefopstelling, met name door het gebruikte verdunningsinterval en het aantal gevoelige dieren of cultures beschikbaar voor iedere te onderzoeken suspensie.

Aan verschillen in gevoeligheid van het op één dag gebruikte weefsel behoeft onder onze gebruikte omstandigheden slechts een beperkte betekenis te worden toegekend. Zolang van één weefselsuspensie gebruik

wordt gemaakt, zullen door de aanwezigheid van meerdere epitheelstukjes per cultuurtje, alsmede door het mengen van het weefsel, dat tijdens het verkleinen van het epitheel plaats vindt, de tussen gelijktijdig aangelegde cultuurtjes bestaande verschillen in weefselkwaliteit tot een minimum beperkt blijven.

Naarmate een kleiner interval gebruikt wordt, of per verdunning een groter aantal cultures of proefdieren beschikbaar is, neemt de nauwkeurigheid waarmede een eindpunt bepaald kan worden, toe.

Er diende naar gestreefd te worden op zo economisch mogelijke wijze, dus met een minimaal aantal cultuurtjes, een zo groot mogelijke nauwkeurigheid te bereiken.

Daar de neutralisatieproef in principe een vergelijking van virustitraties is, gelden hiervoor in het algemeen ten aanzien van bovengenoemde punten dezelfde overwegingen.

In de regel gebruikt men bij kwantitatieve virusbepalingen een reeks 10-voudige verdunningen. Het leek gewenst na te gaan in hoeverre het mogelijk was, de met behulp van het beschikbare proefsysteem verkregen resultaten te verbeteren, door dit interval te verkleinen. Hiertoe werden tussen november 1954 en maart 1955 een aantal proeven uitgevoerd.

Op verschillende dagen werd weefsel, afkomstig van een of meer tongen van Nederlandse slachtrunderen, op de gebruikelijke manier verzameld, verkleind, en na wassen over een aantal perspex platen verdeeld. Er werden in de loop van de experimenten verschillende smetstofsuspensies onderzocht. Het virus werd telkens op één bepaalde tong in duplo getitreerd, waarbij voor iedere verdunning van elk van de titraties een 10-tal cultuurtjes werd gebruikt. In een deel van de proeven werden de verdunningen $10^{-4,5}$, $10^{-5,0}$, $10^{-5,5}$, $10^{-6,0}$ en $10^{-6,5}$ onderzocht, in een ander deel alleen $10^{-5,0}$, $10^{-6,0}$ en $10^{-7,0}$.

De platen werden op de gebruikelijke wijze geïncubeerd en de proeven werden na drie dagen afgelezen.

Voor elke titratie werd een eindpunt berekend, zodat voor iedere smetstofsuspensie per tong twee schattingen voor de virustiter, uitgedrukt als de negatieve logaritme van de ID_{50}, verkregen werden.

Bij gebruik van een drievoudig verdunningsinterval (0,5 log interval), was het verder mogelijk een schatting te maken van de ID_{50}, welke gevonden zou zijn indien dezelfde proef met een 10-voudig verdunningsinterval was uitgevoerd.

Verschillen tussen de beide voor één tong gevonden waarden konden nu veroorzaakt worden door meerdere factoren nl.:

1. Ongelijke gevoeligheid van cultuurtjes aangelegd met weefsel van een bepaald dier.
2. Variaties in de virusdistributie ten gevolge van het toeval. Deze kunnen zowel optreden bij het nemen van monsters uit de buizen welke de verdunde smetstof bevatten, als bij de verdeling van deze vloeistof over de series cultuurtjes

3. Fouten gemaakt bij het afmeten van de per cultuurtje toegevoegde hoeveelheid virusverdunning.

Zoals reeds eerder werd vermeld zijn vooral de onder 2 en 3 genoemde invloeden oorzaak van verschillen tussen de uitkomsten van overigens gelijke proeven. Teneinde inzicht te krijgen in de betekenis van deze factoren werden de verkregen resultaten onderzocht met behulp van variantie-analyse, waardoor het niet slechts mogelijk was een schatting te maken van de door de genoemde invloeden bij verschillende proefopstellingen veroorzaakte variabiliteit, wanneer één weefselsuspensie werd gebruikt, maar ook van die, welke optrad wanneer een bepaalde smetstof gelijktijdig in weefsel van verschillende dieren werd getitreerd.

De tabellen 2 en 3 geven een overzicht van de proefuitkomsten.

Voor tabel 2 is, bij een totaal aantal waarnemingen van 42 en een aantal tongen van 19 (n), de variantie-analyse van tabel 4 op te stellen.

TABEL 2. Voor verschillende virussuspensies gevonden titratie-eindpunten bij gebruik van een tienvoudig verdunningsinterval. De eindpunten zijn aangegeven als de negatieve logaritme van de ID_{50}.

Proefnummer	1			2	3			*No. of test*
Tong	1	2	3	1	1	2	3	*No. of tongue*
Eindpunt								*End-point*
1e titratie	6,1	5,8	5,8	5,8	4,6	4,9	4,8	*1st titration*
2e titratie	6,3	5,9	5,7	5,5	4,9	4,3	4,4	*2nd titration*

Proefnummer	4		5		6	7		*No. of test*
Tong	1	2	1	2	1	1	2	*No. of tongue*
Eindpunt								*End-point*
1e titratie	6,1	6,4	4,4	5,2	5,6	5,1	5,3	*1st titration*
2e titratie	5,7	6,7	4,5	5,0	6,0	5,3	5,6	*2nd titration*
3e titratie				4,8				*3rd titration*
4e titratie				5,0				*4th titration*

Proefnummer	8	9		10	11		*No. of test*
Tong	1	1	2	1	1		*No. of tongue*
Eindpunt							*End-point*
1e titratie	4,7	5,4	4,6	6,1	6,1		*1st titration*
2e titratie	5,4	5,7	4,8	6,0	5,7		*2nd titration*
3e titratie				6,1	5,8		*3rd titration*

TABLE 2. *Virus titration end-points obtained with a tenfold dilution interval. End-points are expressed as the negative logarithm of the* ID_{50}.

TABEL 3. Voor verschillende virussuspensies gevonden titratie-eindpunten bij gebruik van een drievoudig verdunningsinterval. De eindpunten zijn aangegeven als de negatieve logaritme van de ID_{50}.

Proefnummer	2		3			*No. of test*
Tong	1	2	1	2	3	*No. of tongue*
Eindpunt						*End-point*
1e titratie	5,4	5,4	4,7	4,7	4,7	*1st titration*
2e titratie	5,7	5,4	4,7	4,6	4,6	*2nd titration*

Proefnummer	4		10	11		*No. of test*
Tong	1	2	1	1		*No. of tongue*
Eindpunt						*End-point*
1e titratie	6,0	6,3	6,1	5,9		*1st titration*
2e titratie	5,9	6,6	6,1	5,6		*2nd titration*
3e titratie			5,9	5,8		*3rd titration*

TABLE 3. *Virus titration end-points obtained with a threefold dilution interval. End-points are expressed as the negative logarithm of the ID_{50}.*

TABEL 4. Variantie-analyse van de uitkomsten van tabel 2

	Som der kwadraten	Aantal vrijheids-graden	Variantie	
Variatie "binnen tongen"	1,14	23	0,049	*Variation "within tongues"*
Variatie tussen virusmonsters onderzocht op verschillende dagen	12,81	10	1,281	*Variation between virus samples tested on different days*
Variatie tussen tongen onderzocht op één dag	1,87	8	0,235	*Variation between tongues tested on the same day*
Totaal	15,82	41		*Total*
	Sum of squares	*Degrees of freedom*	*Variance*	

TABLE 4. *Analysis of variance of table 2*

De waarde berekend voor de variantie „binnen tongen" (0,049) levert een schatting voor de standaardafwijking van een eindpunt gevonden met behulp van een bepaalde epitheelsuspensie van $\sqrt{0,049} = 0,22$ (logaritmische schaal).

Waren behalve de hierboven genoemde invloeden alleen toeval en kleine fouten, gemaakt bij het verdelen van de smetstof over de cultures, in het spel, dan zouden ook de beide andere schattingen van de variantie een uitkomst van ongeveer 0,049 gegeven hebben. De werkelijk gevonden waarden liggen echter aanzienlijk hoger.

Deze cijfers zijn gebaseerd op een betrekkelijk gering aantal experimenten, ze behoeven daarom niet algemeen geldig te zijn.

Toch wijzen de belangrijk hogere uitkomsten, welke verkregen werden indien ook de variabiliteit, welke optrad bij gebruik van verschillende tongen, in de berekening werd betrokken, erop dat deze factor een variatiebron van betekenis zou kunnen zijn.

De resultaten van een kleine proef, waarbij twee virussuspensies elk getitreerd werden in weefsel van op dezelfde dag ontvangen en op gelijke wijze behandelde tongen, wijzen in dezelfde richting. Deze uitkomsten worden weergegeven in tabel 5.

TABEL 5. Titratie-eindpunten verkregen bij onderzoek van één smetstofsuspensie in tongepitheel van verschillende runderen

Virus-suspensie	Tong		
	1	2	3
701	5,8	< 4,3	4,4
704	5,6	< 4,3	4,4
Virus suspension	*1*	*2*	*3*
	No. of tongue		

TABLE 5. *Virus titration end-points obtained with tongue epithelial tissue of different animals*

Het zal noodzakelijk blijken op het probleem, dat gesteld wordt door dit verschil in gevoeligheid van weefsel van verschillende dieren, elders nog nader in te gaan.

Een variantie-analyse van tabel 3 wordt in tabel 6 gegeven.

De beste schatting voor de standaardafwijking van een eindpunt gevonden met een bepaalde weefselsuspensie en bij gebruik van een ongeveer drievoudig verdunningsinterval blijkt $\sqrt{0,016} = 0,128$ te zijn. De waarde van

TABEL 6. Variantie-analyse van de uitkomsten van tabel 3

	Som der kwadraten	Aantal vrijheids-graden	Variantie	
Variatie "binnen tongen"	0,18	11	0,016	*Variation "within tongues"*
Variatie "tussen tongen"	7,47	8		*Variation "between tongues"*
Totaal	7,65	19		*Total*
	Sum of squares	*Degrees of freedom*	*Variance*	

TABLE 6. *Analysis of variance of table 3*

de variantie „binnen tongen" (0,016) ligt belangrijk lager dan die welke gevonden werd bij gebruik van een tienvoudig verdunningsinterval.

De standaardfout van het verschil tussen twee met 0,5 log interval in één weefsel uitgevoerde titraties van één virussuspensie zal nu bedragen: $\sqrt{2 \times 0{,}016} = 0{,}18$.

Hieruit kan geconcludeerd worden, dat bij met een bepaalde epitheelsuspensie uitgevoerde virustitraties een verschil van tweemaal dit bedrag, dus 0,36, met een waarschijnlijkheid van 95% als significant is op te vatten.

HENDERSON (1949) en BROOKSBY (1949) menen dat, indien bij een titratie het per verdunning onderzochte aantal proefmonsters verdubbeld wordt, de standaardafwijking van het eindpunt $1/\sqrt{2} \times$ zo groot wordt.

Indien bij een tienvoudig verdunningsinterval het per verdunning gebruikte aantal cultuurtjes van tien op twintig zou gebracht worden, kan de standaardafwijking van het gevonden eindpunt geschat worden op $0{,}22/\sqrt{2} = 0{,}157$, een waarde welke dus nog duidelijk hoger ligt dan die verkregen met een in totaal kleiner aantal cultuurtjes en een circa drievoudige verdunningenreeks.

Daarom werd, zowel bij titraties als bij neutralisatieproeven, in de regel deze laatste proefopstelling toegepast.

b. De invloed van inactiveren van het serum op het neutralisatievermogen

De in enkele proeven onderzochte caviasera waren alle geïnactiveerd daar, afgezien van de mogelijkheid dat de aanwezigheid van caviacomplement invloed zou kunnen uitoefenen op het neutralisatieproces, het mogelijk leek dat deze serumbestanddelen de aflezing van de proef zouden kunnen storen.

Wat betreft het voorkomen van fracties met complementeigenschappen

TABEL 7. Anticomplementair effect van niet-geïnactiveerd runderserum

PROEFOPSTELLING [1] — *Arrangement of the test* [1] *:*							
Medium	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	*Tissue culture fluid*
Complement 1,5%	—	0,05	0,10	0,15	0,20	0,25	*Complement*
Fysiologische zoutoplossing	0,40	0,35	0,30	0,25	0,20	0,15	*Saline*
Runderserum [2]	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	*Cattle serum* [2]
Haemolitisch systeem	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	*Hemolytic system*
Incubatie ½ uur bij 37° C — *Incubation 30 min. at 37° C*							
RESULTAAT — *Result:*							
Complementtitratie	+++	+++	+	—	— —		*Complement titration*
Complementtitratie i.a.v. serum 53 geïnactiveerd	+++	+++	+	+	— —		*Complement titration with heated serum no. 53*
i.a.v. het niet-geïnactiveerde serum	+++	+++	++	++	+ —		*Complement titration with unheated serum no. 53*
Complementtitratie i.a.v. serum 59 geïnactiveerd	+++	+++	—	—	— —		*Complement titration with heated serum no. 59*
i.a.v. het niet-geïnactiveerde serum	+++	+++	++	+	— —		*Complement titration with unheated serum no. 59*
Complementtitratie i.a.v. serum 60 geïnactiveerd	+++	+++	+	—	— —		*Complement titration with heated serum no. 60*
i.a.v. het niet-geïnactiveerde serum	+++	+++	++	+	+ —		*Complement titration with unheated serum no. 60*

[1] Alle volumina zijn opgegeven in milliliters
All volumes are given in milliliters.
[2] Het serum werd onderzocht in de verdunning 1/20
The serum was tested in the dilution 1/20.

+++ = geen haemolyse — *no hemolysis*
++ = duidelijke haemolyse — *visible hemolysis*
+ = sterke haemolyse, een deel van de cellen blijft echter over — *incomplete hemolysis*
— = totale haemolyse — *total hemolysis.*

TABLE 7. *Anticomplementary effect of unheated cattle serum*

in sera van runderen, lopen de meningen van verschillende auteurs uiteen.

FREDERIKS (1949) beschreef een complementbindingsreactie, waarbij de gebruikte rundersera niet geïnactiveerd werden, een werkwijze welke was ontleend aan een eerder gepubliceerd onderzoek van HOLTH. Volgens deze

onderzoekers zouden in rundersera dus geen complementcomponenten aanwezig zijn, welke het verloop van genoemde reactie zouden kunnen storen.

Deze waarnemingen lijken in tegenspraak met het enige jaren tevoren gepubliceerde werk van HEDEGÜS en GREINER (1938), die in rundersera bestanddelen vonden die in staat waren de als eerste en tweede component aangeduide fracties van caviacomplement, te vervangen bij de haemolyse van schape-erythrocyten met behulp van konijne-amboceptor. De invloed van onverwarmd runderserum op verschillende fasen van de neutralisatiereactie werd daarom aan een onderzoek onderworpen.

In tegenstelling tot de verwachting bleek hierbij, dat verschillende niet-geïnactiveerde sera, ook na verdunning, in een complementtitratie een anticomplementair effect hadden. Tabel 7 geeft een overzicht van de in enige van deze experimenten gebruikte proefopstelling, alsmede van de verkregen resultaten.

Op grond hiervan leek het dus aan te bevelen te onderzoeken rundersera voor gebruik te inactiveren.

Daar echter ook de mogelijkheid bestond dat, in analogie met de door WEDGWOOD en medewerkers (1956), GOTLIEB c.s. (1953) en LEYMASTER en

TABEL 8. De invloed van het inactiveren van rundersera op de serumtiter

Serum-nummer	Onderzochte serumverdunning	Serumtiter, uitgedrukt als negatieve log van het aantal geneutraliseerde ID_{50}	
		niet geïnactiveerd	geïnactiveerd
N 51	1/10	3,9	3,7
N 52	1/10	3,0	2,9
N 53	1/10	3,4	4,1
N 54	1/10	3,5	3,8
N 55	1/10	3,5 3,2 3,4	3,1 3,0
N 56	1/10	2,3	2,3 2,5
N 57	1/10	3,2	3,2 3,2
N 58	1/10	2,6	3,1
N 59	1/10	3,1	3,0 3,4
No. of serum	*Serum dilution tested*	*not inactivated*	*inactivated*
		Serum titer expressed as the negative logarithm of the number of ID_{50} neutralized	

TABLE 8. *The effect of inactivation of cattle sera on the serum titer*

WARD (1949) met enkele andere smetstoffen opgedane ervaringen, de inactivering van mond- en klauwzeervirus door antilichamen gunstig beïnvloed zou kunnen worden door thermolabiele serumbestanddelen, werd dit aspect nog nader onderzocht.

Hiertoe werden een aantal sera van gevaccineerde Nederlandse runderen, afkomstig van de Amsterdamse veemarkt, gebruikt. De dieren waren ongeveer een half jaar tevoren voor het laatst gevaccineerd. Uit overwegingen van technische aard konden de proeven met de verwarmde sera niet op dezelfde dag uitgevoerd worden als die met de niet-geïnactiveerde. Wel werden alle experimenten kort na elkaar verricht. Er werd een proefopstelling gebruikt, waarbij een constante hoeveelheid serum werd onderzocht tegenover verschillende smetstofconcentraties. De verkregen uitkomsten blijken uit tabel 8.

Een duidelijk verschil tussen de hoeveelheden geneutraliseerd virus blijkt uit deze vergelijkingen niet, zodat op grond hiervan niet aan een van beide methoden de voorkeur kon worden gegeven.

Mond- en klauwzeervirus gedraagt zich, althans bij onze proefopstelling, als de meeste andere dierpathogene smetstoffen (WEDGWOOD e.a., 1956).

Bij sommige niet-geïnactiveerde sera deden zich echter bij de proefaflezing inderdaad moeilijkheden voor, welke vermoedelijk moeten worden toegeschreven aan het eerder vastgestelde anticomplementaire effect, daar zij niet werden waargenomen bij gebruik van dezelfde sera na inactivering. Bij het voortgezette onderzoek werden daarom slechts geïnactiveerde sera onderzocht.

c. De betekenis van de incubatie van het serum-virusmengsel

Verschillende onderzoekers kregen goede resultaten bij neutralisatieproeven met mond- en klauwzeervirus, indien smetstof en antilichamen gedurende één uur bij kamertemperatuur met elkaar in contact werden gelaten (BROOKSBY, 1949; BROOKSBY en WARDLE, 1954; SKINNER, 1953). GILLESPIE (1955) incubeerde de serum-virusmengsels twee uur bij ongeveer 4° C, DINTER en WESSLÉN (1958) gaven de voorkeur aan 1 uur bij 37° C.

Een vergelijkend onderzoek naar de invloed van verschillende incubatieomstandigheden bleef tot dusver achterwege, hoewel meer uitgebreide gegevens over de betekenis van verschillende factoren van nut zouden kunnen zijn voor het ontwikkelen van een optimaal gevoelig proefsysteem. Voor enkele sera werd daarom nagegaan in hoeverre variatie van de omstandigheden waaronder het serum-virusmengsel bewaard werd alvorens aan de cultures te worden toegevoegd, van invloed was op de proefuitkomsten. Bij dit onderzoek, waarbij opnieuw een constante serumverdunning werd onderzocht, werd het gelijktijdig getitreerde virus op dezelfde wijze behandeld als het serum-virusmengsel.

In een eerste proef werd serum van een geïmmuniseerd Iers rund gebruikt. Veertien dagen na de enting was dit dier door middel van inwrijven van de mondholte met een in virulente O-smetstof gedrenkte lap besmet. Bij de

slachting, welke een week later plaats vond, werden geen mond- en klauwzeerafwijkingen gevonden.

Het voor de besmetting op de gebruikelijke wijze verkregen serummonster werd geïnactiveerd en daarna in de verdunning 1/10 gemengd met een gelijk volume van verschillende virusverdunningen. Alle buizen, welke smetstof bevatten, werden in ijswater gehouden totdat het serum werd toegevoegd. Het virus alleen werd getitreerd in de verdunningen $10^{-4,5}$ tot $10^{-6,5}$, het serum werd onderzocht tegenover de smetstofverdunningen $10^{-2,5}$ tot $10^{-4,5}$.

De incubatie vond plaats in een waterbad en aan het einde van de incubatieperiode werd opnieuw gekoeld. Alle titraties werden uitgevoerd in een zelfde weefselsuspensie, bestaande uit het verzamelde tongepitheel van een tweetal Nederlandse slachtrunderen.

De proef werd op de gebruikelijke manier afgelezen. Opstelling en uitkomsten vindt men in tabel 9.

TABEL 9. De invloed van incubatie van de serum-virusmengsels op de serumtiter I

Incubatie	Virustiter [1]	Virustiter [1] na incubatie in aanwezigheid van serum	Serumtiter	*Incubation*
2 uur 37° C, gevolgd door 20 uur 4° C	4,6	3,1	1,5	*2 hours at 37° C followed by 20 hours at 4° C*
20 uur 4° C	5,2	3,7	1,5	*20 hours at 4° C*
1 uur 37° C	5,3	2,9	2,4	*1 hour at 37° C*
1 uur 25° C	5,6	3,4	2,2	*1 hour at 25° C*
	Virus titer [1]	*Titer of virus* [1] *after incubation together with serum*	*Serum titer*	

[1] Titer aangegeven als neg. log. van ID_{50}
Titer given as the negative logarithm of the ID_{50}.

TABLE 9. *The effect of incubation of the serum-virus mixtures on the serum titer I*

Met serum van een ander gevaccineerd dier werden bij een proef met overeenkomstige opstelling de in tabel 10 vermelde uitkomsten verkregen.

In deze experimenten werden bij een incubatie van de serum-virusmengsels gedurende één uur de hoogste neutralisatietiters gevonden. Indien langer geïncubeerd werd vertoonde de smetstof, ook in afwezigheid van antistoffen, enig activiteitsverlies. Ook indien de titers van de immuunsera werden bepaald door vergelijking met die van het virus na incubatie met de normale sera, bleef één uur de meest bevredigende resultaten geven. Als „normaal" werd aangemerkt serum van hetzelfde dier verkregen vóór de injectie van het vaccin.

In tabel 11 worden een aantal op deze wijze gevonden uitkomsten weer-

TABEL 10. De invloed van incubatie van de serum-virusmengsels op de serumtiter II

Incubatie	Virus-titer [1]	Virustiter [1] na incubatie in aanwezigheid van serum	Serum-titer	*Incubation*
1 uur 37° C gevolgd door 20 uur 4° C	5,7	2,2	3,5	*2 hours at 37° C followed, 20 hous at 4° C*
20 uur 4° C	5,8	2,5	3,3	*20 hours at 4° C*
1 uur 37° C	5,7	2,0	3,7	*1 hour at 37° C*
1 uur 25° C	6,1	1,8	4,3	*1 hour at 25° C*
	Virus titer [1]	*Titer of virus* [1] *after incubation together with serum*	*Serum titer*	

[1] Titer aangegeven als negatieve logaritme van ID_{50}
Titer given as the negative logarithm of ID_{50}.

TABLE 10. *The effect of incubation of the serum-virus mixtures on the serum titer II*

TABEL 11. De invloed van de incubatietijd en -temperatuur op de neutralisatietiters van immuunsera. Vergelijking van waarden gevonden bij gebruik van verschillende methoden van berekening van de serumtiter.

Incubatie		Serumnummer — *No. of serum*					*Incubation*
		835	345		351		
	Serumtiter [1] *Titer of serum*	a	a	b	a	b	
1 uur bij 25° C		3,3	2,7		4,1	4,4	*1 hour at 25° C*
1 uur bij 37° C		2,9	2,4	1,9	3,9	4,5	*1 hour at 37° C*
20 uur bij 0° C		2,7	2,7	2,1	4,2	4,5	*20 hours at 0° C*
2 uur bij 37° C gevolgd door 20 uur bij 0° C		2,3	2,4	2,1	3,9	4,4	*2 hours at 37°C, followed by 20 hours at 0° C*

[1] a Serumtiter = verschil tussen titratie-eindpunten van het virus na incubatie met de normaal- en immuunsera van een zelfde individu — *the difference between the end-points found after incubation of the virus with the pre- and post- noculation sera of the same individual.*
b Serumtiter = verschil tussen het titratie-eindpunt van het virus en dat van de smetstof na incubatie met immuunsera — *the difference between the end-point found in the virus titration and that obtained after incubation of the virus with the immune serum.*

TABLE 11. *The effect of time and temperature of incubation on the neutralizing titers of immune sera. Comparison of values obtained with different methods of calculation of the serum titer.*

gegeven. Bij deze proeven werden de geïnactiveerde controle- en immuunsera, beide in de verdunning 1/10, met verschillende smetstofverdunningen geïncubeerd. Virus en serum-virusmengsels werden weer onder identieke omstandigheden gehouden.

Ook nu werden zeer bevredigende uitkomsten verkregen wanneer antilichamen en smetstof één uur bij 25° C in contact werden gelaten. De dan waargenomen activiteit leek nog iets groter dan die, welke werd waargenomen na een incubatie van één uur bij 37°C. Een van de onderzochte normale sera had een gering neutraliserend effect, het andere echter scheen in geringe mate beschermend te werken.

Uit deze uitkomsten blijkt niet, dat indien de serumtiter bepaald werd ten opzichte van het titratie-eindpunt dat gevonden werd na incubatie met het normale serum, de invloed van de incubatie-omstandigheden in principe anders werd, dan indien met dat van het virus alleen werd vergeleken.

De experimenten leveren geen argumenten om serum en virus na menging anders dan één uur bij 25° C te incuberen.

Vergelijking t.o.v. het met normaal serum verkregen eindpunt zal zeker de voorkeur verdienen, indien proefdieren met incomplete anamnese gebruikt worden. In dit geval zal niet de absolute waarde van de neutralisatietiter maar een relatieve, nl. de titerstijging, een maat kunnen leveren voor de serologische reactie die door de antigeentoediening werd opgewekt.

Bij de meeste door ons gebruikte runderen waren echter wel complete gegevens met betrekking tot de mogelijkheid van contact met mond- en klauwzeervirus aanwezig, daar de dieren allen afkomstig waren uit een streek waar de ziekte sedert vele jaren niet meer was vastgesteld. Normale sera van dergelijke geïmporteerde runderen bleken geen of slechts een gering effect op het virus te hebben, zodat uit dien hoofde een routinevergelijking met „normaal" serum weinig nuttig leek.

Bij enkele nog te bespreken proeven werd bovendien vastgesteld, dat op verschillende tijden verkregen sera van een niet-gevaccineerd rund konden uiteenlopen in neutraliserend vermogen. Wel waren deze variaties niet groot, maar bij herhaling van de bepalingen werden steeds overeenkomstige uitkomsten gevonden. Het lijkt daarom moeilijk, een op een bepaald moment verkregen serum als „normaal" aan te merken, zodat gebruik ervan als vergelijkingsbasis ongewenst moet worden geacht.

Teneinde een indruk te krijgen van de snelheid waarmee de neutralisatie verloopt bij verschillende temperaturen, werd nog een andere proefopstelling gebruikt. Het bij een van deze proeven onderzochte serum was wederom afkomstig van een 14 dagen tevoren gevaccineerd Iers rund. De titraties werden uitgevoerd met behulp van epitheel van een Nederlands dier. Het serum werd in de verdunning 1/10 samen met het virus in verschillende concentraties gedurende dertig, zestig of honderdtwintig minuten in een waterbad van 25° C geplaatst. Aan het eind van deze incubatietijd werd afgekoeld tot 0° door de buizen in ijswater te plaatsen. Een aantal controle-

buizen werd gedurende de gehele periode van twee uur bij een temperatuur van 0° C gehouden.

Het serum werd onderzocht tegenover de virusverdunningen $10^{-3,5}$ tot en met $10^{-5,5}$ of $10^{-4,0}$ tot en met $10^{-6,0}$.

De smetstoftitratie werd ingezet met $10^{-4,5}$ tot $10^{-6,5}$. Er werd een drievoudig verdunningsinterval gebruikt. Tabel 12 geeft de resultaten van dit experiment.

Deze uitkomsten verschillen onderling niet significant, zodat vermoedelijk geconcludeerd kan worden, dat de neutralisatie bij de hier onderzochte serumconcentratie bij 25° C in twee uur tot stand komt, bij lage temperatuur echter in deze tijd eveneens plaats vindt.

Bij voortgezet onderzoek bleek incubatie gedurende een kwartier bij 25° C dikwijls ook reeds optimale uitkomsten te geven.

Hierbij werden opnieuw sera van gevaccineerde Ierse runderen gebruikt, welke nu in de verdunningen 1/10 en 1/100 werden onderzocht. Reeds eerder was vastgesteld, dat de hier onderzochte monsters slechts een betrekkelijk geringe activiteit bezaten, zodat verwacht mocht worden dat, speciaal in de hogere verdunning, de reactie langzaam zou verlopen.

In een eerste proef werd onderzocht welke neutralisatietiters werden gevonden wanneer serum en virus direct na het mengen aan de cultuurtjes werden toegevoegd en ook, welke uitkomsten werden verkregen indien de

TABEL 12. De invloed van de temperatuur bij incubatie van de serum-virusmengsels op de serumtiter

Incubatie	Virus-titer [1]	Titer van het virus na incubatie met het serum [1]	Serum-titer	*Incubation*
2 uur bij 0° C	5,5	<4,2	>1,3	*2 hours at 0° C*
½ uur bij 25° C, gevolgd door 1½ uur bij 0° C	5,7	4,1	1,6	*½ hour at 25° C, followed by 90 minutes at 0° C*
1 uur bij 25° C, gevolgd door 1 uur bij 0° C	5,6	4,0	1,6	*1 hour at 25° C, followed by 1 hour at 0° C*
2 uur bij 25° C	5,4	<4,0	>1,4	*2 hours at 25° C*
	Virus titer [1]	*Virus titer* [1] *after incubation with the serum*	*Serum titer*	

[1] Titer aangegeven als negatieve logaritme van ID_{50}
Titer given as the negative logarithm of the ID_{50}.

TABLE 12. *The effect of the temperature of incubation of the serum-virus mixtures on the serum titer*

mengsels eerst 15 of 60 minuten bij 25° C waren geplaatst. Verschillende virusverdunningen werden telkens even lang als de smetstof-serummengsels geïncubeerd. Het virus werd verdund met een half log interval.

Proefopstelling en uitkomsten worden gegeven in tabel 13.

In de verdunning 1/10 vertoonde het serum reeds na 15 minuten zijn maximale effect. Indien de contacttijd tot het minimum werd beperkt vond echter ook een belangrijke neutralisatie plaats. Bij gebruik van de hogere serumverdunning werd het eindpunt eveneens na 15 minuten vrijwel bereikt. Werden in dit geval de serum-virusmengsels echter direct na het mengen getitreerd, dan bleek een belangrijk lagere serumtiter te worden gevonden.

De verschillen tussen de eindpunten van de virustitraties zijn te klein om praktische betekenis te hebben. In een volgende proef is daarom volstaan met een enkele virustitratie, waarbij de opnieuw met drievoudig interval gemaakte smetstofverdunningen niet geïncubeerd werden.

De proefopstelling alsmede de verkregen resultaten blijken uit tabel 14.

Ook hier zijn de verschillen betrekkelijk gering. De resultaten van de vorige proef worden echter bevestigd. Het meer verdunde serum bereikt in het door ons gebruikte proefsysteem eerst na enige tijd zijn maximale effect, het geconcentreerde echter vrijwel direct.

Onze uitkomsten zijn dus in grote lijnen in overeenstemming met die van BURNET c.s. (1937), welke auteurs immers vaststelden dat de inactivering

TABEL 13. De invloed van de serumconcentratie op de tijd welke nodig is om een neutralisatie-eindpunt te bereiken I

Incubatie	Serum-verdunning	Log onderzochte virusverdunning (half log interval)	Eind-punt [1]	Serum-titer	*Incubation*
Ca. 1 min bij 0° C	—	6,5 — 4,5	5,6	—	*About 1 minute at 0°C*
	1/10	5,0 — 3,0	3,4	2,2	
	1/100	5,5 — 3,5	4,8	0,8	
15 min bij 25° C	—	6,5 — 4,5	5,7	—	*15 minutes at 25° C*
	1/10	4,0 — 2,0	3,0	2,7	
	1/100	5,0 — 3,0	4,2	1,5	
60 min bij 25° C	—	6,5 — 4,5	5,8	—	*60 minutes at 25° C*
	1/10	3,5 — 1,5	3,2	2,6	
	1/100	5,0 — 3,0	4,0	1,8	
	Serum dilution	*Virus dilutions tested*	*End-point* [1]	*Serum titer*	

[1] Titer aangegeven als negatieve logaritme van ID_{50}
Titer given as the negative logarithm of the ID_{50}.

TABLE 13. *The influence of serum concentration on the time needed for reaching a neutralization end-point I*

TABEL 14. De invloed van de serumconcentratie op de tijd welke nodig is om een neutralisatie-eindpunt te bereiken II

Incubatie	Serum-verdunning	Log onderzochte virusverdunning (half log interval)	Eindpunt [1]	Serumtiter	*Incubation*
Ca. 1 min bij 0° C	—	6,5 — 4,5	5,9	—	*About 1 minute at 0°C*
	1/10	4,0 — 2,0	4,2	1,7	
	1/100	6,0 — 4,0	5,8	0,1	
15 min bij 25° C	1/10	4,0 — 2,0	4,0	1,9	*15 minutes at 25° C*
	1/100	5,5 — 3,5	5,3	0,6	
60 min bij 25° C	1/10	4,0 — 2,0	3,9	2,0	*60 minutes at 25° C*
	1/100	5,5 — 3,5	5,4	0,5	
	Serum dilution	*Virus dilutions tested*	*End-point* [1]	*Serum titer*	

[1] Titer aangegeven als negatieve logaritme van ID_{50}
Titer given as the negative logarithm of the ID_{50}.

TABLE 14. *The influence of serum concentration on the time needed for reaching a neutralization end-point II*

een evenwichtstoestand bereikte met een snelheid welke recht evenredig was met de antilichaamconcentratie. Ook DULBECCO, VOGT en STRICKLAND (1956) stelden een invloed van de serumconcentratie op de inactiveringssnelheidvast. Dit verband was vooral duidelijk bij gebruik van verdunde sera, waarbij laatstgenoemde onderzoekers ook een temperatuureffect waarnamen. Bij onze proeven kwam een dergelijk verband niet aan het licht; onze proefopstelling was echter niet speciaal op het demonstreren van deze factor gericht. Het lijkt daarom zeer wel mogelijk dat een temperatuurinvloed onder andere omstandigheden wel aantoonbaar is.

Ten slotte dient men niet uit het oog te verliezen dat onze uitkomsten mogelijk geen afspiegeling geven van het werkelijk verloop van de virus-inactivering tijdens de incubatie, daar bij de gebruikte titratiemethode bij het toevoegen van het serum-virusmengsel aan de cultures de serumwerking niet geheel wordt uitgeschakeld, al vindt enige verdunning plaats.

d. De invloed van verdunning op tevoren geïncubeerde smetstof-serummengsels

De invloed van verdunning op een reeds geïncubeerd serum-virusmengsel werd, voor zover het mond- en klauwzeervirus betrof, reeds onderzocht door BROOKSBY (1949). Hij kon enige reactivering vaststellen, indien het virus werd aangetoond door middel van intradermale injectie in de tong van gevoelige runderen.

Volgens DULBECCO c.s. (1956) is de door vele onderzoekers bij verdunning waargenomen reactivering slechts schijnbaar en een gevolg van de uitschakeling van een anders voortdurende serumwerking. Deze opvatting is in strijd met de mening van FAZEKAS DE ST. GROTH en medewerkers (1958), die menen dat elke verdunning van een serum-virusmengsel kan leiden tot het verbreken van het bereikte evenwicht en daardoor tot reactivering. De redenering van DULBECCO lijkt in mindere mate van toepassing op de door BROOKSBY (1949) toegepaste onderzoekingsmethode, dan op die welke wij gebruikten. Bij deze laatste techniek immers wordt het serum wel direct verdund ten gevolge van toevoeging van een dubbel volume kweekvloeistof, maar toch kunnen de in het milieu aanwezige antilichaammoleculen hun invloed op het virus blijven uitoefenen voordat dit aan de cellen geadsorbeerd wordt en ook tijdens die fasen van het vermeerderingsproces, waarbij de smetstof zich buiten de cellen bevindt.

Nagegaan werd, welke de invloed op de gevonden serumtiters was, van een aan het eind van de incubatieperiode uitgevoerde verdunning van het serum-virusmengsel tot 1/10 van de oorspronkelijke concentratie.

Bij dit onderzoek werd opnieuw gebruik gemaakt van epitheel van Nederlandse slachtrunderen. Er werden meerdere sera, alle afkomstig van eenmaal gevaccineerde proefdieren, onderzocht. De sera werden voor het begin van de proef geïnactiveerd en de serum-virusmengsels, welke het serum in de

TABEL 15. De invloed van verdunning van de serum-virusmengsels op de resterende virusactiviteit

Serum-nummer	Incubatietijd en -temperatuur	Log onderzochte virusverdunningen (half log interval)	Verdunning serum-virus-mengsel	Resterende virus-titer [1]
286	1 uur — *hour*, 25° C	4,0 — 2,0 3,0 — 1,0	geen — *none* 1/10	4,1 4,3
288	1 uur — *hour*, 25° C	4,0 — 2,0 3,0 — 1,0	geen — *none* 1/10	4,0 4,2
14	2 uur — *hours*, 25° C	4,0 — 2,0 3,0 — 1,0	geen — *none* 1/10	4,4 4,3
13	2 uur — *hours*, 25° C	4,0 — 2,0 3,0 — 1,0	geen — *none* 1/10	4,2 4,2
No. of serum	*Time and temperature of incubation*	*Virus dilutions tested (half log scale)*	*Dilution of serum-virus mixture*	*Residual virus titer* [1]

[1] Titer aangegeven als negatieve logaritme van ID_{50}
Titer expressed as the negative logarithm of the ID_{50}.

TABLE 15. *The effect of dilution of the serum-virus mixtures on the residual virus activity*

verdunning 1/10 bevatten, werden na een onder verschillende omstandigheden uitgevoerde incubatie verdund door per cc 9 ml koude kweekvloeistof toe te voegen. De buizen werden dan in ijswater geplaatst, totdat ten hoogste een uur later de toevoeging aan de cultuurtjes plaats vond. Ter controle werden de sera ook op de gebruikelijke wijze onderzocht. In tabel 15 wordt een overzicht van deze proef gegeven.

In dit experiment werd na verdunning in slechts twee van de vier gevallen een geringe toeneming van de resterende virusactiviteit vastgesteld. Deze veranderingen kunnen niet als significant opgevat worden.

De proeven werden in iets gewijzigde vorm herhaald met enkele andere sera. Details van deze experimenten alsmede de uitkomsten blijken uit tabel 16.

Het lijkt wel waarschijnlijk dat in deze gevallen enige reactivering was opgetreden. Hetzelfde deed zich voor bij een onderzoek van enkele sera van herhaaldelijk gevaccineerde Nederlandse runderen, waarbij eveneens een uur bij 25° C geïncubeerd werd (tabel 17). Ook deze resultaten wijzen erop dat tienvoudige verdunning van een serum-virusmengsel aanleiding kan zijn tot reactivering.

Bij onze proefopstelling vindt, ten gevolge van het toevoegen aan de cultures eveneens een, zij het geringere, verdunning plaats, zodat rekening gehouden dient te worden met de mogelijkheid dat ook daarbij enige verschuiving van een reeds bereikt evenwicht op zou kunnen treden.

TABEL 16. De invloed van verdunning van de serum-virusmengsels op de resterende virusactiviteit

Serum-nummer	Serum-verdunning	Incubatietijd en temperatuur	Log onderzochte virusverdunning (half log interval)	Verdunning serum-virus-mengsel	Resterende virus-titer [1]
208	1/5	1 uur — *hour*, 25° C	3,5 — 1,5 2,5 — 0,5	geen — *none* 1/10	3,2 3,7
206	1/5	1 uur — *hour*, 25° C	3,5 — 1,5 2,5 — 0,5	geen — *none* 1/10	3,4 3,7
372	1/5	2 uur — *hours*, 25° C	3,5 — 1,5 2,5 — 0,5	geen — *none* 1/10	3,2 3,9
18	1/5	2 uur — *hours*, 25° C	3,5 — 1,5 2,5 — 0,5	geen — *none* 1/10	3,2 3,9
No. of serum	*Serum dilution*	*Time and temperature of incubation*	*Virus dilutions tested (half log scale)*	*Dilution of serum-virus mixture*	*Residual virus titer* [1]

[1] Titer aangegeven als negative logaritme van ID_{50}
Titer given as the negative logarithm of the ID_{50}.

TABLE 16. *The effect of dilution of the serum-virus mixtures on the residual virus activity*

TABEL 17. De invloed van verdunning van de serum-virusmengsels op de resterende virusactiviteit. Sera van Nederlandse runderen

Serum-nummer	Serum-verdunning	Onderzochte virus-verdunningen	Incubatietijd en -temperatuur	Verdunning serum-virus-mengsel	Resterende virus-titer [1]
Me 24	1/10	4,0 — 2,0	1 uur — *hour*, 25° C	geen — *none*	3,4
		3,0 — 1,0	„	1/10	3,7
Jl 5	1/10	3,0 — 1,0	„	geen — *none*	2,8
		2,0 — 0,0	„	1/10	3,1
Jl 103	1/10	3,5 — 1,5	„	geen — *none*	3,2
		2,5 — 0,5	„	1/10	3,4
Se 51	1/10	3,5 — 1,5	„	geen — *none*	3,2
		2,5 — 0,5	„	1/10	3,2
Jl 9	1/10	4,0 — 2,0	„	geen — *none*	3,1
		3,0 — 1,0	„	1/10	3,3
Me 25	1/10	3,5 — 1,5	„	geen — *none*	2,4
		2,5 — 0,5	„	1/10	3,0
Me 18	1/10	3,0 — 1,0	„	geen — *none*	2,9
		2,0 — 0,0	„	1/10	3,0
No. of serum	*Serum dilution*	*Virus dilutions tested*	*Time and temperature of incubation*	*Dilution of serum-virus mixture*	*Residual virus titer* [1]

[1] aangegeven als neg. log van ID_{50}
expressed as the negative logarithm of the ID_{50}.

TABLE 17. *The effect of dilution of serum-virus mixtures on residual virus activity. Sera of Dutch cattle*

TABEL 18. De invloed van het verwijderen van kweekvloeistof en niet-geadsorbeerd virus op de uitkomst van de smetstoftitratie.

	Vloeistof niet vervangen	Vloeistof verwijderd na		
		1 uur	2 uur	3 uur
Virustiter (neg. log ID_{50})	5,7	5,5	5,5	5,3
	Medium not changed	*Medium changed after*		
		1 hour	*2 hours*	*3 hours*

TABLE 18. *The effect of removal of tissue culture fluid and unadsorbed virus on virus titer*

Gezien de uitkomsten van verdere proeven lijkt het niet waarschijnlijk, dat het waargenomen verschil een gevolg is van een door de verdunning onderbroken serumwerking.

Volgens MACKOWIAK (1955) en CARTWRIGHT en medewerkers (1957) verloopt de adsorptie van het mond- en klauwzeervirus aan de tongepitheelcellen snel. Zoals blijkt uit tabel 18, welke het resultaat geeft van een proef waarbij de weefselstukjes een, twee of drie uur na toevoeging van de smetstof werden gewassen en met nieuw medium verder werden geïncubeerd, kunnen wij deze waarneming bevestigen.

De invloed van de in de cultures geïntroduceerde antistoffen werd nu onderzocht door het medium te verwijderen, nadat het in het proefsysteem aanwezige virus voldoende tijd had gehad voor vrijwel volledige adsorptie.

Er werden vier serummonsters onderzocht nl. een mengsel van sera van een zestal Nederlandse runderen welke twee tot drie maanden tevoren waren gerevaccineerd (P), serum van een 7 weken tevoren geënt kalf (428) en twee sera van slachtrunderen (A 30 en J 25).

Serum- en virusverdunningen werden op de gebruikelijke wijze bij elkaar gebracht. Ze werden een uur bij 25° C geïncubeerd alvorens aan het weefsel te worden toegevoegd.

De proef werd op twee verschillende manieren uitgevoerd. In het ene geval werd het epitheel over de cultuurtjes verdeeld, voordat de virusbevattende vloeistof werd gedistribueerd. Na een uur werd de vloeistof afgezogen. Daarna werd nog eens gewassen met medium, voordat het weefsel met nieuwe kweekvloeistof in de platen werd geïncubeerd.

Bij de tweede methode werd het te onderzoeken serum-virusmengsel toegevoegd aan een buis welke een hoeveelheid weefsel bevatte, die voldoende was voor het per virusverdunning gebruikte aantal cultuurtjes. Na afzuigen van de vloeistof aan het eind van de adsorptieperiode en wassen van de epitheelstukjes werd het weefsel over de platen verdeeld. Tabel 19 geeft een overzicht van deze proeven.

Uit deze uitkomsten blijkt niet, dat verwijderen van de antilichamen na een adsorptie van een uur bij 25° C de neutraliserende werking van de sera doet afnemen. Eerder is het omgekeerde het geval, wat een gevolg zou kunnen zijn van een mogelijk toch nog niet geheel complete virusadsorptie gedurende de beschikbare incubatietijd.

De hier beschreven proeven staan de volgende conclusies toe:

1. Incubatie van serum-virusmengsels gedurende een uur bij 25° C is voldoende om de neutralisatiereactie tot een eindpunt te doen verlopen, ook indien verdunde sera met geringe activiteit worden gebruikt.
2. Tienvoudige verdunning van op bovenomschreven wijze geïncubeerde serum-virusmengsels had in de meeste gevallen enige invloed op de gevonden serumtiters. Aangezien de verdunningsgraad, welke bereikt wordt

wanneer serum en virus aan de cultuurtjes worden toegevoegd, slechts een drievoudige is, zal de betekenis van deze factor bij de door ons gebruikte proefopstelling echter niet groot zijn.

3. Een invloed van het resterende serum kon niet worden vastgesteld.

Deze laatste uitkomst is enigszins in tegenspraak met de resultaten van enkele

TABEL 19. De invloed van het verwijderen van resterende antistoffen en niet-geadsorbeerd virus op de titers van verschillende immuunsera

	Virustiter (neg. log ID_{50})	Serum-titer	
Virus alleen [1]	5,8		*Virus* [1]
Serum P en virus, antistoffen niet verwijderd [1]	4,2	1,6	*Serum P and virus, tissue not washed* [1]
Serum en virus als boven, gewassen na 1 uur adsorptie bij 25° C in plaat	3,7	2,1	*Serum and virus as above, tissue washed after adsorption for 1 hour at 25° C in the plate*
Serum en virus als boven, gewassen na 1 uur adsorptie bij 25 °C in buis	3,8	2,0	*Serum and virus as above, tissue washed after adsorption for 1 hour at 25° C in the tube*
Serum kalf (428) en virus, antistoffen niet verwijderd [1]	4,9	0,9	*Calf serum no. 428 and virus, tissue not washed* [1]
Serum en virus als boven, gewassen na 1 uur adsorptie bij 25° C in plaat	4,5	1,3	*Serum and virus as above, tissue washed after adsorption for 1 hour at 25° C in the plate*
Serum en virus als boven, gewassen na 1 uur adsorptie bij 25° C in buis	4,3	1,5	*Serum and virus as above, tissue washed after adsorption for 1 hour at 25° C in the tube*
Virus alleen [1]	6,4		*Virus* [1]
Serum A 30 en virus, antistoffen niet verwijderd [1]	1,9	4,5	*Serum A 30 and virus, tissue not washed* [1]
Serum en virus als boven, gewassen na 1 uur adsorptie bij 25° C in plaat	2,4	4,0	*Serum and virus as above, tissue washed after adsorption for 1 hour at 25° C in the plate*
Serum en virus als boven, gewassen na 1 uur adsorptie bij 25° C in buis	1,6	4,8	*Serum and virus as above, tissue washed after absorption for 1 hour at 25° C in the tube*
Serum J 25 en virus, antistoffen niet verwijderd [1]	3,0	3,4	*Serum J 25 and virus, tissue not washed* [1]
Serum en virus als boven, gewassen na 1 uur adsorptie bij 25° C in plaat	3,0	3,4	*Serum and virus as above, tissue washed after adsorption for 1 hour at 25° C in the plate*
Serum en virus als boven, gewassen na 1 uur adsorptie bij 25° C in buis	2,6	3,8	*Serum and virus as above, tissue washed after adsorption for 1 hour at 25° C in the tube*

[1] Ook de niet-gewassen cultures werden 1 uur bij 25° C gehouden voordat ze bij 37° C werden verder geïncubeerd
Control cultures were also kept at 25° C for one hour, before being incubated at 37° C.

TABLE 19. *The effect of the removal of remaining antibody and unadsorbed virus on the titers of some immune sera*

TABEL 20. Invloed van verdunning op het neutraliserend vermogen van serum 543.

Serum-verdunning [1]	Gebruikte virusverdunningen [1]	ID_{50} [1]	Geneutr. hoeveelheid virus (log)
1,0	3,0 — 1,0	1,9	4,2
1,3	3,5 — 1,5	2,9	3,2
1,5	4,0 — 2,0	3,5	2,6
1,8	4,5 — 2,5	4,0	2,1
2,0	5,0 — 3,0	4,5	1,6
2,3	5,5 — 3,5	5,1	1,0
2,5	6,0 — 4,0	5,2	0,9
alleen virus *virus only*	6,5 — 4,5	6,1	—
Serum dilution [1]	*Virus dilutions* [1] *tested*	*ID_{50}* [1]	*Log number of ID_{50} neutralized*

[1] Opgegeven als de negatieve logaritme
Expressed as the negative logarithm.

TABLE 20. *The effect of dilution on the titer of serum 543*

andere onderzoekers, waaronder DULBECCO c.s. (1956). Het lijkt waarschijnlijk dat dit verschil toe te schrijven is aan onze techniek, welke belangrijk minder gevoelig is dan die, welke door de genoemde auteur en zijn medewerksters werd gebruikt.

e. Vergelijking van een proefopstelling met constante serumconcentratie met een met constante virushoeveelheid

Teneinde vast te stellen of een bepalingsmethode welke gebruik maakte van een serumverdunningseindpunt en constante virusdosis, de voorkeur verdiende boven een techniek met constante serumconcentratie, werd van een aantal sera een reeks verdunningen onderzocht.

Naast materiaal afkomstig van Ierse runderen, dat enkele weken na injectie van 15 ml van een O-vaccin was verkregen, werden sera van Nederlandse dieren welke ongeveer een jaar tevoren voor het laatst geënt waren, bij het onderzoek betrokken. De onderzochte sera bleken aanzienlijk in activiteit uiteen te lopen. Een van de gebruikte proefopstellingen wordt in tabel 20 weergegeven. Het hier onderzochte serum (no. 543) was afkomstig van een eenmaal gevaccineerd ingevoerd dier. Voor het verkrijgen van ver-

schillende serumconcentraties werd uitgegaan van een buis welke de verdunning 1/10 (−1,0) bevatte. Door toevoeging van kweekvloeistof in verschillende verhoudingen werden hieruit de verdunningen 1/20 (−1,3), 1/32 (−1,5) en 1/100 (−2,0) gemaakt. Voor verdere verdunningen werd weer uitgegaan van deze reeks.

Indien men grafisch de bij verschillende concentraties van het serum gevonden neutralisatietiter (als log van het aantal geneutraliseerde ID_{50}) uitzet tegen de gebruikte verdunning (als negatieve log), ontstaat een reeks punten, welke bij benadering op een rechte lijn ligt. De rechte, welke het best bij de serie punten past, kan worden beschreven door de algemene formule $Y = a + bX$, waarin X = de negatieve log van de serumverdunning en Y de bij elke waarde van X berekende serumtiter (SNEDECOR, 1946).

De grootheden a en b kunnen worden berekend met behulp van de methode van de kleinste kwadraten. De gevonden rechte is dan die, waarbij het totaal van de kwadraten van de verschillen tussen de werkelijk gevonden neutra-

TABEL 21. Berekening van de neutralisatielijn voor serum no. 543

Neg. log erumverdunning (X)	Log aantal geneutr. ID_{50} (Y)	$y = Y - \bar{y}$	$x = X - \bar{x}$	xy	x^2
1,0	4,2	1,97	—0,77	—1,52	0,59
1,3	3,2	0,97	—0,47	—0,46	0,22
1,5	2,6	0,37	—0,27	—0,10	0,07
1,8	2,1	—0,13	0,03	—	—
2,0	1,6	—0,63	0,23	—0,14	0,05
2,3	1,0	—1,23	0,53	—0,65	0,28
2,5	0,9	—1,33	0,73	—0,97	0,53
				—3,84	1,74
Negative log serum dilution (X)	*Log number of* ID_{50} *neutralized* (Y)	$y = Y - \bar{y}$	$x = X - \bar{x}$	xy	x^2

$\bar{x} = 1{,}77, \quad \bar{y} = 2{,}23$

$$Y = \bar{y} + \frac{\Sigma xy}{\Sigma x^2} (X - \bar{x}) = 2{,}23 - \frac{3{,}84}{1{,}74} (X - 1{,}77)$$

$$Y = 6{,}14 - 2{,}21\ X$$

TABLE 21. *Calculation of the neutralization line for serum 543*

lisatietiters (de punten) en de berekende waarden (de lijn), minimaal is. b is een schatting voor de helling van deze regressielijn, welke de regressie van de serumtiter op de serumverdunning geeft. De berekening wordt uitgevoerd als in tabel 21 is aangegeven.

De punten en de erbij berekende rechten worden weergegeven in fig. 1. Een aantal andere sera werden op analoge wijze onderzocht. Tabel 22 geeft een overzicht van deze proeven.

De laagste onderzochte serumverdunning is 1/6. Bij gebruik van hogere concentraties werden van tijd tot tijd moeilijkheden bij de aflezing ondervonden.

TABEL 22. De invloed van verdunning op het neutraliserend vermogen van verschillende sera

	No. van het serum — *No. of serum*											
	368	420	513	540	551	556	572	581	590	55	58	59
Herkomst — *Origin*	I	I	I	I	I	I	I	I	I	N	N	N
Serumverdunning *Serum dilution* (neg. log)	neutralisatietiter (log aantal ID_{50}) *serum titer (log number of ID_{50})*											
0,8	1,7	1,7	2,2		2,2							
1,0	1,4	1,2	1,8	3,2	1,9	1,6	1,5	2,4	2,9	3,1	2,6	3,1
								2,1				
1,2	0,7	1,0	1,3	2,2	1,8							
1,3						1,0	1,3	2,2	2,4	3,0	2,4	3,3
							1,3	1,9			2,5	
1,4	0,8	0,8	1,1		1,1							
1,6	0,5	0,1	0,8	1,7	0,9	0,8	0,8				2,0	2,4
							1,0					
1,7								1,6	1,8	<2,2		
								1,1				
1,8	0,2	0,1	0,6	1,1	0,7							
1,9						0,6	0,6				1,4	1,5
2,0	0,0	0,0	0,6	0,9	0,5			0,9	1,1	2,1		
2,2				0,7		0,1					0,9	1,0
2,3									0,9	<1,2		
2,5						0,0					0,5	0,6
2,7									0,1	<0,7		
2,8												0,3
3,0									0,1	0,4		
Helling van de neutralisatielijn — *Slope of the neutralization line*	-1,44	-1.45	-1,38	-1,96	-1,60	-1,07	-1,06	-1,38	-1,60		-1,53	-1,92

I = één maal gevaccineerd Iers rund — *Irish animal vaccinated only once*
H = herhaaldelijk gevaccineerd Nederlands rund — *Dutch cow, vaccinated repeatedly*

TABLE 22. *The effect of dilution on the titers of a number of sera*

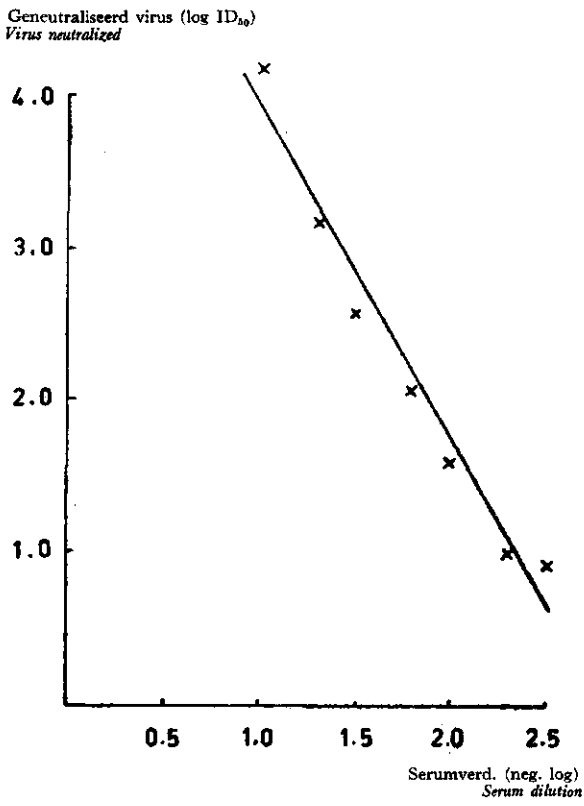


FIG. 1

Invloed van verdunning op het neutralisatievermogen van serum 543

FIG. 1

The effect of dilution on the titer of serum no. 543

In de meeste gevallen blijken de punten goed aan te sluiten bij de berekende rechte; in enkele gevallen wordt de indruk verkregen dat een zwak gebogen lijn echter beter zou passen (fig. 2). Bij sterke verdunning van het serum zal, daar het neutraliserend vermogen dan tot nul nadert, in ieder geval een richtingsverandering op moeten treden.

De hellingen van de voor verschillende sera gevonden neutralisatielijnen variëren van 1,0 tot 2,0 en er bestaat een positieve correlatie tussen deze grootheid en de bij lage serumverdunningen gevonden neutralisatietiters.

Teneinde vast te stellen in hoeverre de verschillen tussen de voor b gevonden waarden significant zijn, werd voor een tweetal sera van zeer uiteenlopende activiteit het onderzoek enkele malen herhaald.

Voor de bij elke serumverdunning in verschillende proeven gevonden neutralisatietiters werd een gemiddelde berekend. Tabel 23 geeft een overzicht van de resultaten van dit onderzoek. De rechte lijnen, welke het best passen bij elk van de twee reeksen gemiddelden, verschillen nauwelijks van richting, hoewel de in de individuele proeven verkregen uitkomsten wel vrij sterk varieerden.

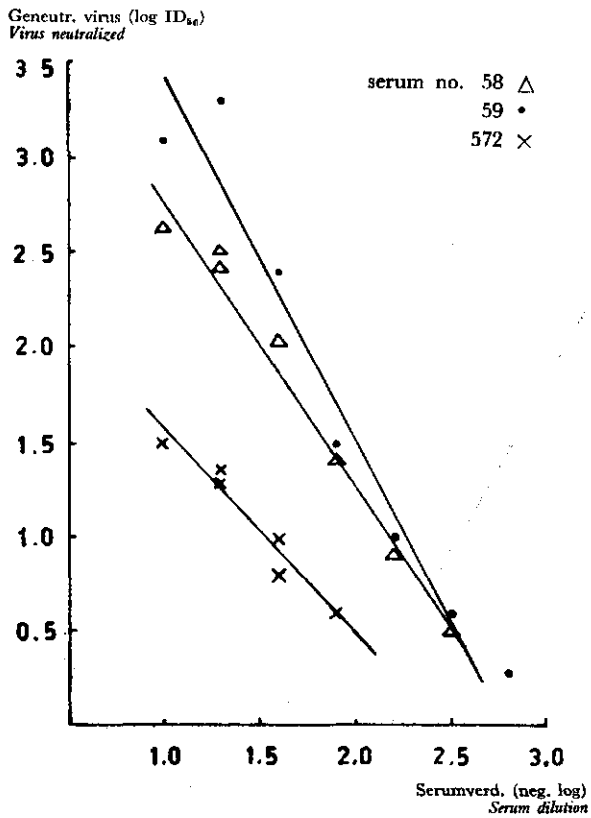


FIG. 2.

Invloed van verdunning op de titers van sera 58, 59 en 572

FIG. 2.

The effect of dilution on the titers of sera no's 58, 59 and 572

Er is dus reden om aan te nemen dat in dit geval de twee lijnen niet significant verschilden. De uiteenlopende uitkomsten welke in de individuele proeven voor b gevonden werden, kunnen meerdere oorzaken hebben.

Enerzijds kunnen proeffouten, vooral indien deze gemaakt werden bij de bepaling van punten gelegen bij de einden van de lijn, de regressiecoëfficiënt wijzigen. Anderzijds kan, zoals uit later te beschrijven proeven zal blijken, weefsel afkomstig van gevaccineerde dieren de serumtiter belangrijk beïnvloeden. Het effect van deze laatste factor varieert enigszins met de serumactiviteit en mag daarom ook verwacht worden afhankelijk te zijn van de serumverdunning. Ook deze variabele zal dus in staat zijn de helling van de neutralisatielijn te wijzigen.

Het door ons gevonden rechtlijnig verband tussen serumtiter en verdunning is niet in overeenstemming met de resultaten, welke BROOKSBY (1949) verkreeg bij de titratie in vivo in de rundertong. Het aantal door deze onder-

zoeker gepubliceerde proeven is echter te gering om een verklaring van de uiteenlopende resultaten mogelijk te maken.

De helling van onze neutralisatielijnen bedraagt ongeveer 1,4. Bij de gebruikte logaritmische schaal resulteert een verandering van de serumconcentratie van één log, in een grotere wijziging van de hoeveelheid geïnactiveerde smetstof. Een methode welke zich bij de bepaling van de serumactiviteit baseert op het gebruik van verschillende smetstofconcentraties mag dus verwacht worden gevoeliger te zijn dan een, die werkt met verschillende serumverdunningen.

Ook op grond van de volgende overwegingen hebben wij gemeend de voorkeur te moeten geven aan een methodiek met constante serumconcentratie. De verdunning 1/10 werd daarbij gebruikt, omdat sommige sera in geringer verdunning anticomplementair zijn.

Bij gebruik van een bekende constante virusdosis zal het, indien telkens van een nieuw smetstoffiltraat wordt uitgegaan, noodzakelijk zijn dit voor het begin van de eigenlijke proef te titreren. Ten gevolge van de betrekkelijk geringe houdbaarheid van het weefsel zal een dergelijke bepaling wel steeds moeten worden uitgevoerd in een andere epitheelsuspensie dan de eigenlijke proef. Op grond van de reeds eerder vermelde ongelijke gevoeligheid van

TABEL 23. Vergelijking van de neutralisatielijnen van twee sera. Iedere waarde is een gemiddelde van drie bepalingen.

Serum 09—32		Serum 01—05	
verdunning *dilution* (neg. log)	titer (gem.) (*mean*)	verdunning *dilution* (neg. log)	titer (gem.) (*mean*)
1,0	3,5	0,8	1,6
1,25	3,0	1,0	1,6
1,5	2,5	1,2	1,1
1,75	1,9	1,4	0,9
2,0	1,7		
2,25	1,5		
2,5	1,1		
b = 1,38		b = 1,30	

TABLE 23. *Comparison of the neutralization lines found for two widely different sera. Each value is a mean of three titrations.*

weefselsuspensies afkomstig van verschillende dieren, lijkt dit een weinig bevredigende oplossing.

Als alternatief zou men gebruik kunnen maken van een tevoren getitreerde en bij lage temperatuur bewaarde smetstof, maar ook dan zullen de variaties tussen de bij verschillende bepalingen gebruikte weefselsuspensies zich doen gelden.

Dit blijkt b.v. uit tabel 24, welke een overzicht geeft van eindpunten, gevonden bij tussen juni 1955 en februari 1956 uitgevoerde titraties van één virussuspensie.

Deze smetstof werd bij −30° C bewaard in de vorm van een steriel cultuurvirusfiltraat, waaraan 2% runderserumalbumine was toegevoegd.

Voor deze serie bepalingen kan een standaarddeviatie berekend worden van $\sqrt{\frac{4466}{19}} = 0{,}48$. Een andere berekening, gebaseerd op een nog groter aantal cijfers, leverde een waarde van 0,50 op. Deze uitkomsten liggen belangrijk hoger dan die welke eerder gevonden werden voor op één dag in één weefselsuspensie verrichte titraties.

Aangezien van een verband tussen de tijd, gedurende welke de smetstof bewaard werd, en de virustiter niets blijkt, zodat er geen aanwijzingen zijn

TABEL 24. Titratie-uitkomsten verkregen met een bij −30° C bewaarde virussuspensie

Datum onderzoek *Date of experiment*	Eindpunt —*End-point* (neg. log ID_{50})
10. 6. 1955	6,0
14. 6. 1955	5,5
28. 6. 1955	5,9
13. 7. 1955	6,4
10. 8. 1955	5,7
16. 8. 1955	6,4
19. 8. 1955	6,1
22. 8. 1955	5,6
23. 8. 1955	6,4
24. 8. 1955	6,2
26. 8. 1955	6,1
24. 9. 1955	6,1
28. 9. 1955	4,8
4.10. 1955	5,4
18.10. 1955	6,4
28.10. 1955	4,8
31.10. 1955	6,2
2. 1. 1956	6,0
6. 1. 1956	5,8
27. 1. 1956	5,9

TABLE 24. *Titration end points obtained with one virus suspension, which had been stored at −30° C*

voor een geleidelijk activiteitsverlies van de smetstof, zouden ongelijke gevoeligheid van de gebruikte weefselsuspensies, proeffouten, of verschillen tussen de op identieke wijze behandelde virusmonsters voor de grote strooiing verantwoordelijk geacht moeten worden.

Het ligt voor de hand in de eerste plaats aan weefselvariatie te denken, mede in verband met de in tabel 5 opgesomde proefuitkomsten. De hoeveelheden smetstof, welke nodig zijn om de virusvermeerdering in de cultuurtjes zodanig op gang te brengen, dat aan het einde van de kweekperiode een positieve complementbindingsreactie wordt verkregen, bleken kort na de jaarlijkse entingsperiode aanzienlijk groter dan indien weefsel van langere tijd tevoren geënte dieren werd gebruikt. Een weefselresistentie, mogelijk ten gevolge van resterende, niet door wassen te verwijderen antilichamen, moet hierbij een rol spelen.

Ten gevolge van de variabiliteit zouden, indien steeds een bepaalde verdunning van het viruspreparaat werd gebruikt, in verschillende proeven de sera toch onderzocht worden tegenover ongelijke aantallen infectieuze eenheden.

Het lijkt daarom beter de voorkeur te geven aan een proefopstelling met constante serumconcentratie, waarbij variaties in weefselgevoeligheid kunnen worden gecorrigeerd door een gelijktijdig uitgevoerde virustitratie.

f. Onderzoek naar factoren welke de uitslag van de in de cultuurtjes uitgevoerde complementbindingsreactie zouden kunnen beïnvloeden

Het verloop van de aan het einde van de proef in aanwezigheid van het weefsel uitgevoerde complementbindingsreactie, is afhankelijk van verschillende factoren. BROOKSBY en WARDLE (1954) stelden reeds vast, dat het gebruik van een juiste hoeveelheid complement van belang was. Indien een overmaat werd toegevoegd trad, ondanks de aanwezigheid van specifiek antigeen, haemolyse op, terwijl, bij gebruik van een te lage concentratie, in afwezigheid daarvan, positieve of twijfelachtige reacties werden waargenomen.

Andere factoren van betekenis zijn ongetwijfeld het cavia-immuunserum en de in het reactiesysteem aanwezige hoeveelheid antigeen. Volgens BROOKSBY (1952) is het complementbindend vermogen van een bepaald systeem van mond- en klauwzeerantigeen en -antistof afhankelijk van de concentraties van deze beide reagentia. Uit de door deze auteur gepubliceerde figuur no. 5, blijkt dat er bij serumovermaat een lineair verband bestaat tussen de antigeenconcentratie en de hoeveelheid complement nodig om 50% van de aanwezige schape-erythrocyten te lyseren. Aangezien bij de door ons gebruikte proefopstelling het caviaserum wordt toegevoegd in een concentratie, welke in staat is om in aanwezigheid van voldoende antigeen een hoeveelheid complement te binden, die belangrijk groter is dan de gewoonlijk gebruikte, mag verwacht worden dat het in eerste instantie de hoeveelheid

geproduceerd antigeen zal zijn, die het al of niet positief worden van de reactie bepaalt.

De hiervan aan het eind van de kweekperiode aanwezige hoeveelheid is afhankelijk van verschillende factoren. Hieronder zijn de kwaliteit van het gebruikte weefsel, het milieu en de duur en temperatuur van de incubatie vermoedelijk de belangrijkste.

Het tongepitheel kan op verschillende manieren de virusvermeerdering beïnvloeden. Behalve de vitaliteit van het weefsel, zullen mogelijk ook verschillen in geschiktheid voor virusproduktie, die met de plaats van herkomst van het epitheel samenhangen en de immunisatietoestand van het rund van betekenis kunnen zijn. Een van de milieufactoren, welke genoemd moet worden, is de chemische samenstelling van het medium (GILLESPIE en FRENKEL, 1955). Ook de aanwezigheid in het milieu van met het serum toegevoegde specifieke antilichamen, zal van invloed kunnen zijn (DULBECCO c.s., 1956). Dit laatste aspect werd speciaal onderzocht.

In een aantal experimenten werd vastgesteld dat, terwijl zich bij de virustitratie na de toevoeging van het haemolytisch systeem in 15 tot 30 minuten een normaal reactiepatroon ontwikkelde, dat bij voortgezette incubatie weinig of niet veranderde, in vele cultures welke een serum-virusmengsel bevatten de haemolyse voortschreed, zodat overal een partiële en soms ook totale haemolyse optrad. Het was dan niet mogelijk een eindpunt te bepalen. Daar in een deel van de proef een normaal patroon bleef bestaan, konden complement, cavia-immuunserum en haemolytisch systeem als oorzaken van de moeilijkheid geëlimineerd worden. Voortschrijden van de haemolyse werd verder niet vastgesteld indien de onderzochte sera afkomstig waren van niet-gevaccineerde runderen. Wanneer met meerdere verdunningen van een zelfde runderserum werd geëxperimenteerd, bleek de serumconcentratie een factor van betekenis te zijn in die zin, dat bij hogere verdunning een beter resultaat werd verkregen.

Op grond van deze waarnemingen leek het waarschijnlijk, dat er een specifieke, met het serum ingevoerde factor in het spel was. Daarnaast was evenwel een duidelijke weefselinvloed aanwezig, want de moeilijkheden bij de aflezing, welke soms bij onderzoek van een bepaald serum optraden, deden zich bij herhaling van het onderzoek met een andere epitheelsuspensie dikwijls niet voor.

Het beschreven effect zou zowel het gevolg kunnen zijn van een voortgezette werking van virusneutraliserende antilichamen, die met het proefserum in het reactiesysteem zijn ingevoerd, als van de activiteit van blokkerende antistoffen van het type dat bij de indirecte complementbindingsreactie wordt aangetoond.

Men zou zich de werking van eerstgenoemde immuunstoffen kunnen voorstellen als een voortgezette neutralisatie van de tijdens de kweekperiode nieuw geproduceerde smetstof. In dat geval zal, volgens de door DULBECCO c.s. (1956) ontwikkelde opvatting, van elke virusgeneratie een deel worden

uitgeschakeld. Ten slotte zal daardoor een geringere hoeveelheid complementbindend antigeen beschikbaar zijn dan in onder gelijke omstandigheden gekweekte controlecultures.

De complementbindingremmende antilichamen zouden de proefuitslag kunnen beïnvloeden door een deel van het gevormde antigeen te blokkeren en zodoende aan de reactie te onttrekken. Over de aard van de antistoffen van deze tweede groep is weinig bekend en de vraag in hoeverre ze identiek zouden kunnen zijn met de virusneutraliserende, is nog onbeantwoord.

Bij het experimentele onderzoek werd de indruk gekregen dat beide soorten antistoffen een rol zouden kunnen spelen.

In sera van vele gevaccineerde runderen konden antilichamen, welke het vermogen hadden de complementbinding te remmen, worden aangetoond.

De proeven die dit demonstreerden werden uitgevoerd in perspex tegels.

In verband met de gecompliceerdheid van de indirecte complementbindingsreactie werd er daarbij naar gestreefd, resultaten welke onderling vergelijkbaar moesten zijn in één enkele proef te verkrijgen, zodat de invloed van de variabiliteit van labiele reagentia als complement en antigeen zoveel mogelijk beperkt werd.

In een eerste proef werden in telkens twee rijen uithollingen van de platen, met behulp van geijkte druppelpipetten, resp. 1, 2, 3 en 4 druppels O-antigeen gebracht. Nadat alle cups met kweekvloeistof tot een zelfde volume waren bijgevuld, werden aan één van elk paar rijen twee druppels van een geïnactiveerd en 20 maal verdund runderimmuunserum en aan elke tweede

TABEL 25. De invloed van de antigeenconcentratie op de complementbindingremmende werking van een runderimmuunserum

Antigeenverdunning *Antigen dilution*	Complementconcentratie *Concentration of complement*					
	1%	1,5%	2,0%	2,5%	3%	
1/4	++	±±	—	—	—	in aanwezigheid van
2/4	++	++	++	—	—	runderserum
3/4	++	++	++	++	++	*cattle serum added*
4/4	++	++	++	++	++	
1/4	++	++	±±	—	—	geen runderserum toe-
2/4	++	++	++	++	++	gevoegd
3/4	++	++	++	++	++	*without cattle serum*
4/4	++	++	++	++	++	

++ = totale binding, geen haemolyse — *complete fixation.*
± = partiële lysis — *incomplete fixation.*
— = totale haemolyse — *complete hemolysis.*

TABLE 25. *The influence of the antigen concentration on the complement-fixation inhibiting effect of a cattle immune serum*

TABEL 26. De invloed van de caviaserumconcentratie bij de indirecte complementbindingsreactie

Antigeenconcentratie *Concentration of antigen*		Caviaserum verdunning *Guinea-pig immune serum dilution*	
		1/5	1/25
1/4	0,1 ml runderserumverdunning	±±±±±	− − − − −
2/4	1/20 toegevoegd	+++++	− −±− −
3/4	*0,1 ml of cattle immune serum dil-*	+++++	−± ± ±−
4/4	*ution 1/20 added*	+++++	++±++
1/4	Geen runderserum toegevoegd	+++++	+++++
2/4		+++++	+++++
3/4	*no cattle serum added*	+++++	+++++
4/4		+++++	+++++

\+ = geen haemolyse — *no hemolysis.*
± = partiële haemolyse — *partial hemolysis.*
— = totale haemolyse — *total hemolysis.*

TABLE 26. *The influence of the guinea-pig immune serum concentration on the outcome of the indirect complement-fixation test*

reeks twee druppels kweekvloeistof toegevoegd. Na een incubatie van een uur bij 37° C werden van elke serie eerst twee vakjes voorzien van elk 2 druppels van een 1, 1½, 2, 2½ of 3% complementverdunning en daarna nog van een gelijke hoeveelheid verdund cavia-O-immuunserum. Na een incubatie van nog een half uur werden ten slotte nog twee druppels haemolytisch systeem in elk van de uithollingen gebracht. De platen werden, na nog eens drie kwartier bij 37° C te zijn geplaatst, afgelezen. De resultaten worden weergegeven in tabel 25.

Het onderzochte serum bleek in de bij de neutralisatieproef gebruikte verdunning van 1/20 het complementbindend vermogen van de kleinere antigeenhoeveelheden zodanig te verlagen, dat deze bij complementconcentraties van 2 en 2½% moeilijk aantoonbaar werden.

Bij een volgende proef werd vastgesteld, dat bij gebruik van een hogere concentratie van het cavia-immuunserum, de storende invloed van de blokkerende antilichamen voor een deel onderdrukt kon worden. De gebruikte proefopstelling kwam in hoofdzaak met die van de eerste proef overeen, echter werd alleen een 2% complementoplossing gebruikt. Aan de ene helft van de plaat werd caviaserum in de verdunning 1/5 toegevoegd, in de andere werd een vijfmaal lagere concentratie gebruikt.

De uitkomsten van deze proef blijken uit tabel 26.

Opnieuw bleek de aanwezige antigeenhoeveelheid van doorslaggevende betekenis. Concentraties, welke in afwezigheid van runderantilichamen in

het reactiesysteem, ook bij gebruik van een kleine hoeveelheid caviaserum voldoende complement bleken te kunnen binden om haemolyse te voorkomen, verloren onder invloed van het runderserum vaak zoveel van hun reactiviteit, dat nog slechts partiële binding optrad.

TABEL 27. De invloed van een aantal runderimmuunsera in verschillende concentraties op de uitkomst van de complementbindingsreactie tussen mond- en klauwzeerantigeen en cavia-immuunserum I

Nummer van het runderserum	Onderzochte serumverdunning		Neutralisatietiter van het serum in de verdunning 1/20
	1/20	1/100	
355	++	++	1,9
367	++	++	1,4
368	++	++	1,3
375	++	++	1,1
380	- -	++	2,5
409 ×	++	++	< 0,9
410 ×	++	++	0,5
411	++	++	0,9
412	- -	++	> 3,8
413	±±	++	3,0
418	±±	++	2,3
420	++	++	1,3
473	++	++	0,3
474	++	++	0,1
483	++	++	< 0,7
502	++	++	0,4
513	+±	++	1,3
530	±+	++	1,6
540	±+	++	2,7
543	± -	++	3,0
551	- -	++	1,8
552	- -	++	> 2,5
556	±±	++	1,8
572	+±	++	1,1
573	±±	++	1,4
575	++	++	0,7
581	- -	++	1,9
590	- -	++	2,9
contr. ××	++	++	—
contr. ××	++	++	—
Number of cattle serum	*Serum dilution tested*		*Neutralizing titer of the serum in the dilution 1/20*

× Serum van een ongevaccineerd dier — *serum of an unvaccinated animal*
×× Geen serum toegevoegd — *no cattle serum added*
+ = geen haemolyse — *no hemolysis.*
± = partiële haemolyse — *partial hemolysis.*
— = totale haemolyse — *complete hemolysis.*

TABLE 27. *The effect of several cattle immune sera in different concentrations, on the complement-fixation reaction between foot-and-mouth disease antigen and guinea-pig immune serum I*

TABEL 28. De invloed van een aantal runderimmuunsera in verschillende concentraties op de uitkomst van de complementbindingsreactie tussen mond- en klauwzeerantigeen en cavia-immuunserum II

Serumnummer	Onderzochte serumverdunning			Neutralisatietiter van het serum in de verdunning 1/20
	1/20	3/100	1/100	
Sera van één maal geënte Ierse runderen *Irish cattle vaccinated once*				
380	− −	± ±	+ ±	2,5
412	− −	− −	± ±	3,8
413	− −	− −	± ±	3,0
418	± ±	± ±	± ±	2,3
530	± −	± ±	± +	1,6
540	− −	− −	± ±	2,7
543	− −	− −	± ±	3,0
551	− −	− −	± +	1,8
552	− −	± −	± +	2,5
556	− ±	± ±	+ +	1,8
572	− ±	± ±	± ±	1,1
573	± ±	± ±	± +	1,4
575	± ±	+ +	+ +	0,7
581	± ±	± ±	+ +	1,9
590	− −	± ±	+ +	2,9
Sera van herhaaldelijk geënte Nederlandse runderen *sera from repeatedly vaccinated Dutch cattle*				
51	± ±	+ +	+ +	3,7
52	± ±	+ +	+ +	2,9
53	± ±	± ±	+ +	4,1
54	± ±	+ +	+ +	3,8
55	± ±	+ +	+ +	3,1
56	± +	+ +	+ +	2,4
57	± ±	± ±	+ +	3,2
58	− −	± ±	± +	2,6
59	+ +	+ +	+ +	3,1
contr.	+ +			
contr.	+ +			
Number of cattle serum	*Serum dilution tested*			*Neutralizing titer of the serum diluted 1/20*

\+ = geen haemolyse — *no hemolysis.*
± = partiële haemolyse — *partial hemolysis.*
— = totale haemolyse — complete hemolysis.

TABLE 28. *The effect of several cattle immune sera in different concentrations on the complement-fixation reaction between foot- and mouth disease antigen and guinea-pig immune serum II*

In een derde proef werd nagegaan welk effect verdere verdunning van het runderserum had. Er werd een dertigtal sera van 14 dagen tevoren gevaccineerde Ierse runderen onderzocht met behulp van de volgende proefopstelling. In elke uitholling van de tegels werden 1 druppel van een O-antigeen

en 5 druppels van de te onderzoeken verdunning van het geïnactiveerde runderserum gebracht. De serumconcentraties werden zo gekozen, dat de toegevoegde hoeveelheid overeenkwam met 2 druppels van de verdunningen 1/20 of 1/100. De volumina werden gelijkgemaakt door toevoeging van fysiologische zoutoplossing. Na 1½ uur incubatie bij 37° C werd cavia-immuunserum toegevoegd, tezamen met 2 druppels van een 2% complement-oplossing. Na een nieuwe incubatieperiode van een half uur volgde dan toevoeging van het haemolytisch systeem, waarna de proef op de gebruikelijke wijze beëindigd werd. Per onderzochte serumverdunning werden twee vakjes gebruikt, terwijl ter controle in een aantal gevallen ook geen serum of serum van een niet-gevaccineerd dier werd toegevoegd. De sera werden ook in de neutralisatieproef onderzocht. Resultaten en proefopstellingen blijken uit tabel 27.

Ook in deze proef werd voldoende antigeen gebruikt om al het aanwezige complement te binden. Vele der onderzochte sera bleken in de verdunning 1/20 een duidelijk remmend effect uit te oefenen. Dit ontbrak echter in alle gevallen wanneer 100 × verdund werd. Er bestond verder bij deze 14 dagen post vaccinationem verzamelde sera een betrekkelijk goede parallel tussen de neutralisatietiter en het vermogen om de complementbindingsreactie te remmen.

Bij een vierde experiment, waarbij naast een deel van de reeds eerder onderzochte Ierse, nog verschillende sera afkomstig van meer dan zes maanden tevoren gerevaccineerde Nederlandse runderen werden gebruikt, waren de uitkomsten enigszins anders, zoals blijkt uit tabel 28.

Dit experiment is niet geheel vergelijkbaar met het vorige, daar een wat hogere concentratie van een andere antigeensuspensie werd gebruikt. Per uitholling werden twee druppels type O-antigeen toegevoegd aan resp. 5, 3 en 1 druppels van de geïnactiveerde en daarna vijftig maal verdunde sera. De verdere uitvoering was de in de vorige proeven gebruikte.

Opnieuw bleek bij sterke verdunning de invloed van het runderserum af te nemen, al werd ook in de laagst onderzochte concentratie soms nog enige remming waargenomen. Het eerder vastgestelde verband tussen neutralisatietiter en remmend vermogen werd, voor zover het materiaal van enkele weken tevoren gevaccineerde runderen betrof, bevestigd. De meeste van de van Nederlandse dieren afkomstige sera hadden slechts een gering effect op het verloop van de complementbindingsreactie tussen cavia-immuunserum en antigeen. Er bestond geen verband tussen neutralisatietiter en inhibitievermogen.

Ten slotte werd nog nagegaan in hoeverre verlenging van de tijd gedurende welke het proefsysteem in aanwezigheid van het haemolytisch systeem werd geïncubeerd, de uitkomsten beïnvloedde.

Uit tabel 29, welke een overzicht van een deel van deze proeven geeft, blijkt dat in dit opzicht de indirecte complementbindingsreactie zich gedraagt als de neutralisatieproef. Evenals in de eerder beschreven experimenten, bleek ook hier antigeenovermaat de zekerste weg om voortschrijden van de haemolyse tijdens de observatieperiode te voorkomen.

TABEL 29. De invloed van de duur van de incubatie op het voortschrijden van de haemolyse

Nummer van het runderserum	Incubatietijd in minuten											
	15				30				45			
	Antigeenconcentratie in %											
	100	75	50	25	100	75	50	25	100	75	50	25
412	++	++	±±	- -	++	±±	- -	- -	++	±±	- -	- -
418	++	++	++	±±	++	++	++	- -	++	++	++	- -
543	++	++	++	±±	++	++	++	- -	++	++	±±	- -
551	++	++	++	±±	++	++	++	±±	++	++	++	±±
552	++	++	++	- -	++	++	±±	- -	++	++	±±	- -
51	++	++	++	++	++	++	++	±±	++	++	++	±±
53	++	++	++	++	++	++	++	±±	++	++	++	±±
54	++	++	++	±±	++	++	++	±±	++	++	++	±±
contr.	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	±±
contr.	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	±±
	100	*75*	*50*	*25*	*100*	*75*	*50*	*25*	*100*	*75*	*50*	*25*
Number of the cattle serum	*Concentration of antigen in %*											
	15				*30*				*45*			
	Incubation time in minutes											

\+ = geen haemolyse — *no hemolysis.*
± = partiële haemolyse — *partial hemolysis.*
— = totale haemolyse — *total hemolysis.*

TABLE 29. *The progress of hemolysis with time*

De hierboven opgesomde onderzoekingen tonen aan, dat in de sera van vele gevaccineerde runderen antilichamen voorkomen, welke het vermogen hebben in een indirecte complementbindingsreactie te reageren. De mate waarin de reactie tussen antigeen en cavia-immuunserum gestoord wordt, is afhankelijk van de concentraties van de beide sera, alsmede van de aanwezige hoeveelheid antigeen.

Wij zijn er niet in geslaagd langs experimentele weg vast te stellen, waarom onder bepaalde omstandigheden de haemolyse in onze cultuurtjes voortgaat.

In de eerste plaats is er een duidelijke invloed van het gebruikte weefsel, welke vermoedelijk samenhangt met de reeds vermelde seizoensverschillen. De tijdens de incubatieperiode geproduceerde hoeveelheid antigeen bepaalt het verdere verloop van de reactie. Beide onderzochte antilichamen zouden secundair een, al of niet reële, afname van de beschikbare hoeveelheid complementbindend antigeen kunnen veroorzaken. Enerzijds blijkt uit ons onderzoek, dat de bij de indirecte complementbinding actieve antilichamen mogelijk een effect als het beschrevene zouden kunnen veroorzaken. Talrijke sera waren in staat in de bij de neutralisatieproef gebruikte concentratie verschillende antigeensuspensies significant in activiteit te doen afnemen. Anderzijds zouden ook de virusneutraliserende antistoffen, door afremmen van de virusvermeerdering gedurende opeenvolgende fasen van het produktieproces, wel tot het beschreven resultaat aanleiding kunnen geven.

Zoals in een van de voorgaande paragrafen werd beschreven, had verwijdering van het resterend serum uit de cultuurtjes geen significante stijging van de gevonden neutralisatietiters ten gevolge. Bij deze proeven, welke slechts op kleine schaal plaatsvonden, was een duidelijk reactiepatroon aanwezig en werden bij de aflezing geen moeilijkheden ondervonden.

Voor een werkelijk verlaagde antigeenproduktie pleiten enkele proeven, waarbij werd vastgesteld dat het gebruik van een hogere concentratie van het cavia-immuunserum geen invloed had op het verloop van de haemolyse in de cultuurtjes. Volgens de eerder genoemde door BROOKSBY (1952) gepubliceerde grafiek, heeft overmaat immuunserum geen invloed in een systeem, waarin het antigeen als beperkende factor de hoeveelheid complement welke gebonden kan worden, bepaalt. Indien de remming een gevolg van het blokkeren van antigeen was, zou men op grond van onze proeven wel verwachten, dat verhoging van de caviaserumconcentratie het complementbindend vermogen van het antigeen kon doen toenemen.

Wij moeten dus vaststellen dat geen definitief antwoord werd verkregen op de vraag of, en zo ja welke, antistoffen verantwoordelijk zouden kunnen zijn voor het soms waargenomen voortschrijden van de haemolyse in de cultuurtjes. Wel werd het waarschijnlijk dat de gevormde hoeveelheid complementbindend antigeen van grote betekenis was. Voor een maximale opbrengst hiervan is in de eerste plaats het weefsel van belang, zodat aandacht moet worden besteed aan het verkrijgen van een zo actief mogelijke epitheelsuspensie. Het bleek mogelijk langs deze weg tot een praktische oplossing te komen, door gebruik te maken van weefsel van gevoelige dieren. De aflezing geschiedt nu zo, dat tijdens de laatste incubatieperiode het verloop van de reactie regelmatig gecontroleerd wordt. Ongeveer 15 minuten nadat in de cultures welke de virustitratie bevatten een eindpunt is bereikt, wordt de proef beëindigd. Een aan het eind van de observatieperiode nog incomplete haemolyse wordt opgevat als indicatie voor de aanwezigheid van specifiek antigeen.

g. Betrouwbaarheid van de neutralisatieproef[2]

De bij de neutralisatieproef optredende variabiliteit werd onderzocht door een aantal rundersera meerdere malen te titreren.

Tabel 30 geeft een overzicht van een deel van deze proeven.

De onderzochte sera, die afkomstig waren van Ierse runderen die 14 dagen tevoren met een monovalente O-entstof waren gevaccineerd, werden na inactivering onderzocht in de verdunning 1/10. De bij het onderzoek gebruikte virusfiltraten waren ten hoogste één week bij koelkasttemperatuur bewaard. Tongepitheel werd verkregen van slachtrunderen van het Amsterdamse abattoir. De proeven werden uitgevoerd tussen begin april en eind september 1955.

In vele gevallen bleken de op verschillende data gevonden uitkomsten goed met elkaar in overeenstemming te zijn, soms bestonden echter belangrijke verschillen.

Als mogelijke oorzaak van deze variatie kwamen in de eerste plaats de

TABEL 30. Variatie van proefuitkomsten bij herhaalde titratie van enkele sera

Serumnummer *Serum number*	Serumtiter – *Titer of serum*			
	Bepaling no. – *Titration no.*			
	1	2	3	4
368	1,4	1,2	1,0	
371	1,1	1,9	1,7	
375	1,2	1,9	1,7	
410	0,2	0,4		
411	2,1	2,3	0,8	0,9
413	2,6	3,3	2,7	
418	2,2	2,9	1,9	
420	1,3	1,3	1,3	
423	2,9	1,7	1,2	
473	0,3	0,2		
474	0,0	0,1		
502	0,4	0,2		
513	1,3	1,8	2,0	1,4
540	2,6	2,8		
543	3,6	3,9	3,5	
551	1,8	1,9		
556	1,8	1,6		
572	1,1	1,5	1,3	
575	0,7	0,6	0,5	
581	1,9	2,4		

TABLE 30. *Variation of serum titers in repeated titrations*

[2] Dit onderzoek werd uitgevoerd met de medewerking van Dr. E. F. DRION van de afdeling Bewerking Waarnemingsuitkomsten T.N.O., die ik daarvoor gaarne mijn dank betuig.

TABEL 31. Invloed van bewaren van de smetstof op de serumtiter

	Vers virus	Virussuspensie 8 dagen bewaard in ijskast	Virussuspensie 15 dagen bewaard in ijskast
Virustiter (neg. log ID_{50})	5,8	5,3	5,1
Serumtiter (verdunning — *dilution:* 1/10)	2,0	0,8	0,8
	Freshly prepared virus filtrate	*Virus filtrate kept in refrigerator for 8 days*	*Virus filtrate kept in refrigerator for 15 days*

TABLE 31. *Effect of storage of virus on the serum titer*

gebruikte virusfiltraten in aanmerking. Op de betekenis van niet-infectieuze bestanddelen van de smetstofsuspensie voor de uitkomst van de neutralisatieproef, werd reeds door verschillende onderzoekers gewezen (zie BROOKSBY, 1949 en MELNICK en OPTON, 1956). Dat ook bij onze experimenten dergelijke factoren van betekenis kunnen zijn, blijkt uit de in tabel 31 weergegeven proef.

Dit serum werd zowel onderzocht met behulp van een pas geoogste smetstof, als met een tweetal andere virusfiltraten, welke resp. 8 en 15 dagen in de koelkast waren bewaard. Ten gevolge van het verblijf in de ijskast daalde de infecticsiteit en de met deze antigeensuspensies gevonden serumtiters waren lager dan die, welke met het vers bereide antigeen werden verkregen.

Dat de daling van het virusneutraliserend vermogen van het serum een gevolg is van een in de virussuspensie aanwezige niet-infectieuze fractie, wordt waarschijnlijk, wanneer men de proeven beziet waarvan tabel 32 een overzicht geeft.

De gemengde sera van enkele Nederlandse runderen werden in de verdunning 1/200 onderzocht met behulp van een bij −30° C bewaard O-virusfiltraat. Met de smetstof werden verschillende verdunningsseries aangelegd.

Naast de gebruikelijke reeks werd een serie gemaakt, waarin de verdunning 10^{-1} werd verkregen door 1 cc virus te mengen met 6 cc verdunningsvloeistof en 3 ml niet-infectieuze smetstof. Laatstgenoemde suspensie bevatte door bestraling met ultraviolet licht geïnactiveerd O-antigeen, dat bij onderzoek in gevoelige runderen niet meer infectieus was gebleken, doch wel in staat was te immuniseren.

In een derde serie buizen werd de verdunning 10^{-1} verkregen door 1 cc virussuspensie te mengen met 9 cc van het bestraalde antigeen. In enkele proeven werd ook nog een vierde reeks smetstofverdunningen gebruikt, waarin

ook de verdunning 10^{-2}, in plaats van met kweekvloeistof, met het geïnactiveerde antigeen werd gemaakt. Verdere verdunningen werden in alle gevallen bereid op de gebruikelijke wijze. Steeds werd gelijktijdig met de neutralisatieproef een smetstoftitratie uitgevoerd.

Uit de proefuitkomsten blijkt, dat er een positieve correlatie bestond tussen de concentratie van het geïnactiveerde antigeen in de voor de neutralisatieproef gebruikte virussuspensie en de daarmee gevonden serumtiter.

De bestraalde smetstof veroorzaakte een daling van de serumactiviteit, welke toenam naarmate het gehalte aan geïnactiveerd virus steeg. Deze waarneming was o.a. in overeenstemming met de door KRECH (1955) bij de neutralisatie van poliomyelitisvirus gevonden resultaten.

Ter verbetering van de vergelijkbaarheid van de in verschillende neutralisatieproeven verkregen uitkomsten kwamen twee maatregelen in aanmerking.

Ten eerste was het gewenst de mogelijkheid te onderzoeken, smetstofsuspensies van constante samenstelling te verkrijgen. Ten tweede leek het gebruik van een controleserum in elke proef aan te bevelen.

Virusfiltraten welke in de koelkast worden bewaard, vertonen op den duur een titerdaling. Deze afneming van het gehalte aan infectieus virus zal waarschijnlijk gepaard gaan met een verandering van de verhouding tussen infectieus en niet-infectieus antigeen, zodat met dergelijke suspensies dan geen constante serumtiters te verwachten zijn. Mond- en klauwzeervirusbevattende vloeistoffen, welke na toevoeging van runderalbumine in bevroren toestand worden bewaard, blijken aanzienlijk stabieler, zodat ook na maanden

TABEL 32. Invloed van bestraald antigeen op de serumtiter

Antigeensamenstelling verhouding bestraald / niet bestraald antigeen			Proefnummer		
			1[1]	2[1]	3[2]
			Serumtiter		
—	/	1	2,3	2,5	2,0
3	/	1	2,1	2,2	2,0
9	/	1	1,8	2,0	1,5
99	/	1	—	1,3	1,3
irradiated to non-irradiated Rate of antigen			*Titer of serum*		
			1[1]	*2*[1]	*3*[2]
			Number of test		

1 Antigeen geïnactiveerd door bestraling gedurende 2 uur — *Antigen rendered non-infective by irradiation for 2 hours.*
2 Antigeen geïnactiveerd door bestraling gedurende 2½ uur — *Antigen rendered non-infective by irradiation for 2½ hours.*

TABLE 32. *The effect of ultraviolet irradiated antigen on the serum titer*

TABEL 33. Overzicht van voor serum P_2 met behulp van een in de diepvries bewaarde virussuspensie gevonden neutralisatietiters

Proefnummer *No. of test*	Virustiter (neg. log ID_{50})	Serumtiter (log aantal ID_{50})
184	6,3	1,9
185	6,3	2,5
186	5,7	2,2
187	5,9	2,0
188	6,0	2,3
189	5,5	1,9
190	6,0	2,0
191	5,8	1,8
192	5,8	2,1
196	5,5	2,4
197	5,7	1,4
199	5,8	1,7
200 a	5,3	0,7
200 b	6,4	2,1
201	6,6	2,8
202	7,1	2,9
203	5,4	1,4
204	4,9	1,7
205	6,8	2,4
206	6,8	2,7
207	5,6	1,6
208	5,8	1,6
210	6,4	2,4
211	6,3	2,0
213	5,6	1,4
214	5,8	1,2
215	6,5	2,1
216	6,3	2,1
217	6,4	2,4
247	6,2	2,3

Het serum werd onderzocht in de verdunning 1/200 — *The serum was tested in the dilution of 1/200.*
De door een accolade verbonden experimenten werden uitgevoerd met dezelfde weefselsuspensie, doch op opeenvolgende dagen — *Tests marked with an accolade were carried out with one tissue suspension but on successive days.*

TABLE 33. *Titers found for control serum P_2 with one virus suspension that had been stored at —30° C*

geen daling van de infectiositeit is waar te nemen. Bij vele virusantigenen is "infectiositeit" de meest labiele eigenschap van de smetstof, die onder ongunstige omstandigheden het eerst verloren gaat. De structuren welke ten grondslag liggen aan andere facetten van de virusactiviteit, zoals het vermogen complement te binden, erythrocyten te agglutineren en antilichamen op te wekken, zijn in de regel meer resistent. Het is daarom waarschijnlijk, dat in bevroren toestand bewaarde suspensies ook wat betreft deze andere eigenschappen constant zullen blijven, zolang de infectiositeit niet afneemt.

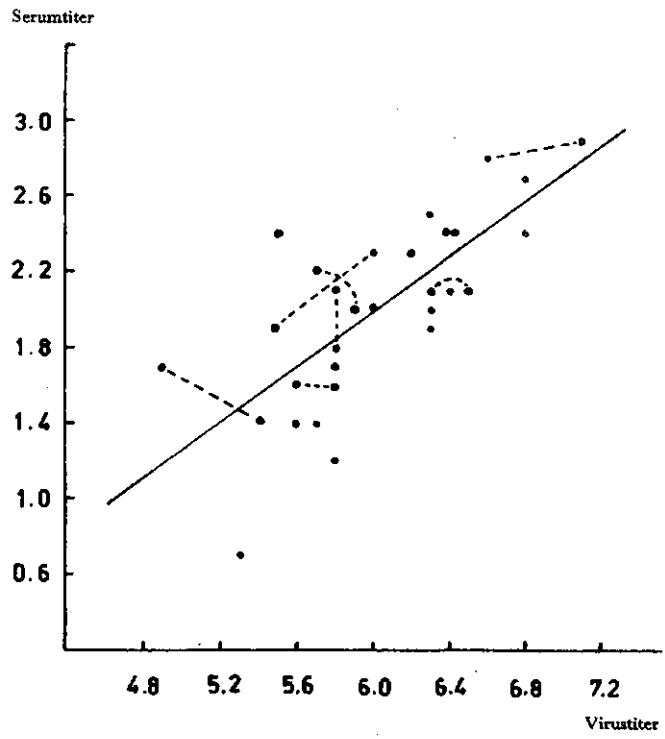


FIG. 3

Invloed van het weefsel op de voor één serum bij herhaalde titratie gevonden titers

Alle titraties zijn uitgevoerd met hetzelfde virusfiltraat 0 190 — *One virus filtrate was used in all tests.*

Verbonden punten werden gevonden met één weefselsuspensie, doch op opeenvolgende dagen — *Connected points were obtained with one tissue suspension, but on consecutive days.*

De best passende rechte regressielijn — *The best fitting straight regression line*

$Y = -2{,}37 + 0{,}726\ X$

FIG. 3

The influence of the tissue on the neutralizing titers found for one serum in repeated titrations

Ten einde na te gaan, welk effect het gebruik van bij −30° C bewaard virus op de variabiliteit van de proefuitkomsten had, werd een bepaald serum herhaaldelijk met behulp van een dergelijke smetstof onderzocht.

Een virussuspensie werd verkregen door een met O-smetstof geïnfecteerde tongepitheelcultuur na een incubatie van 20 uur af te breken en het weefsel met kwartszand te verwrijven. Het grovere materiaal werd door centrifugeren verwijderd, waarna de bovenstaande vloeistof na toevoegen van 2½% runderalbumine door middel van een Seitz EKS-filter werd gesteriliseerd. De vloeistof werd in hoeveelheden van enkele milliliters ingevroren.

Als serum werden de gemengde sera van een aantal korte tijd tevoren gerevaccineerde Nederlandse slachtrunderen gebruikt die, indien ze in de verdunning 1/200 onderzocht werden t.o.v. gelijke hoeveelheden van verschillende smetstofverdunningen, ongeveer 100 ID_{50} neutraliseerden.

De serumconcentratie in de serum-virusmengsels bedroeg dan dus 1/400. De reeks virusverdunningen werd gemaakt met een half log interval.

De proeven werden tussen begin mei en eind augustus 1956 uitgevoerd, voornamelijk met weefsel afkomstig van Nederlandse slachtrunderen. De meeste van deze dieren waren dus 2 tot 5 maanden tevoren gevaccineerd.

Een overzicht van de resultaten wordt gegeven in tabel 33.

Hoewel de bij verschillende titraties gevonden eindpunten niet onbelangrijk verschillen, blijkt uit het titerverloop geen activiteitsverlies van de smetstof. Worden de uitkomsten grafisch uitgezet (fig. 3), dan blijkt er een duidelijke positieve correlatie te bestaan tussen de in een bepaalde proef gevonden titers van virus en serum.

De reeds eerder geconstateerde variaties in weefselgevoeligheid gaan dus vergezeld van verschillen in de grootte van de gevonden neutralisatietiters.

Het ligt voor de hand aan te nemen dat de oorzaak van de variatie van de serumtiters bij het weefsel gezocht moet worden. Hiervoor pleit o.a. dat de uitkomsten, welke verkregen werden bij op opeenvolgende dagen met een zelfde weefselsuspensie ingezette experimenten, minder verschilden dan die gevonden bij gebruik van op verschillende dagen verzameld epitheel.

Een nadere analyse van de weefselinvloed bracht nog enkele nieuwe gezichtspunten aan het licht. Zo bleek het er weinig toe te doen of er een groter of kleiner percentage weefsel van meer oppervlakkige lagen werd gebruikt. In de proeven die dit demonstreerden, werden telkens na verwijdering van de verhoornde oppervlakkige cellagen, het direct daaronder gelegen epitheel en het dieper liggende epidermale weefsel op de gebruikelijke manier verzameld en apart opgevangen. Er werden drie soorten cultuurtjes aangelegd, nl. met alleen oppervlakkig weefsel, met uitsluitend epitheel van de diepste lagen en met beide gemengd. Naast de virustitratie werden telkens twee neutralisatieproeven gedaan met twee sera van belangrijk verschillende titers. Tabel 34 geeft een overzicht van deze proeven.

TABEL 34. De invloed van het gebruik van weefsel van verschillende diepte op de ermede voor één virussuspensie en twee sera gevonden titers

Proefnummer	1			2			3			4			5			*No. of test*
	V	S_1	S_2	V	S_1	S_2	V	S_1	S_2	V	S_1	S_2	V	S_1	S_2	
Weefsel																*Tissue*
oppervlakkig	5,7	x	0,4	5,0	x	0,5	x	x	x	x	x	x	x	x	x	*superficial*
diep	5,5	1,5	0,2	5,5	1,8	0,4	6,4	1,9	0,4	6,6	2,5	0,6	6,4	2,1	0,6	*deep*
gemengd	5,5	1,5	0,1	5,8	1,9	0,5	6,2	2,0	0,4	6,3	2,3	0,3	6,2	2,3	0,4	*mixed*

V = Virustiter — *virus titer.*
S_1 = Serumtiter 1e serum — *titer of 1st serum.*
S_2 = „ 2e serum — *titer of 2nd serum.*
x = reactie moeilijk of niet af te lezen — *reading of the test difficult or impossible.*

TABLE 34. *The effect of tissue from different levels on the titers found with one virus suspension and two sera*

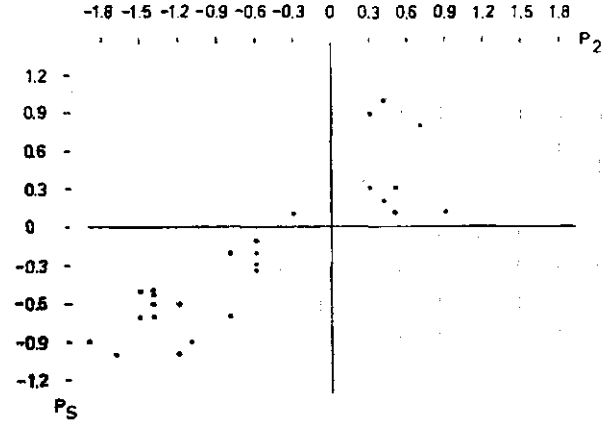
De meer oppervlakkig gelegen epitheellagen blijken weinig geschikt voor de virustitratie, een resultaat dat op grond van de eerder door FRENKEL en DUNNE (1952) gepubliceerde uitkomsten te verwachten was. De proefuitslagen wijzen er verder niet op, dat de wijze waarop het diepere weefsel wordt geoogst een belangrijke invloed heeft, zolang het epitheel slechts voldoende virusvermeerdering toelaat.

Een vraag welke zich thans voordeed was in hoeverre de blijkbaar belangrijke weefselfactor de resultaten, verkregen bij onderzoek van verschillende sera, op gelijke wijze beïnvloedde. Hiervan was immers de mogelijkheid de proefuitkomsten te corrigeren met behulp van een controleserum afhankelijk.

Een eerste indruk van de situatie kon worden verkregen door analyse van de uitkomsten van een aantal serumtitraties, welke verricht waren in verband met een ander onderzoek. Bij deze proeven was telkens een zelfde controleserum onderzocht tegenover een enkele bij −30° C bewaarde virussuspensie. Verschillende van deze bepalingen werden herhaald.

Indien in een grafiek voor elk serum het tussen twee dergelijke eindpunten gevonden verschil werd uitgezet tegenover het verschil tussen de in dezelfde proeven gevonden titers van het controleserum, bleken deze beide grootheden een duidelijk positieve correlatie te vertonen (fig. 4). Voor de correlatiecoëfficiënt werd een waarde van + 0,86 berekend (tabel 35). Hieruit mag geconcludeerd worden, dat de belangrijkste bij deze proeven aanwezige variabele, het weefsel, telkens de gelijktijdig onderzochte sera in gelijke richting beïnvloedde.

FIG. 4. De correlatie tussen het verschil van de eindpunten van twee maal onderzochte proefsera en het bijbehorende verschil van de titratie-uitkomsten van het controleserum



P_2 = Verschil tussen de eindpunten van het controleserum P_2 — *Difference between the end-points found for control serum P_2.*

P_S = Verschil tussen de eindpunten van een tegelijk met P_2 onderzocht proefserum — *Difference between the end-points obtained for another serum in the same tests.*

FIG. 4. *The correlation of the differences observed between end-points obtained in repeated titrations for a number of test sera and those found for the control serum tested simultaneously*

TABEL 35. De invloed van het weefsel op de titratie-uitkomsten van gelijktijdig onderzochte sera. Correlatie van de bij herhaald onderzoek van telkens twee sera waargenomen verschillen

X_1	X_2
+ 0,9	+ 0,3
+ 0,1	— 0,3
— 0,5	— 1,4
— 0,6	— 1,2
+ 1,0	+ 0,4
+ 0,2	+ 0,4
— 0,2	— 0,8
— 0,6	— 1,4
— 1,0	— 1,7
— 0,3	— 0,6
— 0,7	— 1,4
— 1,0	— 1,2
+ 0,3	+ 0,5
— 0,5	— 1,4
— 0,2	— 0,6
— 0,9	— 1,9
— 0,3	— 0,6
— 0,9	— 1,1
— 0,7	— 1,5
+ 0,8	+ 0,7
+ 0,1	+ 0,9
— 0,5	— 1,5
— 0,7	— 0,8
+ 0,3	+ 0,3
+ 0,1	+ 0,5
— 0,1	— 0,6

$X_1 = s_1 - s_2$ = verschil tussen de beide eindpunten van een proefserum — *difference between the two end-points found for one serum*

$X_2 = p_1 - p_2$ = verschil tussen de bij dezelfde proeven gevonden waarden van het controleserum — *difference between the end-points found for the control serum in the same tests*

$\bar{x}_1 = -0{,}25$

$\bar{x}_2 = -0{,}63$ $\qquad n = 26$

Correlatiecoëfficient — *correlation coefficient:*

$$r = \frac{\lesssim x_1 x_2}{\sqrt{\lesssim x_1^2 \times \lesssim x_2^2}}$$

$$= \frac{10{,}69}{\sqrt{8{,}19 \times 18{,}19}} = 0{,}88$$

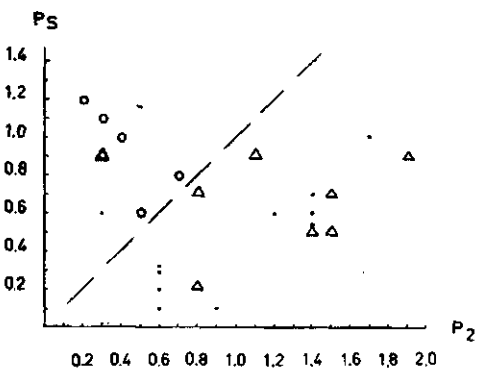
TABLE 35. *The effect of the epithelium on the titration end-points obtained with sera that were tested simultaneously. The correlation of the differences observed between the end-points found for each of two sera in repeated titrations.*

In 21 van de 26 gevallen bleek het verschil tussen twee bepalingen van het controleserum groter dan dat tussen de tegelijkertijd verkregen uitkomsten van het andere onderzochte serum.

Teneinde voor deze waarneming een verklaring te vinden werd bij een nog enigszins uitgebreid materiaal nagegaan, in hoeverre er een verband bestond tussen de grootte van het bij de herhaalde bepalingen gevonden verschil en de gemiddelde titer van de proefsera. Fig. 5 geeft een overzicht van een deel van de uitkomsten van dit onderzoek. In vele gevallen waren de verschillen tussen de beide uitkomsten van elke twee sera gering; dergelijke resultaten zijn niet opgenomen, daar de grote opeenhoping van punten in het linkeronderdeel van de grafiek de overzichtelijkheid daarvan niet ten goede zou zijn gekomen.

Sera met een titer van meer dan 2,0 bleken sterker variërende uitkomsten te geven dan het controleserum. Bij minder actieve sera leek eerder het om-

FIG. 5. Het verband tussen de gemiddelde titers van enkele sera en de verschillen welke optreden tussen de voor elk serum gevonden eindpunten, indien in een aantal proeven meerdere sera gelijktijdig worden onderzocht



P_s = Verschil tussen de bij twee titraties van een proefserum gevonden eindpunten
P_s = The difference between the end-points found in two titrations of a test serum.

P_2 = Verschil tussen de in dezelfde proeven gevonden eindpunten van het controleserum
P_2 = The difference between the end-points obtained for the control serum in the same tests.

O Gemiddelde titer van het proefserum $> 2{,}0$ *Mean titer of the test serum > 2.0.*

△ Gemiddelde titer van het proefserum tussen 1,0 en 2,0 — *Mean titer of the test serum between 1.0 and 2.0.*

· Gemiddelde titer van het proefserum $< 1{,}0$ *Mean titer of the test serum < 1.0.*

FIG. 5. *The relation between the mean titers of a number of sera and the differences observed between the end-points found for each of them, if several sera were tested simultaneously in different experiments*

gekeerde het geval te zijn. Daar 2,0 ongeveer de gemiddelde titer was, welke voor het hier gebruikte controleserum gevonden werd, wordt de indruk gewekt, dat de weefselinvloed afnam bij lagere serumtiter.

Het onderzoek werd daarom voortgezet door een tweetal proefsera (P_3 en P_4) samen met het controleserum P_2 een groot aantal malen te onderzoeken met behulp van één virussuspensie. In de regel werden alle te onderzoeken sera op één dag tweemaal ingezet met verschillend epitheel. Tabel 36 en fig. 6 geven een overzicht van de proefuitkomsten. De bijeenbehorende serum- en virustiters werden wederom grafisch tegen elkaar uitgezet. Opnieuw bleek er een verband te bestaan tussen de titer van het virus en de met hetzelfde weefsel gevonden serumtiter. De drie onderzochte sera vertoonden een overeenkomstig gedrag. De beide proefsera P_3 en P_4 hadden beide een lagere titer dan het controleserum P_2 en de voor deze sera gevonden uitkomsten varieerden in het algemeen ook minder dan die van het controleserum.

Indien weefsel van niet-gevaccineerde runderen werd gebruikt, bleek de weefselinvloed aanzienlijk minder belangrijk. De correlatie tussen de titers van virus en serum werd dan eveneens minder duidelijk, zoals blijkt uit tabel 37 en fig. 7.

Dat hier de distributie van de punten in de verschillende populaties niet symmetrisch is, kan mogelijk een gevolg zijn van de wijze waarop bij de virustitratie gemaakte proeffouten zowel de uitkomst daarvan, als die van de neutralisatieproef, beïnvloeden. Indien alleen onnauwkeurigheden optraden bij de smetstoftitratie, zouden in de grafiek ten gevolge van de wijze waarop de neutralisatietiter berekend wordt, alle punten liggen op een lijn, welke onder een hoek van 45° van links onder naar rechts boven liep.

TABEL 36. Variatie van de voor sera P_2, P_3 en P_4 gevonden titers, bij gebruik van één virussuspensie en epitheel van verschillende runderen

Proef-nummer	Virus-titer	Serumtiter			Herkomst weefsel
		P_2	P_3	P_4	
221	7,05	2,25	1,95	—	N. [1]
	7,05	2,35	1,96	—	N.
	6,19	1,64	0,89	—	N.
222	6,55	2,02	1,35	—	N.
	6,32	1,62	1,27	—	N.
	6,70	2,55	1,62	—	N.
223	5,90	1,65	1,60	—	N.
	6,55	2,01	1,55	—	N.
	6,00	1,99	1,41	—	N.
224	5,95	1,96	1,43	—	N.
	6,00	2,04	—	—	N.
	6,44	2,29	1,53	—	N.
227	6,35	1,80	1,21	0,30	N.
	6,60	2,35	1,80	0,46	N.
228	6,75	2,16	1,55	0,28	N.
	6,90	2,36	1,66	0,80	N.
229	6,60	2,18	1,85	0,58	N.
	6,94	2,86	2,05	0,84	N.
231	5,68	1,30	1,10	0,43	N.
	5,78	1,80	1,02	0,19	N.
233	6,75	2,45	1,65	0,35	N.
	5,94	1,49	1,37	0,14	N.
234	6,26	1,72	1,17	0,61	N.
	5,95	1,76	1,33	0,15	N.
235	6,39	1,80	1,69	0,53	N.
	5,70	1,96	1,19	0,30	N.
237	4,92	1,33	1,07	0,16	N.
	5,20	1,12	1,10	0,05	N.
240	6,65	1,93	1,90	0,68	N.
	5,44	1,40	0,88	0,26	N.
241	6.06	1,67	1,44	0,16	N.
	5,97	1,57	0,94	0,22	N.
242	5,69	1,64	1,23	0,26	N.
	4,65	1,07	1,11	0,05	N.
Number of test	*Virus titer*	*Serum titer*			*Origin of tissue*

[1] N = Nederlandse rund — *Dutch animal.*

TABLE 36. *The variation of the titers found for three sera P_2, P_3 and P_4 in a series of simultaneous titrations carried out with one virus suspension and tongue epithelial tissue from different animals*

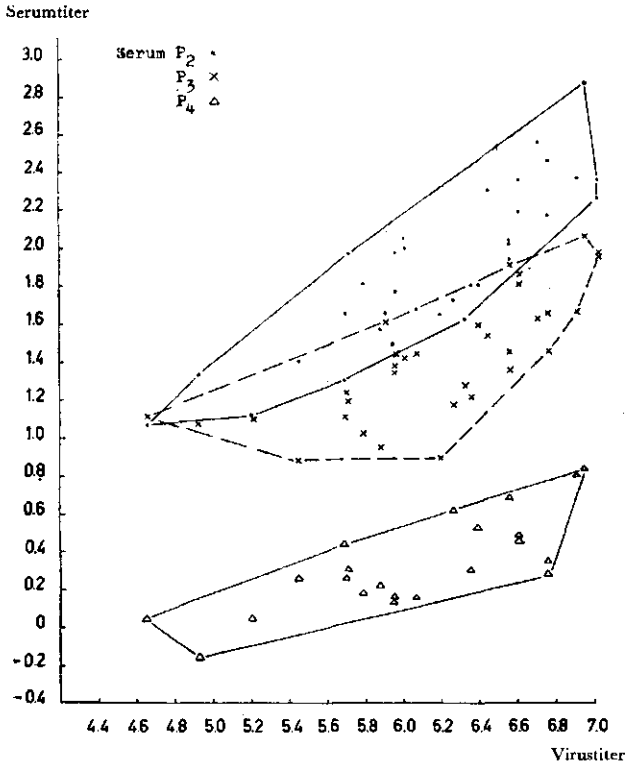


FIG. 6

De invloed van het weefsel op de voor verschillende sera bij herhaalde titratie gevonden titers I

FIG. 6

The effect of different tissue suspensions from immunized cattle on the titers of serum and virus, as found when three sera were repeatedly tested with one virus filtrate stored at —30° C, I

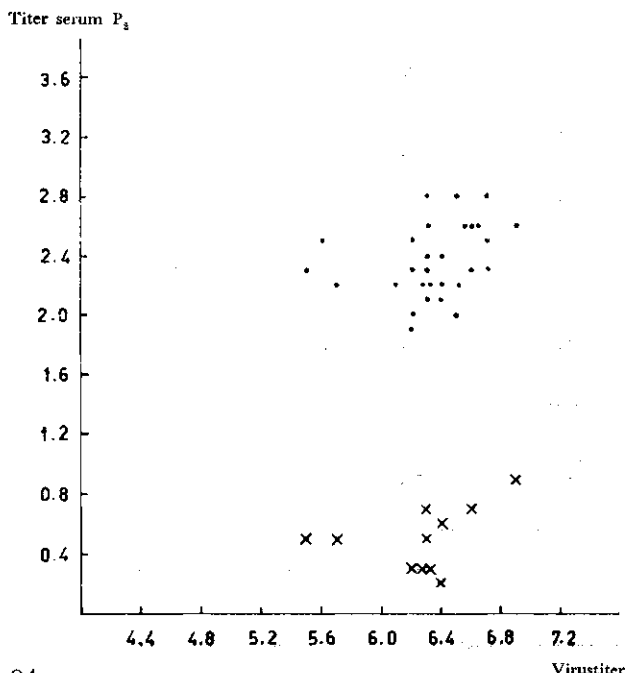


FIG. 7

De voor controleserum P_2 en proefserum P_4 bij gebruik van een bij lage temperatuur bewaarde virussuspensie en weefsel van gevoelige runderen, gevonden titers

FIG. 7

The effect of a number of epithelium suspensions from susceptible stock on the titers of serum and virus, as observed, when two sera were repeatedly titrated against one virus filtrate stored at —30° C

Fouten gemaakt bij de neutralisatieproef zullen alleen een horizontale strooiing ten gevolge kunnen hebben. Aangezien in de praktijk beide afwijkingen voorkomen, zullen in een grafiek, welke het verband tussen serum- en virustiter geeft, de waarnemingen liggen als een groep punten, welke een hoek van ongeveer 45° met de horizontale as maakt. De strooiing zou aanzienlijk kleiner zijn dan die, welke thans gevonden wordt, wanneer weefselverschillen de variabiliteit niet vergrootten.

Het gebruik van meervoudige regressies bleek statistisch zinloos. De hellingen van de regressielijnen van P_3 en P_4 op P_2 bleken verder significant te

TABEL 37. Overzicht van de titratie-uitkomsten van sera P_2 en P_4 bij gebruik van één virussuspensie en weefsel van niet-gevaccineerde runderen

Proef-nummer	Virus-titer	Serumtiter	
		P_2	P_4
238	5,5	2,3	0,5
	5,7	2,2	0,5
239	6,3	2,6	0,7
	6,3	2,3	0,5
245	6,2	2,0	0,3
246	6,3	2,2	0,3
249	6,4	2,4	0,6
250	6,9	2,6	0,9
254	6,3	2,1	0,3
255	6,6	2,3	
256	6,7	2,3	
257	6,2	2,3	
259	6,2	2,5	
260	6,4	2,1	0,2
261	6,6	2,6	0,7
262	6,7	2,5	
263	6,3	2,8	
264	6,5	2,0	
268	6,3	2,4	
270	6,3	2,2	
271	6,6	2,6	
272	6,5	2,2	
273	6,8	2,7	
274	6,4	2,2	
275	6,2	1,9	
276	5,6	2,5	
277	6,5	2,8	
278	6,7	2,8	
279	6,1	2,2	
280	6,6	2,6	
Number of test	*Virus titer*	*Serum titer*	

TABLE 37. *Titration end-points obtained for two sera, P_2 and P_4, in tissue derived from unvaccinated cattle, using one virus filtrate*

verschillen (0,66 en 0,38, P = 0,014), zodat correctie voor het verschil tussen rundertongen met behulp van het controleserum niet zonder meer mogelijk was.

Met behulp van een andere virussuspensie (208 A), werd de invloed van het weefsel op de uitkomsten van de neutralisatieproef daarom nog eens uitgebreider nagegaan met sera van meer uiteenlopende activiteit. Opnieuw werden de titraties van virus en serum daarbij gelijktijdig uitgevoerd in epitheel afkomstig van één tong.

De proefuitkomsten werden samengevat in tabel 38, terwijl fig. 8 een overzicht geeft van het verband tussen de titers van virus en sera en fig. 9 van dat tussen de andere onderzochte sera en het controleserum P_2.

Evenals in de vorige proef is er ook hier weinig reden een andere dan rechtlijnige regressie van de titers van de sera op die van het virus aan te nemen. Voor elk der sera werd de regressie van de neutralisatietiter op die van het controleserum berekend, waarbij als steeds de serumtiter werd uitgedrukt

TABEL 38. Overzicht van de voor een vijftal sera in telkens gelijktijdig uitgevoerde titraties gevonden proefuitkomsten. Alle proeven werden uitgevoerd met één bij —30° C bewaarde virussuspensie.

Nummer van de proef	Herkomst van het weefsel	Virus-titer	Serumtiter				
			P_2	P_5	P_6	P_7	P_8
290	Nederl.—*Dutch*	6,57	2,61	4,98	1,98	1,92	0,67
292	„	6,35	2,10	4,68	1,68	2,00	0,70
293	„	5,13	1,07	3,47	0,63	1,12	0,12
295	„	6,32	2,02	3,97	1,31	1,46	0,47
296	„	5,36	0,88	3,31	1,14		0,43
297	„	5,20	1,11	3,19	1,07		0,40
298	„	6,15	1,68	4,11	1,45	1,52	0,85
299	„	4,22	0,61	3,17			
300	„	5,23	1,56	3,63	1,25	0,81	0,33
301	„	5,32	1,02	3,57	0,77	1,11	0,58
302	„	6,15	1,96	4,65	1,13	1,77	1,07
303	„	5,50	1,79	4,01	1,16	1,35	0,31
304	„	5,85	1,36	3,77	0,81	1,55	0,41
305	Engels—*English*	4,83	1,17	3,03	0,77		0,48
311	„	6,00	1,40	4,38	1,30	1,35	0,70
313	„	6,55	2,39	4,11	1,63	1,64	0,70
314	„	6,33	1,96	4,69	1,31	1,75	0,53
317	„	5,90	2,10	4,81	1,27	1,72	0,80
318	„	5,81	1,33	4,51	0,65	1,18	0,20
319	Iers — *Irish*	6,71	2,41	4,21	1,73	1,86	1,04
Number of test	*Origin of tissue*	*Virus titer*	*Serum titer*				

TABLE 38. *Titration end-points found for five sera which were repeatedly tested simultaneously, using one virus filtrate stored at —30° C*

FIG. 8

De invloed van het weefsel op de voor de verschillende sera bij herhaalde titratie gevonden titers II

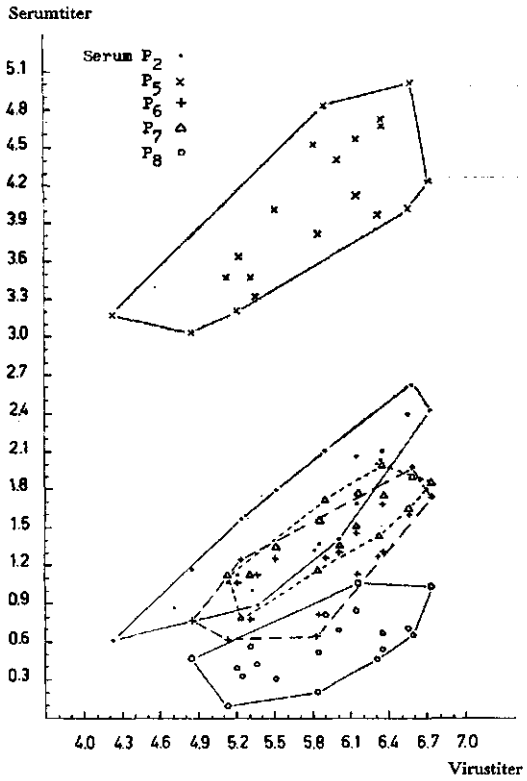


FIG. 8

The effect of different tissue suspensions from immunized cattle on the titers of serum and virus, as found when three sera were repeatedly tested with one virus filtrate stored at —30° C, II

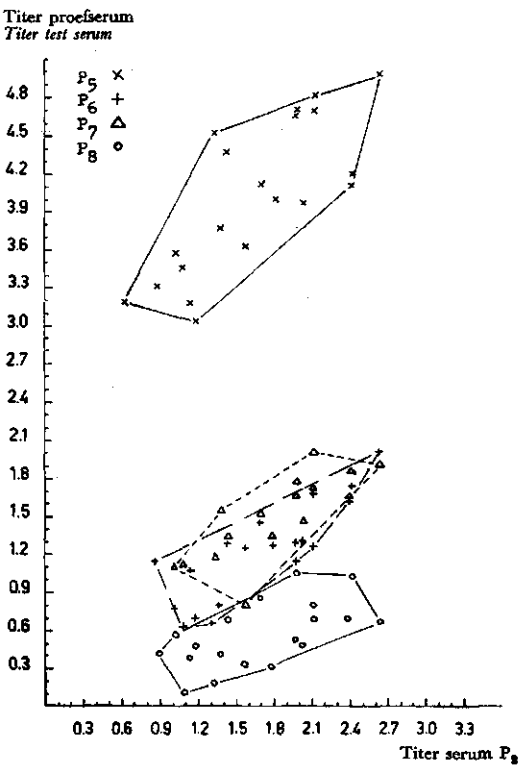


FIG. 9

De invloed van het weefsel op de variatie van de titers van sera P_5, P_6, P_7 en P_8, ten opzichte van die van P_2

FIG. 9

The effect of the tissue on the variations of the titers of sera P_5, P_6, P_7 and P_8, compared to that of P_2

TABEL 39. Berekening van de grafiek van figuur 11

Uit fig. 10 afgeleide waarden voor de constanten a en b		Bijbehorende waarde van P voor:		
a	b	$P_2 = 1,0$	$P_2 = 2,0$	$P_2 = 3,0$
0,10	0,30	0,40		1,00
0,20	0,42	0,62		1,46
0,30	0,49	0,79		1,77
0,40	0,55	0,95		2,05
0,50	0,60	1,10		2,30
0,60	0,64	1,24		2,52
0,70	0,68	1,38		2,74
0,80	0,72	1,52		2,96
0,90	0,75	1,65		3,15
1,00	0,77	1,77		3,31
1,10	0,80	1,90		3,50
1,20	0,82	2,02		3,66
1,30	0,84	2,14		3,82
1,40	0,86	2,26		3,98
1,50	0,875	2,38		4,13
1,60	0,89	2,49		4,27
1,70	0,905	2,61		4,42
1,80	0,92	2,72		4,56
1,90	0,93	2,83		4,69
2,00	0,935	2,94		4,81
2,10	0,95	3,05		4,95
2,35	0,96	3,31		5,23
2,60	0,97	3,57		5,51
2,90	0,98	3,88	4,86	5,84
3,20	0,99	4,19	5,18	6,17
Values of the constants a and b as derived from fig. 10		*Values of P*		

TABLE 39. *Calculation of the graph of fig. 11*

als de log van het aantal geneutraliseerde ID_{50}. De volgende regressievergelijkingen werden daarbij gevonden:

$$P_5 = 2,48 + 0,971\ P_2,$$
$$P_6 = 0,20 + 0,603\ P_2,$$
$$P_7 = 0,53 + 0,542\ P_2,$$
$$P_8 = 0,07 + 0,296\ P_2,$$

en ten slotte voor de smetstof

$$V = 4,11 + 1,017\ P_2.$$

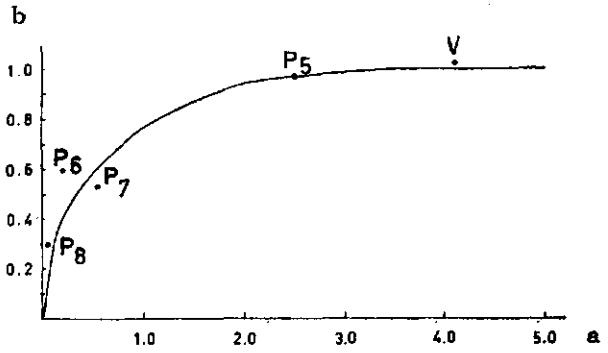
De standaardafwijkingen van de bepalingen werden berekend op 0,42; 0,22; 0,22; 0,22 en 0,32. De algemene formule voor deze regressielijnen is $P = a + b\ P_2$. Hierin wordt met P aangegeven de log van het aantal door de onderzochte serumverdunning geneutraliseerde aantal ID_{50}.

FIG. 10

Het verband tussen de constanten a en b van de regressielijnen welke werden gevonden, indien de regressies van de titers van een aantal proefsera op die van het controle serum P_2 werden berekend

FIG. 10

The relation between the constants a and b of regression lines obtained, when the regressions of the titers of a number of sera on those of the control serum P_2 were calculated



Indien de op deze wijze voor de verschillende sera voor a en b gevonden waarden grafisch worden uitgezet en door de zo gevonden punten de bestpassende lijn getrokken wordt, ontstaat de kromme van fig. 10. Met behulp van deze lijn kan een schatting verkregen worden voor de constanten van regressielijnen van andere dan de hier onderzochte sera op P_2. In fig. 11 zijn een aantal van dergelijke lijnen weergegeven. Deze grafiek is verkregen, door met behulp van de bijeenbehorende, uit fig. 10 af te leiden, constanten a en b volgens de hierboven gegeven regressieformule van een aantal rechten 2 punten te berekenen, nl. die voor $P_2 = 1{,}0$ en $P_2 = 3{,}0$ (tabel 39). Het is mogelijk daarmee uit de bij een bepaald experiment voor P_2 en andere sera gevonden neutralisatietiters te schatten welke uitkomsten waarschijnlijk voor de proefsera gevonden zouden zijn, wanneer voor het controleserum een andere dan de in werkelijkheid berekende titer zou zijn verkregen.

De titer van P_2 wordt eenvoudigheidshalve op 2,0 gesteld, d.i. ongeveer het gemiddelde van de voor dit serum gevonden titers. Andere uitkomsten worden tot deze waarde van het controleserum gecorrigeerd.

Voor een serum, dat b.v. een neutralisatietiter van 2,5 had in een experiment, waarin de titer van het controleserum P_2 3,0 bedroeg, wordt een schatting voor de herleide uitkomst verkregen door boven de waarde van 3,0 op de onderlijn van de grafiek het punt op te zoeken dat tegenover 2,5 op de verticale as ligt. De bij $P_2 = 2{,}0$ behorende titer van het proefserum wordt dan gevonden met behulp van de dichtstbijzijnde schuine lijn. De serumtiter wordt dus geschat op 1,9. Voor tussenliggende waarden kan geïnterpoleerd worden.

De ten gevolge van de correctie bereikte betrouwbaarheid is moeilijk te schatten. Zowel uit de grafiek als uit de op pag. 98 gegeven standaarddeviaties blijkt, dat de afwijkingen van de punten t.o.v. de berekende lijnen voor verschillende sera belangrijk uiteenlopen. Bij het serum met de hoogste titer is de strooiing belangrijk groter dan bij de andere onderzochte sera.

Een lijn voor de regressie van serum P_2 t.o.v. zichzelf zou in het diagram van fig. 11 niet geheel passen. Dit zou een gevolg kunnen zijn van de betrek-

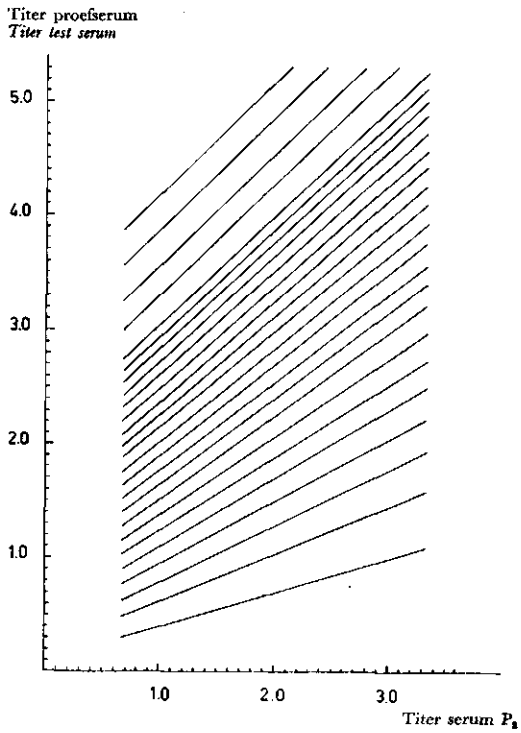


FIG. 11

Grafiek ter correctie van de voor verschillende sera gevonden titers, aan de hand van de voor controleserum P_2 in dezelfde proef verkregen uitkomst

FIG. 11

Graph for the correction of the titers of different sera in accordance with the end-point found for the control serum P_2 in the same test

kelijk grote onnauwkeurigheid, waarmee de lijnen waarop de figuur is gebaseerd, bepaald werden.

Gezien de betekenis van de virussuspensie voor het verloop van de neutralisatieproef is te verwachten, dat het gebruikte smetstoffiltraat de plaats en mogelijk ook de helling van de regressielijn van serum- op virustiter zal bepalen. Dit geldt zowel voor het controleserum als voor de andere onderzochte sera, zodat uitkomsten van proeven verricht met verschillende antigeensuspensies daardoor minder goed vergelijkbaar zullen zijn.

Serum P_2 werd in de loop van het onderzoek getitreerd met drie verschillende virusfiltraten. Hierbij werd telkens een gelijkvormig verband tussen virus- en serumtiter gevonden, maar de best passende rechte regressielijnen door de drie groepen punten vallen niet samen (fig. 3 en fig. 12). De strooiingen binnen de groepen zijn evenwel betrekkelijk groot ten opzichte van die tussen de groepen; de standaardafwijkingen van de hellingen bedragen b.v. bij waarden van 0,59; 0,75 en 0,73 resp. 0,063; 0,093 en 0,075, zodat deze verschillen niet significant zijn. Het lijkt daarom verantwoord, de grafiek die gebaseerd is op het voor virussuspensie 208 A vastgestelde verband tussen virus- en serumtiter, ook toe te passen ter correctie van resultaten verkregen met andere smetstofsuspensies. Er zal dan echter aandacht aan

geschonken moeten worden, dat het voor dergelijke proeven gebruikte virusfiltraat onder zoveel mogelijk identieke omstandigheden wordt geproduceerd. Met name het aanleggen, kweken en verwerken van de cultures zal zoveel mogelijk gestandaardiseerd moeten worden.

De in de virussuspensie aanwezige hoeveelheid niet-infectieus antigeen beïnvloedt de uitkomst van de neutralisatieproef. Wij zijn momenteel niet in staat deze fractie, welke vermoedelijk een veelvoud van de infectieuze smetstof uitmaakt, nauwkeurig kwantitatief te bepalen. Volgens de onderzoekingen van KRECH (1955) bestaat er bij poliomyelitisvirus een parallel tussen de waarde van een geïnactiveerde virussuspensie als entstof en de mate waarin dit antigeen in staat is de infectieuze smetstof vrij te maken uit nagenoeg "neutrale" virus-serummengsels. Herhaaldelijk is vastgesteld, dat zowel het complementbindend vermogen van een 20 uur geïncubeerde mond- en klauwzeerviruscultuur, als de infectiositeit een goede maat vormden voor de antigeniteit voor proefdieren. De verhouding tussen de hoeveelheid complementbindend antigeen en de virustiter schommelt bij met één stam aangelegde smetstofcultures betrekkelijk weinig, zodat de conclusie wel gewettigd lijkt, dat bij op gelijke wijze behandelde mond- en klauwzeercultures het gehalte aan immuunlichaambindende, doch niet meer infectieuze bestanddelen, betrekkelijk constant zal zijn.

In laatste instantie zal men, indien het er om gaat zo veel mogelijk ver-

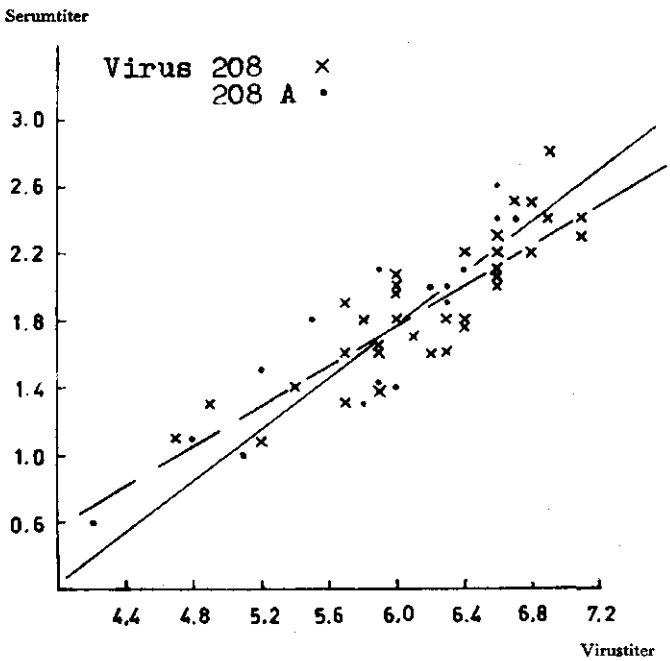


FIG. 12
Het verband tussen serum- en virustiter bij onderzoek van serum P_2 met verschillende smetstofsuspensies

Regressielijnen:
Regression lines:

208 :

$\hat{Y} = -1{,}77 + 0{,}594\ X$

208 A :

$\hat{Y} = -2{,}68 + 0{,}746\ X$

FIG. 12
The correlation between the titers of serum and virus found, when control serum P_2 was tested repeatedly against two different virus suspensions

gelijkbare resultaten te krijgen binnen het verband van een grotere proef, ervoor kunnen zorgdragen, dat de gehele reeks experimenten met een zelfde virusfiltraat wordt uitgevoerd.

Het is op de bovenbeschreven wijze dus mogelijk variaties in de proefuitkomsten, welke veroorzaakt worden door het gebruik van weefselsuspensies van uiteenlopende gevoeligheid, te corrigeren. De verbeterde uitkomst is echter slechts op te vatten als een schatting en er dient daarom op gewezen te worden, dat het aanbeveling zal verdienen, voor zover dat mogelijk is, de variabiliteit van de proefresultaten te beperken door weefsel van gevoelige dieren te gebruiken. Fig. 7 levert hiervan een duidelijk bewijs.

Bespreking

De beschreven werkwijze is geschikt voor routinegebruik, maar ze is belangrijk minder nauwkeurig dan de door DULBECCO en zijn medewerksters (1956) gebruikte *plaque-counting*-techniek. Onze resultaten zijn daarom niet geschikt voor een diepgaande analyse van de inactivering van het mond- en klauwzeervirus onder invloed van immuunlichamen.

Het onderzoek was evenwel in eerste instantie gericht op het verkrijgen van een voor praktische toepassing op ruime schaal geschikte methode voor de bepaling van mond- en klauwzeervirusneutraliserende antilichamen. Uit dien hoofde hebben wij ons slechts in zoverre met de meer theoretische aspecten van de betreffende problemen beziggehouden als noodzakelijk leek voor een beter inzicht in de met de gebruikte techniek samenhangende vraagstukken. De in de laatste tijd in het mechanisme van de virusneutralisatie verkregen inzichten bleken in belangrijke mate te kunnen bijdragen tot een betere interpretatie van sommige van onze proefuitkomsten.

Zo werd het waarschijnlijk, dat de invloed van het gehalte aan niet-infectieus virus op de serumtiter moest worden opgevat als het resultaat van concurrentie om de antilichaammoleculen tussen het geïnactiveerde antigeen en de infectieuze smetstof.

De invloed van het weefsel op de virustitratie is vermoedelijk toe te schrijven aan specifieke invloeden.

Hierop wijst o.a. het verband tussen entseizoen en proefuitslagen. Niet door het wassen verwijderde, mogelijk aan de cellen geadsorbeerde, immuunlichamen zouden de oorzaak van dit verschijnsel kunnen zijn. Het ligt verder voor de hand ook de invloed van het weefsel op de uitkomst van de neutralisatieproef aan specifieke factoren toe te schrijven. De voortdurend gevonden correlatie tussen virus- en serumtiter wijst in deze richting, terwijl ook het ontbreken van een dergelijk verband bij gebruik van tongepitheel van geïmporteerde runderen de hypothese steunt. Weliswaar zal ten gevolge van de normale onnauwkeurigheden, en wel vooral door proeffouten gemaakt bij de virustitratie, een strooiing, ongeveer gericht als die welke wij vonden,

verwacht kunnen worden, maar het vermoeden lijkt gewettigd, dat de afwijkingen hierbij veel kleiner zouden zijn dan de experimenteel aangetoonde. Dit blijkt o.a. uit de betrekkelijk geringe variatie welke gevonden werd tussen op verschillende dagen met een zelfde weefsel bepaalde serum- en virustiters.

De invloed van het tongepitheel op de serumtiter zou men zich mogelijk als volgt kunnen voorstellen.

In vitro produceert weefsel van immune dieren slechts voldoende antigeen, indien het geïnfecteerd wordt met een betrekkelijk grote hoeveelheid smetstof. Een dergelijk aantal infectieuze eenheden zal ook nodig zijn om de infectie van hetzelfde weefsel op gang te brengen, indien een neutralisatieproef wordt uitgevoerd. Volgens de *percentage law* van ANDREWES en ELFORD (1933) zou in een dergelijk geval de serumactiviteit, zoals deze door ons wordt uitgedrukt als log van het aantal geneutraliseerde ID_{50}, onveranderd moeten blijven.

In werkelijkheid wordt echter de resterende virusactiviteit bepaald door de verhouding tussen de aantallen antilichaammoleculen en viruseenheden. Wanneer de aanwezige hoeveelheid smetstof ten gevolge van verlaagde weefselgevoeligheid kleiner lijkt dan ze werkelijk is, verandert deze verhouding schijnbaar. Onder de gewijzigde omstandigheden zou men een grotere virusinactivering verwachten dan er in werkelijkheid in vitro optreedt. De in een dergelijke proef gevonden serumtiters zullen dus lager zijn dan die, welke gevonden zouden worden bij gebruik van normaal gevoelig weefsel en de schijnbaar aanwezige hoeveelheid smetstof.

Voor de invloed van de serumtiter op het verloop van de regressielijn van serum- op virustiter ontbreekt een bevredigende verklaring. De mogelijkheid lijkt aanwezig dat de richtingsverandering niet werkelijk de gehele lijn betreft, maar slechts het onderste gedeelte. Terwijl het bovenste deel parallel zou kunnen verlopen aan de voor meer actieve sera gevonden rechten, moet het onderste stuk, in het gebied waar de serumactiviteit tot nul nadert, ten slotte gaan samenvallen met de horizontale as. Deze hypothese vindt echter, mogelijk ten gevolge van de vrij grote afwijkingen welke optreden bij de individuele bepalingen, weinig steun in de experimentele resultaten. Zoals b.v. uit fig. 8 blijkt, is nl. reeds bij waarden van de serumtiter van ongeveer 1,5, die dus nog zeer duidelijk van het minimum verschillen, een richtingverandering waar te nemen.

In overeenstemming met de op voorgaande bladzijden ontwikkelde inzichten werd een titratiemethode opgebouwd, welke werd gebruikt voor het onderzoek van enkele met de vaccinatie tegen mond- en klauwzeer samenhangende vraagstukken. De daarbij toegepaste werkwijze werd in hoofdzaak reeds beschreven aan het begin van dit hoofdstuk.

De ontwikkelde techniek kan als volgt worden samengevat.

Met de snijmachine geoogst tongepitheel, bij voorkeur afkomstig van gevoelige runderen, wordt in de door FRENKEL (1955) beschreven kweekvloeistof met de schaar verkleind. Het weefsel wordt een tiental malen gewassen,

voordat er cultuurtjes mee worden aangelegd in de uithollingen van perspex tegels, die tevoren door behandeling met een HCl-oplossing en bestraling met ultraviolet licht zijn gesteriliseerd. Aan elk van de cultuurtjes, welke 10 tot 20 mg weefsel en 0,2 ml kweekmedium bevatten, wordt vervolgens 0,1 ml virusverdunning of serum-virusmengsel toegevoegd. Microbiële verontreinigingen worden onderdrukt met antibiotica, waartoe per ml medium worden gebruikt 1000 I.E. penicilline, 50 microgram streptomycine, 50 microgram aureomycine en 100 eenheden mycostatine. De kweekvloeistof wordt eveneens toegepast bij het maken van alle verdunningen.

De sera worden na inactivering in de verdunning 1/10 onderzocht tegenover verschillende virusverdunningen. Virus en serum-virusmengsels worden gedurende een uur op 25° C gehouden voordat ze in de tegels worden gebracht. De smetstof, een bij –30° C bewaard, 2½% runderalbumine-bevattend cultuurvirusfiltraat wordt, evenals een controle-immuunserum, in elke proef medegetitreerd. Per virusverdunning worden acht cultuurtjes gebruikt en er worden bij voorkeur vijf, met drievoudig interval gemaakte, smetstofverdunningen onderzocht.

De platen worden gesloten met een deksel, waarna ze in een schudmachine werden geplaatst in dichtgesmolten plastic zakjes. Ze worden drie dagen geïncubeerd bij 37° C .

De aflezing geschiedt met behulp van de complementbindingsreactie, welke in de cultuurtjes wordt uitgevoerd. Per cultuurtje wordt 0,1 ml verdund caviaserum en een zelfde volume 2½% caviacomplement toegevoegd. Nadat de tegels een half uur in een waterbad bij 37° C zijn geplaatst, wordt nog 0,1 ml haemolytisch systeem in de cultuurtjes gedruppeld. De proef wordt ongeveer 15 minuten nadat in de virustitratie een duidelijk patroon is ontstaan beëindigd. Alleen cultuurtjes waarin de haemolyse compleet is, worden dan als niet-geïnfecteerd aangemerkt.

De 50%-eindpunten worden berekend volgens Reed en Muench (1938), waarbij als serumtiter het verschil tussen het titratie-eindpunt van het virus alleen, en dat van het virus in aanwezigheid van het serum, wordt genomen. De berekening wordt gebaseerd op de werkelijk aan de cultures toegevoegde smetstofconcentraties.

De variabiliteit tussen in verschillende proeven verkregen uitkomsten wordt aan de hand van de grafiek van fig. 11 gecorrigeerd met behulp van de voor het controleserum gevonden titer, waarbij deze laatste waarde tot 2,0 herleid wordt.

Het volgend hoofdstuk geeft een beschrijving van enkele resultaten, welke met onze techniek werden verkregen bij het onderzoek van sera van gevaccineerde runderen van verschillende herkomst.

IV. ENKELE PRAKTISCHE TOEPASSINGEN VAN DE NEUTRALISATIEREACTIE

1. Inleiding

De kwaliteitscontrole van mond- en klauwzeervaccins geschiedt in de regel met behulp van gevoelige runderen. Hierbij wordt een aantal met de te onderzoeken entstof gevaccineerde dieren na enkele weken met homoloog virus geïnfecteerd. De toegepaste werkwijze loopt echter van instituut tot instituut uiteen. Behalve het per partij vaccin beschikbare aantal proefdieren en de wijze waarop de kunstmatige infectie wordt uitgevoerd, verschillen ook de gebruikte hoeveelheid smetstof en de interpretatie van de resultaten.

Een internationaal, onder auspiciën van het *Office International des Épizooties* te Bern bijeengekomen comité, formuleerde in 1946 eisen, waaraan de commercieel beschikbare vaccins zouden moeten voldoen. Deze details betreffen in hoofdzaak de samenstelling van de entstof o.a. het smetstofgehalte. Willems (1953) omschreef proeven, waaraan mond- en klauwzeervaccins zouden moeten worden onderworpen, alvorens te worden vrijgegeven voor gebruik. Deze suggesties zijn echter nog niet algemeen geaccepteerd.

Aan het routinegebruik van runderen kleven belangrijke nadelen, waaronder de hoge prijs en de noodzaak uitsluitend geheel gevoelige dieren te gebruiken, niet de minste zijn. Zolang evenwel geen andere methode gevonden is, welke resultaten geeft die vergelijkbaar zijn met die welke met runderen verkregen kunnen worden, zal vervanging van dit proefdier niet mogelijk zijn.

De kunstmatige infectie geeft slechts een voornamelijk kwalitatieve waardering van de resistentie van het onderzochte individu. Bij de controle van voor praktijkgebruik bestemde entstoffen wordt in de meeste gevallen verlangd, dat alle met het onderzochte vaccin behandelde dieren na 2 of 3 weken resistent zijn, althans tegen generalisatie. In dit geval is slechts het bewijs geleverd, dat de betrokken entstof in staat is met een zekere regelmaat in enkele weken tijd bij runderen een zekere minimumimmuniteit op te wekken. De praktische waarde van deze eis varieert met het aantal gebruikte proefdieren en mogelijk ook met de wijze van infecteren, terwijl aangaande de verkregen graad van resistentie slechts een gedeeltelijke conclusie te trekken is en over de duur van de immuniteit in het geheel niets gezegd kan worden.

Vergelijking van verschillende entstoffen is bij gebruik van de infectiemethode alleen mogelijk, wanneer een of beide vaccins slechts een deel van de proefdieren beschermt of indien verschillende doses in het onderzoek kunnen worden betrokken. Dit laatste is slechts bij uitzondering het geval. Bij experimenten met een dergelijke proefopstelling wordt van tijd tot tijd waargenomen, dat een kleine entstofdosis een groter percentage van de proefdieren beschermt dan een grotere hoeveelheid.

Een dergelijke onregelmatige uitkomst, welke altijd kan optreden bij ge-

bruik van kleine aantallen proefdieren, wijst op een uiteenlopende gevoeligheid van de gebruikte runderen. Deze factor kan reeds een rol spelen bij proeven met speciaal gefokte kleine proefdieren, maar treedt ongetwijfeld in nog grotere mate op, wanneer gebruik gemaakt wordt van grote proefdieren, waarbij de uniformiteit zelden zo groot zal zijn als bij ver doorgefokte muizen- of caviastammen.

Bij de op de gebruikelijke wijze uitgevoerde controle van vaccins kan deze variabiliteit van het proefdiermateriaal van belang zijn. Het vaststellen van individuële verschillen in reactie op de entstof en ook van het verloop der resistentie bij bepaalde individuen als functie van de tijd, is evenwel niet mogelijk, zolang van een proefinfectie gebruik moet worden gemaakt. Het was speciaal met het doel een beter inzicht in de hierboven omschreven problemen te krijgen, dat de in de vorige paragrafen beschreven methodiek werd ontwikkeld. Met behulp hiervan werd bestudeerd, (1) hoe verschillende dieren reageerden op één of meer entingen, (2) in hoeverre hierbij aan de leeftijd een bepaalde betekenis moest worden toegekend en (3) welke praktische consequenties voor de in ons land toegepaste bestrijdingsmethode uit de aldus verkregen gegevens getrokken kunnen worden. Ten slotte werd onderzocht (4) in hoeverre er een correlatie bestond tussen het gehalte van het bloedserum aan mond- en klauwzeervirusneutraliserende antistoffen en de weerstand van de betreffende dieren tegen kunstmatige infectie.

2. Het verloop van de serumtiter bij gevaccineerde volwassen runderen

De serologische reactie op de enting werd onderzocht bij enkele groepen volwassen dieren welke één of meer malen gevaccineerd waren.

Proef 1. Het titerverloop na injectie van verschillende doses vaccin en na revaccinatie

Voor een eerste experiment waren acht geïmporteerde Ierse ossen van ouder dan 2½ jaar beschikbaar. Vier van deze dieren werden subcutaan gevaccineerd met 15 ml van een negen maanden tevoren geproduceerd monovalent O-vaccin, de andere vier ontvingen 60 ml van dezelfde entstof.

Het vaccin was van het in Nederland gebruikelijke type en bevatte per ml ongeveer 8.10^5 ID_{50} van het volgens Henderson (1952) in runderen getitreerde virus.

De smetstof was volgens Frenkel's methode in geëxplanteerd rundertongepitheel gekweekt en na adsorptie aan aluminiumhydroxyde door behandeling met verdunde formaline gedurende 24 uur bij 25° C en pH 9,0, geïnactiveerd. De entstof was bij het routine-onderzoek in gevoelige runderen onschadelijk gebleken.

Na ruim achttien weken werden nog vier Ierse ossen aan de groep toege-

voegd, waarna aan alle twaalf runderen nogmaals 15 ml vaccin van dezelfde partij subcutaan werd toegediend.

Van alle dieren werd voor de eerste vaccininjectie een serummonster verkregen. Dit werd vervolgens aanvankelijk wekelijks, later om de twee weken en ten slotte, na de revaccinatie, met langere interval herhaald. De sera werden na inactivering in de verdunning 1/10 onderzocht ten opzichte van verschillende smetstofsuspensies, welke ten hoogste enkele dagen in de

FIG. 13

Het verloop van de serumtiter bij volwassen runderen gevaccineerd met 60 ml 0-vaccin

Vaccinatie — *injection of vaccine*

FIG. 13

The development of neutralizing antibodies in adult cattle vaccinated with 60 mls of an 0-vaccine

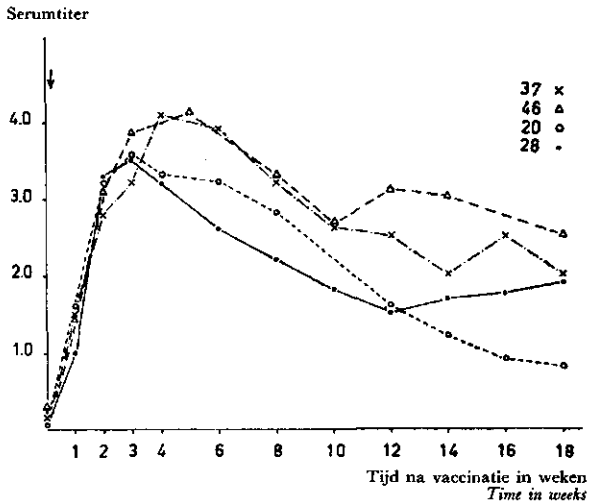


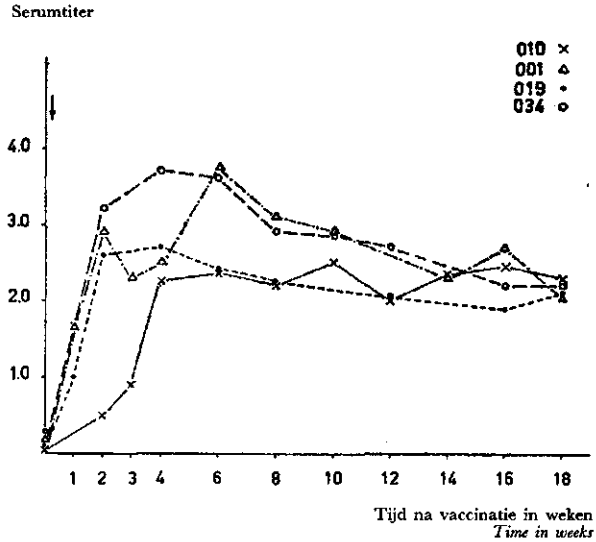
FIG. 14

Het verloop van de serumtiter bij volwassen runderen gevaccineerd met 15 ml 0-vaccin

Vaccinatie — *injection of vaccine*

FIG. 14

The development of neutralizing antibodies in adult cattle vaccinated with 15 mls of an 0-vaccine



ijskast waren bewaard. In alle titraties werd een controleserum mede onderzocht en de proefuitkomsten werden met behulp hiervan gecorrigeerd. 33 weken na het begin van de proef moest een van de runderen van de 60 ml groep, tezamen met een van de later toegevoegde dieren uit het experiment genomen worden. Beide werden daarop kunstmatig besmet door de mondholte in te wrijven met een vers bereide 2% suspensie van een O-virus bevattende runderblaarwand. Van deze dieren werd tweemaal per dag de temperatuur opgenomen; ze werden een week na de infectie geseceerd. Het tweemaal geënte rund bleek toen uitgebreide laesies aan tong en verhemelte te hebben, terwijl het slechts éénmaal gevaccineerde dier alleen een circumscript defect op de tongrug had. Afwijkingen in de pens en aan de klauwen ontbraken.

De tien resterende dieren werden zeven weken later, d.i. dus 40 weken na de aanvang van de proef, op overeenkomstige wijze als de beide eerste besmet. Bij de sectie, welke wederom een week na de infectie plaats vond, vertoonde geen van de twee maal geënte dieren afwijkingen. Twee van de drie slechts eenmaal gevaccineerde runderen hadden defecten aan de tong, het palatum en de vier extremiteiten, het derde dier van deze groep vertoonde geen afwijkingen. De fig. 13 tot en met 16 geven een overzicht van de uitkomsten van de serumtitraties.

FIG. 15 Het verloop van de serumtiter bij volwassen runderen na vaccinatie (108, 127) of revaccinatie (001, 010, 019 en 034) met 15 ml 0-vaccin

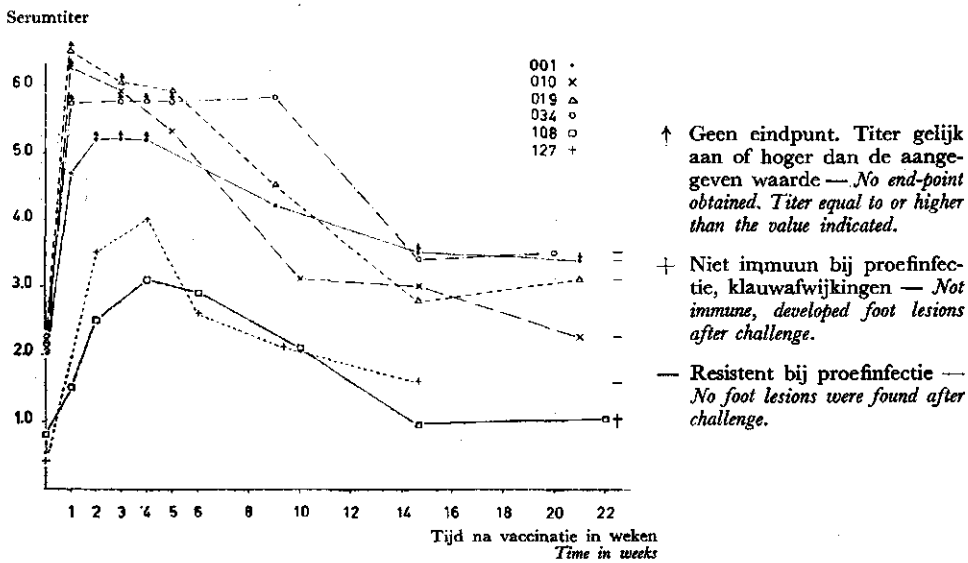


FIG. 15 *The development of the neutralizing antibodies in adult cattle after vaccination (108, 127) or revaccination (001, 010, 019 and 034) with 15 mls of an 0-vaccine*

Een week na de injectie van de 60 ml dosis van het vaccin waren bij alle vier dieren antistoffen in de sera aantoonbaar. De maximale waarden, welke varieerden van ongeveer 3,5 tot 4,2, werden na 3 tot 5 weken gevonden. Daarna trad in de regel een geleidelijke titerdaling op, welke bij verschillende individuën niet even snel verliep. 18 weken na toediening van de entstof werden waarden van 0,8 tot 2,5 aangetroffen.

Bij de dieren welke geïnjicieerd waren met 15 ml vaccin, werden de hoogste titers, welke bij deze groep tussen 2,4 en 3,8 lagen, na 3 tot 6 weken vastgesteld. Bij deze runderen waren in drie van de vier gevallen na één week antistoffen aantoonbaar. Het vierde dier had echter eerst na drie weken een significante titer. Later werden bij dit rund waarden gevonden welke overeenkwamen met die van de rest van de groep. Een van de met 15 ml vaccin behandelde dieren vertoonde een maximale titer na twee weken, daarna trad een geringe titerdaling op, welke werd gevolgd door een nieuwe hogere top zes weken na het begin van de proef. Na zes weken begon bij alle runderen een titerdaling, na achttien weken werden waarden van 2,0 tot 2,5 vastgesteld.

De tweede groep van vier dieren, welke ca. 4½ maand na de eerste werd ingespoten met 15 ml van dezelfde entstof, vertoonde een overeenkomstig reactiepatroon. De na vier tot zes weken bereikte maximale waarden varieerden van 2,5 tot 4,0. Daarna trad ook hier een titerdaling op, welke wat

FIG. 16 Het verloop van de serumtiter bij volwassen runderen na vaccinatie (128, 134) of revaccinatie (020, 028, 037 en 046) met 15 ml 0-vaccin

† Geen eindpunt. Titer gelijk aan of hoger dan de aangegeven waarde — *No end-point obtained. Titer equal to or higher than the value indicated.*

\+ Niet immuun bij proefinfectie, klauwafwijkingen — *Not immune, developed foot lesions after challenge.*

— Resistent bij proefinfectie — *No foot lesions were found after challenge.*

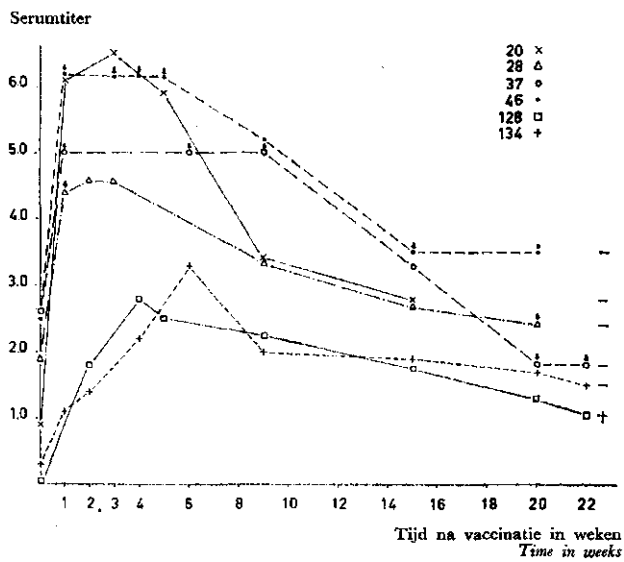


FIG. 16 *The development of the neutralizing antibodies in adult cattle after vaccination (128, 134) or revaccination (020, 028, 037 and 046) with 15 mls of an 0-vaccine*

sneller verliep dan die waargenomen bij de eerst gevaccineerde groep.

Het gedrag van de gerevaccineerde dieren was geheel anders dan dat van de slechts eenmaal geënte runderen. In dit geval trad nl. een typische secundaire reactie op, waarbij de antilichamen sneller in het bloed verschenen, een hogere waarde bereikten en langer persisteerden dan na de eerste vaccininjectie.

In alle gevallen werd reeds in het eerste serummonster, dat een week na de nieuwe injectie afgenomen werd, een belangrijk verhoogde antistoftiter gevonden. De waarden varieerden van 5,0 tot 6,5, maar in vele gevallen was de activiteit van de 1/10 verdunde sera zo groot, dat het virus ook in de hoogste onderzochte concentratie geheel geïnactiveerd werd, zodat het niet mogelijk was een eindpunt te berekenen. Het neutraliserend vermogen van de sera van deze tweemaal geënte dieren lag dus aanzienlijk boven dat van die, welke slechts één dosis vaccin hadden ontvangen. Dit verschil bleef gedurende het gehele verloop van de proef bestaan, zodat bij het einde van het experiment nog titers van 2,0 en hoger werden gevonden. De beide runderen welke bij de proefinfectie reageerden met generalisatie, waren slechts éénmaal gevaccineerd.

Indien men het gemiddelde van de maximumwaarden, gevonden in de groep welke 60 ml vaccin ontving, vergelijkt met dat van de gelijktijdig geënte andere dieren, blijkt dat een viervoudige dosis entstof resulteerde in een ongeveer drie maal zo groot virusinactiverend vermogen van de antilichamen. De later toegevoegde runderen worden bij deze vergelijking buiten beschouwing gelaten, daar er enige twijfel zou kunnen bestaan aangaande de vergelijkbaarheid van beide groepen. Het in dit geval gebruikte vaccin was nl. een aantal maanden langer bewaard. Onze uitkomst steekt gunstig af bij de door andere auteurs bij dit soort proeven verkregen resultaten; (Mc Lean en zijn medewerkers, 1945 Edsall, 1953), welke in de regel een belangrijk geringer effect van het gebruik van grotere antigeenhoeveelheden laten zien.

Volgens Stevens (1956), wiens werk aansluit bij een eerder door Smith en St. John Brooks gepubliceerde studie, bepalen chemische samenstelling, dosis en samengesteldheid van het antigeen het verband tussen antigeenconcentratie en maximaal bereikte antistoftiter. Indien beide grootheden logaritmisch worden uitgezet zou een lineair verband blijken. De helling van de rechte werd voor eenvoudige eiwitten op ongeveer 0,5 geschat, maar nadert tot 1,0 wanneer zeer kleine hoeveelheden worden gebruikt. In ons geval werd een waarde van ca. 0,8 gevonden. Hierbij dient niet uit het oog verloren te worden, dat onze gemiddelden berekend werden uit kleine aantallen proefdieren en dat er een belangrijke individuele variatie tussen verschillende runderen bestond, welke zich o.a. ook manifesteerde in het verdere verloop van de curven. Deze spreiding trad vooral op de voorgrond bij de dieren welke 60 ml entstof ontvingen.

Proef 2. De invloed van de hoeveelheid aluminiumhydroxyde

In een tweede proef met volwassen runderen werden 24 geïmporteerde gevoelige dieren van twee jaar of ouder gebruikt. Hiervan werden er twaalf geënt met 15 ml van een ongeveer 2½ maand tevoren geproduceerd monovalent O-vaccin van de gebruikelijke samenstelling. De andere twaalf dieren werden gevaccineerd met een gewijzigde entstof, bereid van dezelfde virussuspensie. Dit tweede vaccin bevatte, evenals het eerste, ongeveer 12.10^6 runder-ID_{50} per dosis, echter in een volume van 5 ml. Deze reductie in volume was bereikt door vermindering van het aluminiumhydroxydegehalte tot 1/3 van het gebruikelijke. Beide vaccins bleken in het routine-onderzoek in gevoelige runderen niet infectieus.

FIG. 17

Het titerverloop bij een twaalftal volwassen runderen gevaccineerd met 5 ml van een drie maal geconcentreerd type 0-vaccin

\+ Generaliseerde na besmetting *generalized after infection.*

— Resistent — *no foot lesions developed after infection.*

FIG. 17

The development of neutralizing antibodies in adult cattle vaccinated with 5 mls of a three times concentrated type 0-vaccine

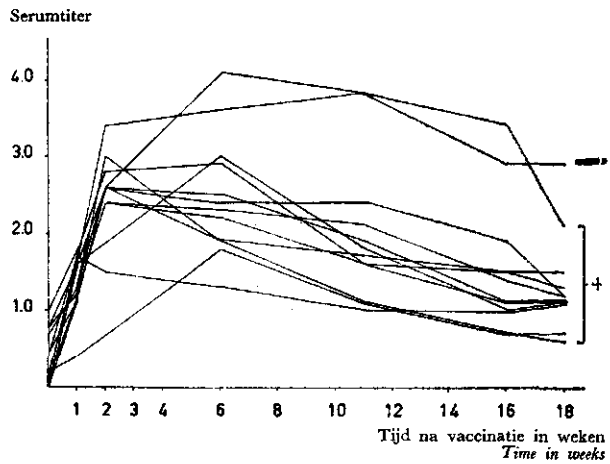


FIG. 18

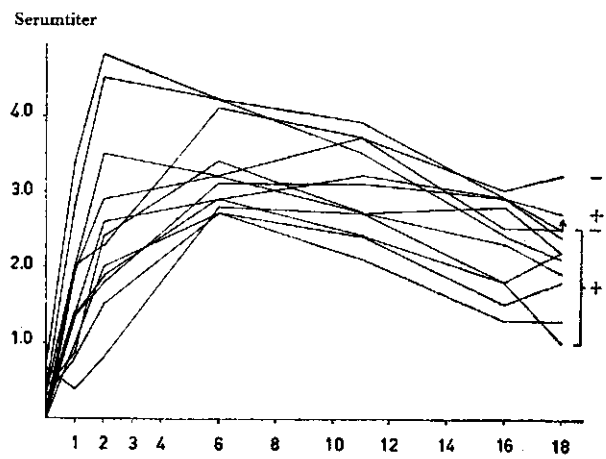
Het titerverloop bij een twaalftal volwassen runderen gevaccineerd met 15 ml 0-vaccin

\+ Generaliseerde na besmetting *generalized after infection.*

— Resistent — *no foot lesions developed after infection.*

FIG. 18

The development of the neutralizing antibodies in adult cattle vaccinated with 15 mls of an 0-vaccine



Voor het begin van de proef werden van alle dieren serummonsters verkregen en dit werd 1, 2, 6, 11, 16 en 18 weken na de vaccinatie herhaald. De sera werden op de gebruikelijke wijze na inactivering onderzocht in de verdunning 1/10, tegenover een bij −30° C bewaarde virussuspensie. Fig. 17 en 18 geven een overzicht van het verloop van deze proeven.

Bij bijna alle dieren waren een week na de enting kleine hoeveelheden antistoffen aantoonbaar. De hoogste waarden werden na 3 tot 6 weken gevonden, daarna trad een titerdaling op.

Twee weken na vaccinatie liepen de gemiddelde titers van de twee groepen slechts weinig uiteen; de strooiing in de met het geconcentreerde vaccin geënte groep was echter geringer dan die van de controles.

Zes weken post vaccinationem bleek de normale entstof echter duidelijk beter en deze verhouding bleef ongewijzigd tot het experiment na 10 weken beëindigd werd. Bij de met 5 ml entstof gevaccineerde dieren varieerden de titers toen van 0,6 tot 2,9 met een gemiddelde van 1,32. Bij de met het normale vaccin geënte dieren lagen de waarden tussen 1,0 en 3,4, het gemiddelde bedroeg hier 2,15.

Aan het eind van de observatietijd werden alle dieren, tezamen met enkele niet-gevaccineerde controlerunderen, geïnfecteerd door injectie van 0,2 ml van een vers bereide 0,5 % suspensie van een type O-virus bevattende runderblaarwand in het tongepitheel.

Bij deze besmetting bleken slechts twee dieren uit de met het normale vaccin behandelde groep resistent tegenover één uit de met de geconcentreerde entstof behandelde. De resistente dieren hadden serumtiters van resp. 3,0, 3,5 en tenminste 2,6. Alle andere runderen vertoonden bij de sectie, welke een week na de infectie werd verricht, klauwafwijkingen.

Uit het serologisch onderzoek blijkt, dat het geconcentreerde vaccin minder effectief was dan de controle-entstof. De resultaten van de infectieproef wijzen minder duidelijk in deze richting. Opvallend is, dat antistofconcentraties, welke in staat waren de in de hiervoor besproken proef I gebruikte runderen te beschermen tegen generalisatie, hier geheel onvoldoende bleken. Hierop zal nog nader worden teruggekomen.

Wat betreft het effect van de concentratie aluminiumhydroxyde op de vaccinwerking, is onze conclusie in tegenspraak met die welke Fogedby en zijn medewerkers (1952) in een overeenkomstig experiment bereikten. Onze proefopstelling is vergelijkbaar met de door deze auteurs in hun eerste experiment gebruikte. Hun tabel no. 1 geeft een overzicht van de resultaten van een infectieproef waaruit blijkt, dat er een belangrijke individuele variatie tussen de gebruikte runderen bestond. Indien men de tijd berekent gedurende welke 50% van de in elke groep gebruikte runderen beschermd zouden zijn geweest, wordt echter toch de indruk gewekt, dat de resultaten na enting met de grootste onderzochte dosis van 15 ml wat beter waren dan die verkregen met kleinere hoeveelheden.

3. De vaccinatie van jonge runderen

Wat betreft het vermogen om te reageren op antigeenprikkels, kunnen jonge individuen in het algemeen niet op een lijn gesteld worden met volwassen soortgenoten. Waarnemingen, die in deze richting wezen, werden reeds in 1908 door Moll gepubliceerd. Freund (1930) en andere auteurs, waaronder Kerr (1956) hebben deze observaties belangrijk aangevuld. Zo is de vaccinatie tegen de Teschener ziekte bij jonge varkens minder effectief dan bij oudere dieren en de bestrijding van deze aandoening wordt daardoor bemoeilijkt (Kodrnja, 1952; Hecke, 1955).

In de literatuur zijn echter meerdere gevallen vermeld, waarbij immunisatie op jeugdige leeftijd, o.a. met levende entstof, wel een reactie opwekte. Dit is o.a. het geval bij de vaccinatie van zuigelingen tegen pokken en Brown (1956) kon door injectie van aan konijnen geadapteerd runderpestvirus bij zeer jonge kalveren immuunlichamen opwekken.

Behalve ten gevolge van met de ontwikkeling samenhangende factoren, kan de reactie van het jonge dier op een toegediend vaccin ook beïnvloed worden door in de circulatie aanwezige passief verworven antistoffen. In de regel zullen deze immuunlichamen ante partum intra-uterien of in de eerste levensdagen met het colostrum zijn opgenomen. Bij verschillende van de boven geciteerde onderzoekingen worden de invloeden, uitgeoefend door leeftijd en moederlijke antistoffen, niet naar oorzaak gescheiden.

Met betrekking tot de betekenis van de hierboven vermelde factoren voor de mond- en klauwzeervaccinatie, zijn de beschikbare gegevens zeer beperkt. Schmidt en Holm (1949) rapporteerden, dat de resultaten van de enting bij kalveren minder regelmatig waren dan die verkregen bij volwassen runderen. Willems en Leunen (1955) stelden vast, dat kalveren minder lang beschermd werden dan runderen van twee jaar of ouder. Geen van deze onderzoekers vermeldt een anamnese van de in de proeven gebruikte dieren, zodat men geen inzicht verkrijgt in het mechanisme dat aan hun resultaten ten grondslag zou kunnen liggen.

Ook verschillende in ons land in de praktijk gedane waarnemingen pleiten ervoor dat het jongvee een zwak punt vormt in ons systeem van afweermaatregelen tegen het mond- en klauwzeer, hoewel de betekenis van deze lacune ongetwijfeld is afgenomen ten gevolge van de in de laatste jaren toegepaste extra-entingen van de jongere dieren.

Teneinde de aard en de omvang van het hier geformuleerde vraagstuk nader te onderzoeken, werd een aantal experimenten uitgevoerd[3].

---

[3] Dit onderzoek werd gedeeltelijk uitgevoerd met een subsidie van de *Agricultural Research Service* van het *U.S. Department of Agriculture* te Washington, D.C., U.S.A.

Proef 3. De vaccinatie van Nederlandse kalveren van verschillende leeftijden

Een eerste proef had betrekking op een twintigtal uit gevaccineerde runderen geboren, niet-geënte kalveren, welke waren verdeeld over drie leeftijdsgroepen van ongeveer 8 tot 11, 13 tot 15 en 17 tot 22 weken.

Nadere gegevens aangaande de leeftijd van de dieren, welke uit Oost-Gelderland en Overijssel afkomstig waren, alsmede details van de proefopstelling blijken uit tabel 40.

Alle dieren werden gedurende de proef in quarantaine gehouden. Ze werden gevoed met een dieet bestaande uit volle melk afkomstig van Nederlandse koeien, aangevuld met hooi en meel. Van de 20 dieren werden er bij ontvangst 15 gevaccineerd met 30 ml van een gemengde entstof bestaande uit gelijke hoeveelheden O-, A- en C-vaccin, 5 dieren werden niet geënt.

TABEL 40. Gegevens betreffende de in proef 3 gebruikte Nederlandse kalveren

Nummer van het kalf	Leeftijd bij het begin van de proef	Geboortedatum	Enting	Datum proefinfectie	Datum laatste enting moeder
425	58 dagen — *days*	6. 3.56	2 [1]	9.11.56	9.3.55
426	61 „ „	3. 3.56	1	9.11.56	13.4.55
427	61 „ „	3. 3.56	1	9.11.56	13.4.55
428	58 „ „	6. 3.56	1	9.11.56	10.2.55
429	65 „ „	28. 2.56	1	9.11.56	10.3.55
430	76 „ „	17. 2.56	2	9.11.56	10.3.55
431	77 „ „	16. 2.56	1	9.11.56	25.3.55
432	92 „ „	1. 2.56	1	9.11.56	17.3.55
433	93 „ „	31. 1.56	1	9.11.56	14.3.55
434	92 „ „	1. 2.56	1	9.11.56	18.3.55
435	93 „ „	31. 1.56	1	9.11.56	12.4.55
436	88 „ „	5. 2.56	1	9.11.56	12.4.55
437	102 „ „	22. 1.56	2	9.11.56	4.4.55
438	97 „ „	27. 1.56	2	9.11.56	10.2.55
439	121 „ „	3. 1.56	3	12—18. 7.56	5.3.55
440	132 „ „	23.12.55	3	12—18. 7.56	13.4.55
441	150 „ „	5.12.55	3	12—18. 7.56	7.3.55
442	117 „ „	7. 1.56	2	12—18. 7.56	4.4.55
443	129 „ „	26.12.55	3	12—18. 7.56	21.2.55
444	152 „ „	3.12.55	3	12—18. 7.56	17.3.55
Number of calf	*Age at beginning of experiment*	*Date of birth*	*Vaccination*	*Date of experimental infection*	*Date of last vaccination of mother*

[1] Eerste vaccinatie op 3.5.56, revaccinatie ongeveer tien weken later — *First vaccine injection on May 3, 1956. Revaccination carried out about ten weeks later.*
[2] Niet-gevaccineerde controle — *Unvaccinated control.*
[3] Eén maal geënt op 3.5.56 — *Vaccinated only once i.e. on May 3, 1956.*

TABLE 40. *Data concerning the Dutch calves used in experiment no. 3*

FIG. 19

Het verloop van de serumtiter bij op een leeftijd van 8 tot 11 weken gevaccineerde Nederlandse kalveren

↓ Vaccinatie — *vaccination.*

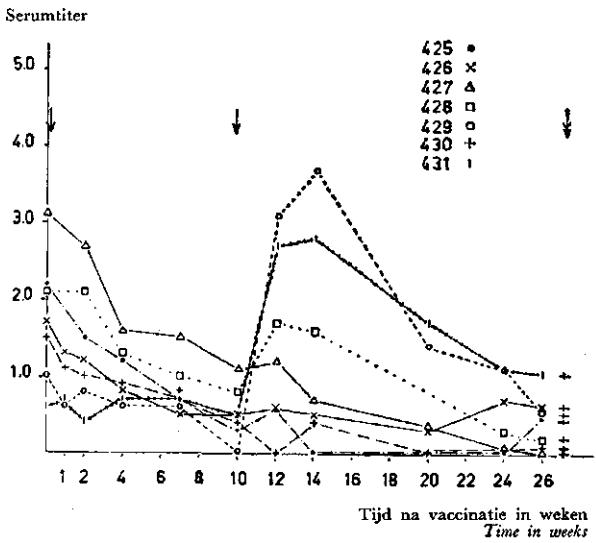
↓↓ Kunstmatige infectie — *exposure to infection.*

\+ Generalisatie na besmetting — *generalized after challenge.*

— Resistent na besmetting — *No foot lesions developed after challenge.*

FIG. 19

The development of neutralizing antibodies in Dutch calves, that were first vaccinated at an age of 8 to 11 weeks



Elk van de gebruikte vaccins was op zijn beurt samengesteld uit vier verschillende partijen van het betreffende type en deze waren alle tevoren in groepen volwassen runderen onderzocht op onschadelijkheid en antigeenvermogen.

Van alle kalveren werden bij het begin van de proef en vervolgens met enkele weken tussenruimte, serummonsters genomen. Deze werden na verwarming gedurende een half uur bij 56° C in de verdunning 1/10 onderzocht tegenover meerdere verdunningen van een bij lage temperatuur bewaarde virussuspensie van het O-type. Er werd gebruik gemaakt van een controle-immuunserum en de proefuitkomsten werden op de gebruikelijke wijze gecorrigeerd.

Behalve de vier ongeënte controles werden alle dieren van de beide jongste groepen ongeveer tien weken na het begin van de proef gerevaccineerd met een hoeveelheid vaccin gelijk aan de oorspronkelijk gebruikte dosis. De zes oudste dieren werden te zelfder tijd kunstmatig besmet met een vers bereide 2% suspensie van O-virus, waarmede de mondholte werd ingewreven. Hoewel gelijktijdig op overeenkomstige wijze besmette volwassen Ierse controlerunderen, welke werden gebruikt omdat geen kalveren beschikbaar waren, enkele dagen later ziek werden en de infectie bij deze dieren ook generaliseerde, werd slechts een van de zes kalveren aangetast. De overige vijf dieren werden daarom zes dagen na de eerste infectie nogmaals besmet, thans door intradermale injectie van 0,3 ml van een smetstofsuspensie in de tong.

Alle veertien resterende kalveren werden ongeveer 27 weken na het begin van de proef geïnfecteerd door intradermolinguale injectie van 0,3 ml van een 1% O-virussuspensie.

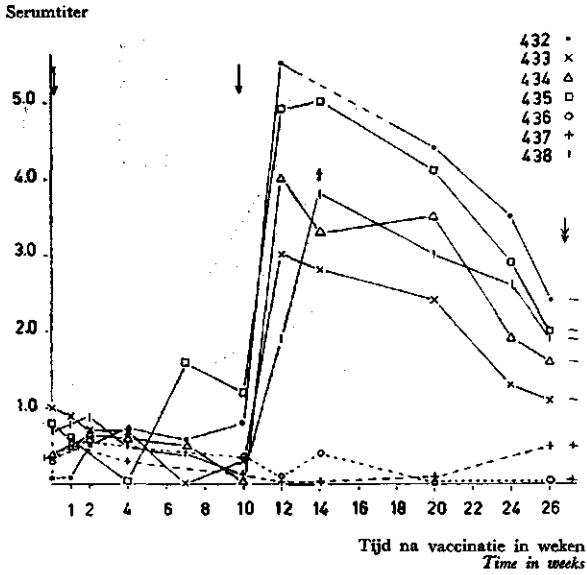


FIG. 20

Het verloop van de serumtiter bij op een leeftijd van 12 tot 15 weken gevaccineerde Nederlandse kalveren

↓ Vaccinatie — *vaccination.*

↓ Kunstmatige infectie — *exposure to infection.*

\+ Generalisatie na besmetting — *generalized after challenge.*

— Resistent na besmetting — *No foot lesions developed after challenge.*

↑ Geen titratie-eindpunt gevonden — *No end-point obtained.*

FIG. 20

The development of neutralizing antibodies in Dutch calves, that were first vaccinated at an age of 12 to 15 weeks

Fig. 19 tot en met 21 geven een overzicht van het verloop van de neutralisatietiters bij de verschillende dieren, alsmede van het resultaat van de proefinfectie.

Zes van de zeven kalveren van de jongste groep bleken bij het begin van de proef, nog vóór injectie van de entstof, reeds over virusneutraliserende antistoffen te beschikken. Bij geen van de zeven dieren werd de vaccinatie gevolgd door een titerstijging, integendeel, bij de later verzamelde serummonsters werd een voortdurende daling van de serumtiter vastgesteld. Ook de revaccinatie, welke ongeveer 10 weken na het begin van de proef plaatsvond, gaf bij twee van de vijf dieren geen aanleiding tot vermeerdering van het antilichaamgehalte van het serum. Eén kalf vertoonde een geringe titerstijging en bij de twee overblijvende dieren volgde een matig grote reactie. De hoogste waarden, welke 3,7 en 2,8 bedroegen, werden na ongeveer vier weken vastgesteld. Daarna trad een daling op en geen van de kalveren van deze groep had bij het eind van de proef een serumtiter van meer dan 1,0. Alle reageerden op de infectie met een gegeneraliseerde vorm van mond- en klauwzeer.

De kalveren van de tweede groep, welke bij het begin van het experiment een leeftijd van 13 tot 15 weken hadden, bleken ten tijde van de eerste enting slechts sporen neutraliserende antistoffen in het bloed te hebben. Ook in dit geval bleef een serologisch waarneembare reactie op de entstof in de meeste gevallen echter uit, daar slechts één van de dieren zeven weken na de injectie een geringe titerstijging vertoonde. Deze verhoging van het antistofgehalte was slechts van tijdelijke aard. Alle leden van deze groep bleken wel op de tweede injectie te kunnen reageren en de maximumwaarden, die na twee

tot vier weken werden gevonden, lagen belangrijk hoger dan die, welke bij de jongere dieren waren vastgesteld. De titerdaling verliep ongeveer even snel als in de vorige groep. Aan het eind van de proef werden bij de geënte dieren waarden variërend tussen 1,0 en 3,0 aangetroffen. Alle bleken resistent tegen generalisatie. De beide niet-gevaccineerde controles vertoonden daarentegen bij de sectie afwijkingen aan alle vier voeten.

De in de derde groep gebruikte kalveren varieerden in leeftijd van 117 tot 152 dagen. Geen van deze dieren had bij het begin van de proef duidelijk aantoonbare antistoffen in de circulatie, slechts twee ervan toonden echter een goede reactie op het vaccin. Eén dier bereikte na vier weken een maximale waarde van ongeveer 3,0, welke bleef bestaan tot het eind van de proef. Het tweede kalf vertoonde na injectie van het vaccin een voortdurende stijging van de serumtiter en bereikte bij het einde van het experiment een maximale waarde van 3,4.

Twee van de overblijvende dieren kwamen slechts tot titers van 1,3 en 1,5, welke na vier weken werden gevonden, het derde kalf reageerde in het geheel niet op de enting. Het overblijvende ongevaccineerde dier had aan het begin van het experiment een titer van 0,7, welke in de loop van tien weken tot 0 daalde.

De eerste infectiepoging had bij vijf van de zes dieren van deze groep geen succes. Slechts bij een van de gevaccineerde dieren ontwikkelde zich een kleine blaar op de tong, bij geen van de overige sloeg de infectie aan, hoewel enkele gelijktijdig met dezelfde virussuspensie besmette volwassen

FIG. 21

Het verloop van de serumtiter bij op een leeftijd van 17 tot 22 weken gevaccineerde Nederlandse kalveren

↓ Vaccinatie — *vaccination.*

↓↓ Kunstmatige infectie — *exposure to infection.*

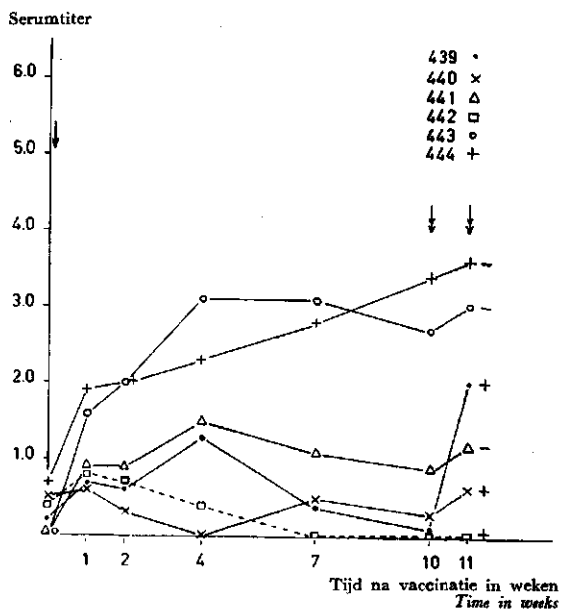
\+ Generalisatie na besmetting — *generalized after challenge.*

— Resistent na besmetting — *No foot lesions developed after challenge.*

↑ Geen titratie-eindpunt gevonden — *No end-point obtained.*

FIG. 21

The development of neutralizing antibodies in Dutch calves, that were first vaccinated at an age of 17 to 22 weeks



controledieren ernstig ziek werden en bij de na een week uitgevoerde sectie uitgebreide afwijkingen aan de klauwen vertoonden.

De vijf resterende kalveren werden daarom zes dagen later intradermaal in de tong geïnjicieerd met 0,3 ml van een één-procentige vers bereide suspensie van infectieus rundertongepitheel.

Bij de sectie bleek het ongeënte dier uitgebreide mond- en klauwzeerveranderingen aan tong, verhemelte en alle vier extremiteiten te hebben.

Bij de beide dieren welke na de enting een duidelijke serologische reactie hadden vertoond, beperkten de afwijkingen zich tot de tong; bij de beide anderen was ook een van de vier klauwen in geringe mate aangetast.

Een onderzoek van de serummonsters verkregen kort voor de eerste besmetting en zes dagen daarna, wees uit, dat slechts een van de kalveren op de eerste infectie gereageerd had met een belangrijke titerstijging, welke echter niet voldoende bleek om het dier tegen generalisatie te beschermen. Bij het na de slachting ingestelde onderzoek werd nl. een klein defect in de tussenklauwspleet van een van de achterpoten aangetroffen. Dit dier had in tegenstelling tot enkele van de andere geen temperatuurverhoging vertoond na de besmetting.

Aanwijzingen ontbreken voor de veronderstelling dat de antistoffen, welke vooral bij de acht tot elf weken oude dieren reeds voor de vaccinatie in de sera werden aangetroffen, afkomstig zouden zijn van infectie met mond- en klauwzeer. Hiertegen pleit o.a. dat in 1955 en het begin van 1956 geen gevallen van mond- en klauwzeer, veroorzaakt door virus van het O-type, werden vastgesteld in het gebied waaruit de dieren afkomstig waren.

In één geval leverde hetzelfde bedrijf zowel een dier van de jongste groep, als een dat enkele maanden ouder was. Het eerstgenoemde had bij aankomst reeds een sterk positieve serumtiter, bij het tweede werden geen antistoffen gevonden, hoewel toch bij dit oudere kalf de kans op infectie, indien aanwezig, ten minste even groot zou zijn geweest als voor het jongere dier.

Het lijkt daarom zeer waarschijnlijk dat de antistoffen, welke bij het ongeënte jongvee werden aangetroffen, afkomstig waren van de moederdieren. Hiervoor pleit o.a. ook, dat de immuunlichamen uitsluitend in sera afkomstig van de jongste leeftijdsgroep in significante hoeveelheid werden aangetoond. Zoals uit tabel 40 blijkt, waren de koeien in alle gevallen ongeveer een jaar voor de geboorte van hun kalf herent.

Fiege (1953) geeft een overzicht van de wijzen waarop de overdracht van antilichamen van moeder naar jong bij verschillende dieren plaatsvindt.

Volgens Little en Orcutt (1922) en Orcutt en Howe (1922) geschiedt dit bij kalveren, evenals bij andere diersoorten met een placenta epithelio-chorialis, via het colostrum. In sera van pasgeboren en nog niet met colostrum gevoederde kalveren konden deze auteurs geen antistoffen aantonen. Na opneming van het colostrum steeg de titer der antilichamen echter snel. Mason, Dalling en Gordon (1930) konden demonstreren dat resorptie van de moederlijke antistoffen in de vorm van lactoglobulinen slechts in de

eerste dagen mogelijk was, terwijl volgens Mc DIARMID (1946) 24 uur na de eerste colostrumvoeding de hoogste serumactiviteit van het kalf wordt vastgesteld.

Deze observaties zijn in overeenstemming met een waarneming van JANSSEN (1951), die bij een dier dat de eerste vier dagen na de geboorte met melk gevoederd werd en eerst daarna colostrum ontving, bij onderzoek met behulp van electroforese, geen toename van gammaglobulinen kon aantonen. De tijd gedurende welke de passief opgenomen antilichamen in het bloed aantoonbaar zijn, hangt af van de titer van het colostrum, welke zelf weer een afspiegeling is van die van het moederlijk serum. In sommige gevallen werd na zeventien weken nog specifieke activiteit gevonden.

Enkele onderzoekingen uitgevoerd met kalveren van tegen mond- en klauwzeer gehyperimmuniseerde runderen, wijzen uit, dat de tegen dit virus gerichte antistoffen zich gedragen als de andere immuunglobulinen.

JANSSEN (1951) vermeldt, dat een kalf van een meerdere malen geïnfecteerde koe, 9, 12 en 17 dagen na de geboorte in staat was herhaalde intraveneuze infecties te weerstaan. SCHNEIDER (1955) kon met behulp van neutralisatieproeven in jonge muizen aantonen, dat de specifieke antilichamen eerst na voedering van colostrum in het kalverserum verschenen. Ook zijn proefkalf, dat afkomstig was van een tegen verschillende virustypen gehyperimmuniseerde koe, was tussen de 12de en 24ste dag na de geboorte in staat herhaalde infectie met grote hoeveelheden smetstof van verschillende typen het hoofd te bieden. Nagenoeg overeenkomstige waarnemingen werden later gepubliceerd door BEREZNAY, RICHTER en SZENT-IVANYI (1957). SCHNEIDER sprak de verwachting uit dat deze passieve immuniteit niet langer dan 2 maanden zou stand houden.

Het voorkomen van antilichamen in sera van jonge kalveren van door vaccinatie tegen mond- en klauwzeer geïmmuniseerde runderen werd niet eerder beschreven. Men zou echter verwachten dat, in analogie met de bij de meeste andere infectieziekten voorkomende situatie, de door enting met een geïnactiveerd virus opgewekte immuniteit minder hecht is dan die, verkregen na doormaken van de infectie en dus zeker inferieur aan die van hoogimmune dieren.

Proef 4. De antistoffen bij niet-gevaccineerde Nederlandse kalveren

Ter completering van onze gegevens werd een experiment ingezet met een vijftal in isolatie geboren kalveren van vermoedelijk herhaaldelijk gevaccineerde Nederlandse runderen. Tabel 41 geeft een overzicht van deze groep dieren.

Van alle moederdieren werd enkele dagen voor de partus een serummonster verkregen. De eerste kalversera werden zo spoedig mogelijk na de geboorte verzameld, een tweede monster werd 24 uur na de eerste voeding afgenomen en er werden tevens colostrummonsters bewaard. Daarna werd om de 4 tot

TABEL 41. Gegevens betreffende de in proef 4 gebruikte niet-gevaccineerde Nederlandse kalveren

No. Moeder	No. Kalf	Geboortedatum Kalf	Data waarop serummonsters werden verzameld					
0786	445	31.7.56	31/7,	1/8,	23/8,	18/9,	19/10,	5/12
8701	446	1.8.56	1/8,	2/8,	23/8,	18/9,	19/10,	5/12
6700	447 [2]	1.8.56	1/8,	2/8,	23/8,	18/9,	19/10,	5/12
7218	448	3.8.56	4/8,	5/8,	23/8,	18/9,	19/10,	5/12
5506 [1]	449	19.8.56	20/8,	21/8,		18/9,	19/10,	5/12
Number of mother	*Number of calf*	*Date of birth of calf*	*Dates of collection of serum samples*					

[1] 18 dagen voor de partus gerevaccineerd met 15 ml O-vaccin — *Revaccinated 18 days before parturition with 15 mls of an O-vaccine.*

[2] Kalf 447 werd i.p.v. met colostrum met melk van een niet-gevaccineerde koe gevoed — *Calf no. 447 was fed with milk of an unvaccinated cow only.*

TABLE 41. *Data concerning the unvaccinated Dutch calves used in experiment no. 4*

6 weken bloed voor onderzoek opgevangen. Een van de moederdieren werd enkele weken voor de partus gerevaccineerd; een kalf van een andere koe werd, in plaats van met colostrum, met melk van een gevoelig rund gevoed.

De sera werden op de gebruikelijke wijze na inactivering in de verdunning 1/10 onderzocht ten opzichte van een bij lage temperatuur bewaarde virussuspensie van het O-type. Het colostrum bleek niet geschikt voor onderzoek met de door ons gebruikte methode doordat, na neerslaan van het caseïne bij pH 4,6 (Mc MEEKIN en POLIS, 1949) een licht troebele vloeistof achterbleef, die in de onderzochte verdunning de aflezing van de complementbindingsreactie onmogelijk maakte.

Fig. 22 geeft een overzicht van de resultaten van deze neutralisatieproeven.

De kalveren werden op een leeftijd van ca. 4 maanden kunstmatig geïnfecteerd door injectie van 0,2 ml van een 1% suspensie van runder-O-virus in het tongslijmvlies. Ze bleken alle vijf geheel gevoelig te zijn.

Onze uitkomsten bevestigen die van verschillende andere onderzoekers. De direct na de partus verzamelde kalversera bleken geen antistoffen te bevatten. Deze waren echter wel tot een hoge titer aanwezig in drie van de vier met colostrum van de gevaccineerde moeders gevoede jonge kalveren. Bij het vierde dier werden belangrijk minder immuunstoffen gevonden. Geen antilichamen konden worden aangetoond in serum van een kalf dat met melk van een gevoelig rund was gevoed.

Er bestond een parallel tussen de neutralisatietiters van de kort voor de partus verzamelde moederlijke sera en de hoogste waarden, welke bij de

kalveren gevonden werden. Het kalf van de koe, waarbij de laagste serumtiter werd vastgesteld, bleek echter ook na voeding slechts weinig antistoffen in de circulatie te hebben.

De titers van de moederlijke sera waren alle 0,5 tot 1,0 hoger dan die van de circa 24 uur na de eerste colostrumvoeding verkregen kalversera.

Bij alle jonge dieren trad, nadat 24 uur na de eerste voeding een maximum was bereikt, een daling van de serumtiters op. Ongeveer tien weken post partum waren nog neutraliserende antistoffen in lage titer in de sera van drie van de jonge dieren aantoonbaar, nog zeven weken later was dit niet meer het geval. De kalveren bleken toen niet resistent tegen intradermale injectie van smetstof in de tong.

De hoogste waarden welke bij de positieve kalveren werden aangetroffen, verschillen niet belangrijk, ook de titers van de sera der moeders liepen slechts betrekkelijk weinig uiteen. De met het colostrum opgenomen antilichamen bleven lang in de circulatie aantoonbaar.

In dit opzicht bevestigen onze waarnemingen die van Mc Diarmid (1946) Gillespie (geciteerd naar Stephenson, 1953) en Sorensen c.s. (1958), welke eveneens met jonge dieren werden verkregen. Ook deze auteurs konden nog antistoffen aantonen op een tijdstip, waarop door middel van injectie toegediende immuunlichamen reeds lang hun werkzaamheid verloren zouden hebben.

Dit verschil zou toe te schrijven kunnen zijn aan het feit, dat al deze onderzoekingen homologe antistoffen betreffen. Daarnaast zou ook de hoge dosering van betekenis kunnen zijn.

Nog een derde mogelijke verklaring verdient overweging. Verschillende

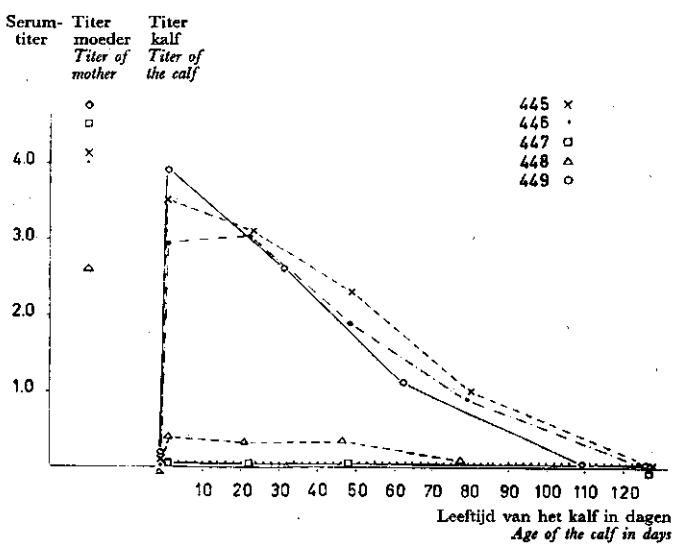
Fig. 22

Neutralisatietiters van gevaccineerde Nederlandse runderen en hun niet-geënte kalveren

No. 447 is niet met colostrum gevoed — *No. 447 did not receive colostrum.*

Fig. 22

The serum titers of vaccinated Dutch cows and their unvaccinated calves



onderzoekers hebben nagagaan hoelang antilichamen in de circulatie aantoonbaar blijven. De activiteitsvermindering, welke in de regel wordt uitgedrukt in de vorm van een "halveringstijd", is niet voor alle diersoorten gelijk. Zo vonden MASON, DALLING en GORDON (1930) voor passief opgenomen antilichamen bij jonge lammeren een halveringstijd van 28 tot 30 dagen. SCHOENHEIMER, RATNER, RITTENBERG en HEIDELBERGER (1942) berekenden voor actief geproduceerde antilichamen in konijnen een *half-life* van 14 dagen, een uitkomst, welke mogelijk ten gevolge van de heropname van de gebruikte radioactieve stikstof in andere moleculen, aan de hoge kant is.

DIXON, BUKANTZ, DAMMIN en TALMAGE (1953) stelden voor homoloog gamma-globuline na intraveneuze injectie in niet-gesensibiliseerde konijnen een halveringstijd van 4,7 dagen vast.

DIXON, TALMAGE, MAURER en DEICHMILLER (1952) bepaalden bij een aantal diersoorten de halveringstijd van ingespoten, met J^{131} gemerkt, homoloog gammaglobuline voor individuen van verschillende leeftijd. Bij vier volwassen runderen vonden zij een gemiddelde waarde van 21,2 $\pm$ 1,7 dagen.

Op grond van een vergelijking van hun uitkomsten met die van verschillende andere auteurs, menen DIXON en zijn medewerkers, dat de afbraak van homoloog gammaglobuline bij jonge runderen mogelijk minder snel verloopt dan bij volwassen dieren. De stofwisselingssnelheid zou o.a. een van de factoren zijn welke dit verschil veroorzaken. Kort na de geboorte is deze laag, zij bereikt enkele maanden later een maximum, om daarna weer te dalen.

Uit fig. 22 blijkt, dat de neutralisatietiters van de door ons onderzochte kalversera in 30 tot 40 dagen daalden met één logaritme. Aangezien voor de helling van de serum-viruslijn een waarde van ongeveer 1,4 wordt gevonden (zie hoofdstuk III), komt dit ruw geschat overeen met een daling van de aanwezige hoeveelheid antilichamen tot ongeveer 1/5, d.i. een halveringstijd van 12 tot 17 dagen, indien geen correctie voor de gewichtstoename van de proefdieren wordt toegepast. Zou hiermede wel rekening worden gehouden, dan wordt een iets langere tijd gevonden.

Een tweede berekening gebaseerd op de niet-gevaccineerde kalveren uit fig. 19 (no's 425 en 430) leverde uitkomsten van ongeveer 20 tot 24 dagen. Deze resultaten leveren geen bevestiging van de hypothese van DIXON en zijn medewerkers. De verschillende uitkomsten zijn evenwel slecht vergelijkbaar, daar ze verkregen werden met uiteenlopende technieken en onze resultaten slechts op te vatten zijn als zeer ruwe schattingen. Daar ook uit verschillende andere aspecten van de immunologische processen blijkt dat de stofwisseling van zeer jonge dieren anders verloopt dan die van oudere individuen — men denke o.a. aan het uitblijven van een reactie na toedienen van antigeen — menen wij dat ook een vertraagde afbraak van de gammaglobulinen een oorzaak zou kunnen zijn van het langdurig hoogblijven van de concentratie der immuunstoffen bij de jonge dieren.

Op grond van onze in proef 4 van dit hoofdstuk verkregen resultaten,

lijkt het dus wel waarschijnlijk dat ook de immuunlichamen welke werden aangetroffen bij de groep 8 tot 11 weken oude kalveren nog van het colostrum afkomstig waren. Het zullen vermoedelijk deze antistoffen zijn, welke de werkzaamheid van het geïnjicieerde vaccin verhinderen.

Een storende invloed van passief en ook actief verworven antistoffen bij immunisaties van verschillende aard, is door meerdere auteurs beschreven (EDSALL, 1953; STEPHENSON, 1953; HOERLEIN, 1957 en GILLESPIE en medewerkers, 1958); een dergelijke remming is echter niet bij alle entingen van jonge individuen met geïnactiveerd antigeen vastgesteld (BATSON, CHRISTIE en MAZUR, 1957).

Ook het bij verschillende groepen uiteenlopen van het reactiepatroon wijst op de betekenis van de antistoffen, die van de moeder afkomstig zijn.

Van de jongste dieren (proef 3) reageerde geen enkel op de eerste vaccinatie. Drie van deze kalveren toonden ook weinig of geen titerstijging na injectie van de tweede dosis entstof en dit waren juist de dieren, welke bij het begin van de proef de hoogste serumtiters hadden, terwijl ten tijde van de revaccinatie ook nog geringe hoeveelheden antilichamen waren aan te tonen.

Twee kalveren uit deze groep reageerden wel enigermate op de herenting;

TABEL 42. Gegevens betreffende de in proef 5 gebruikte Ierse kalveren

Nummers van de kalveren	Leeftijd bij begin van de proef	Datum eerste enting	Datum tweede enting	Datum infectie
347, 348, 350, 352 en 353	6—10 weken — *weeks*	13.12.56	7.3.57	13.7.57
351	„	7. 3.57	—	13.7.57
333, 335, 336, 339 en 481	13—17 weken — *weeks*	13.12.57	7.3.57	13.7.57
338	„	7. 3.57	—	13.7.57
340, 341, 342, 480 en 482	20—24 weken — *weeks*	13.12.57	7.3.57	13.7.57
343 en 345	„	7. 3.57	—	13.7.57
349	6—10 weken — *weeks*	—	—	13.7.57
337	13—17 weken — *weeks*	—	—	13.7.57
Numbers of the calves	*Age in weeks at the beginning of the experiment*	*Date of first vaccination*	*Date of second vaccination*	*Date of infection*

TABLE 42. *Data concerning the Irish calves used in experiment no. 5*

Fig. 23 Het verloop van de serumtiter bij op een leeftijd van 6 tot 10 weken gevaccineerde

een aantal gevoelige volwassen runderen, kunstmatig te infecteren door intradermolinguale injectie van een 10 000 ID_{50} bevattende suspensie van met O-virus geïnfecteerd rundertongepitheel. Deze smetstof was tevoren getitreerd volgens de methode van Henderson (1949).

Van alle dieren werd voor de enting en op verschillende tijdstippen erna een serummonster genomen. De sera werden geïnactiveerd en op de gebruikelijke wijze in de verdunning 1/10 onderzocht met een bij –30° bewaarde O-smetstofsuspensie.

De resultaten van deze proeven worden weergegeven in fig. 23, 24 en 25. Na de eerste enting toonden alle dieren een krachtige serologische reactie. De oudste groep gedroeg zich hierbij wat meer homogeen dan de beide jongere. Bij de meeste kalveren werd de maximale waarde ongeveer vijf weken post vaccinationum gevonden, daarna trad een sterke daling op. Na de revaccinatie werd opnieuw een krachtige stijging van de neutralisatietiters vastgesteld. Bij vrijwel alle dieren werden toen na enkele weken waarden van groter dan 6,0 verkregen. Ook in dit geval was de reactie van de oudere kalveren meer uniform dan die van de andere groepen. De tweede daling verliep niet bij alle kalveren even snel.

De serumtiters van de controledieren schommelden om de waarde 0. Op de vaccininjectie, welke vier van deze zes kalveren twaalf weken na het begin

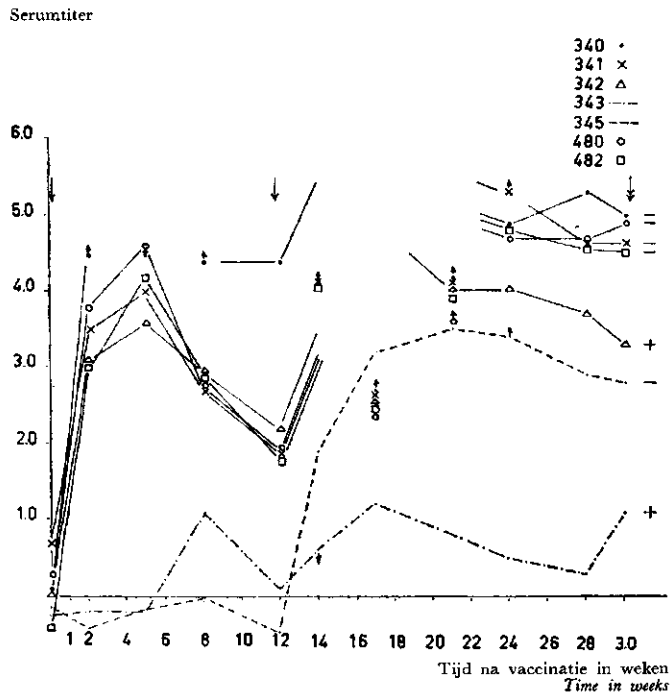


Fig. 25

Het verloop van de serumtiter bij op een leeftijd van 20 tot 24 weken gevaccineerde Ierse kalveren

↓ Vaccinatie — *vaccination.*

↓ Kunstmatige infectie — *exposure to infection.*

\+ Generalisatie na besmetting — *generalized after challenge.*

— Resistent na besmetting — *No foot lesions developed after challenge.*

↑ Geen titratie-eindpunt gevonden — *No end-point obtained.*

Zie verder tabel 42 — *See also table 42.*

Fig. 25

The development of the neutralizing antibodies in Irish calves, that were first vaccinated at an age of 20 to 24 weeks

van de proef ontvingen, reageerden er drie met een flinke titerstijging, het vierde dier kwam echter slechts tot een waarde van 1,2.

Bij de infectie bleken alle dieren, welke ten tijde van de smetstoftoediening titers van lager dan 2,5 hadden, niet beschermd te zijn tegen generalisatie. Ook een tweetal kalveren met titers van 2,9 en 3,2 bleek niet resistent, terwijl twee andere dieren met titers van 2,9 en 3,0 wel over voldoende weerstand beschikten. Alle kalveren met hogere serumtiters waren immuun.

Hoewel er bij de Ierse kalveren belangrijke individuele verschillen waren tussen de proefdieren onderling, reageerden 18 van de 19 dieren op de eerste vaccininjectie met een duidelijke titerstijging. De na ongeveer drie maanden gevonden waarden lagen mogelijk over het geheel genomen beneden die, welke in de eerder besproken proeven met volwassen gevoelige runderen werden verkregen. De uitkomsten zijn onderling echter niet goed vergelijkbaar, daar laatstgenoemde runderen met een monovalente entstof waren behandeld, terwijl bij de kalveren een trivalent vaccin werd gebruikt.

Dit experiment demonstreert op overtuigende wijze, dat leeftijd niet de beperkende factor was bij de immunisatie van het jongvee uit proef 3 van dit hoofdstuk.

Deze uitkomsten zijn min of meer in overeenstemming met die van BROWN (1956), die in staat was antilichamen tegen runderpest op te wekken door jonge kalveren te vaccineren met een kleine hoeveelheid aan konijnen geadapteerde smetstof. In dit verband is ook een mededeling van KERR (1956) van belang, die vermeldt er niet in geslaagd te zijn bij één week oude dieren agglutininen tegen verschillende bacteriën op te wekken, hoewel de dieren vier maanden later op een nieuwe antigeentoediening met een typische anamnestische reactie reageerden.

Een verschil in de aard van het toegediende antigeen ligt mogelijk ten grondslag aan deze ongelijke uitkomsten. De laatste waarneming suggereert dat bij gebruik van proefdieren welke nog jonger zijn dan de door ons gevaccineerde, wel een leeftijdseffect zou kunnen optreden. Voor de praktische toepassing van het mond- en klauwzeervaccin in ons land is deze periode echter niet van betekenis.

De door de passief opgenomen antistoffen uitgeoefende remming van de werking van het vaccin neemt af naarmate de serumtiter lager is en kan variëren van een zeer gering effect, dat ternauwernood vast te stellen is, tot een algehele inhibitie van de produktie van specifieke immuunlichamen.

Voor de praktische mond- en klauwzeerbestrijding heeft deze situatie twee aspecten welke van belang zijn. In de eerste plaats is thans begrijpelijk, waarom bij de sporadische ziektegevallen welke de laatste jaren voorkwamen, geen mortaliteit onder de jonge kalveren meer werd waargenomen. Het zijn immers deze dieren, welke de bescherming genieten van de door de moeder in het colostrum uitgescheiden antistoffen. Aangezien een trivalente enting wordt toegepast, zal in de regel in de eerste maanden een voldoende passieve

protectie aanwezig zijn om een infectie met dodelijk gevolg door de in Europa optredende virusstammen te voorkomen. Dit geldt niet voor jonge varkens, daar immers vrijwel geen enting bij de varkensstapel wordt toegepast. Acute sterfte onder jonge biggen ten gevolge van mond- en klauwzeerinfecties komt dan ook nog van tijd tot tijd voor.

Een tweede punt ter overweging is het probleem van de vaccinatie van het jongvee.

Op grond van onze resultaten mag verwacht worden dat de thans gevolgde regeling, welke enting van alle dieren van ouder dan twee maanden verlangt, geen optimaal resultaat zal boeken. De eerste door ons onderzochte groep kalveren van immune moeders reageerde niet op een op de leeftijd van 8 tot 21 weken uitgevoerde enting, terwijl enkele dieren ook bij een na ongeveer 18 weken uitgevoerde herenting geen titerstijging vertoonden. Een tweetal dieren van resp. 129 en 152 dagen oud werd wel met goed gevolg gevaccineerd. Het betrof hier kalveren van moederdieren, welke niet minder dan 8 tot 10 maanden voor de partus voor het laatst geënt waren.

Bij een andere groep jongvee, welke voornamelijk bestond uit in augustus geboren dieren van moeders die ongeveer een half jaar tevoren gevaccineerd waren, werden na drie maanden nog zoveel antistoffen aangetroffen, dat men geneigd is op grond van de in de eerste proef verkregen resultaten aan te nemen dat enting op dit tijdstip, en mogelijk ook nog enkele weken nadien, nog geen effect zou hebben gehad. Nog zes weken later bleken deze kalveren echter niet resistent tegen kunstmatige infectie.

Er bestaat dus een periode in het leven van ons jongvee gedurende welke kleine hoeveelheden passief verkregen antistoffen in de circulatie aanwezig zijn, welke een zo geringe concentratie hebben dat zij niet geacht kunnen worden het individu tegen besmetting en ziekte te vrijwaren. Ze zijn echter wel in staat effectieve vaccinatie te verhinderen.

Proef 6. Een onderzoek naar de leeftijd waarop Nederlandse kalveren met succes geënt kunnen worden

Met het doel nadere gegevens betreffende de duur van bovengenoemde kritieke periode te verkrijgen werden nog enkele aanvullende proeven uitgevoerd.

De tijd gedurende welke de met het colostrum opgenomen antistoffen in de circulatie van het jonge dier aanwezig zullen zijn, zal in het algemeen afhangen van de kort na de geboorte bereikte maximumtiter. Deze laatste waarde blijkt nauw gecorreleerd met het gehalte aan immuunlichamen van het bloed van de moeder ten tijde van de partus. Teneinde een indruk te krijgen van de, ten gevolge van de variatie van de serumtiters der moederdieren bij het jongvee te verwachten verschillen, werd bij dit onderzoek gebruik gemaakt van twee groepen kalveren, waarvan de ene was samengesteld uit dieren welke kort voor de jaarlijkse entingsperiode waren geboren, terwijl de andere

TABEL 43. Gegevens betreffende de in proef 6 gebruikte Nederlandse kalveren

Nummer van het kalf	Geboortedatum van het kalf	Datum van laatste enting van de moeder	Leeftijd van het kalf ten tijde van de eerste enting in dagen	Leeftijd van het kalf bij de herenting in dagen
526	18.3.58	12.3.58	67	
527	16.3.58	entseizoen — *spring vaccination* 1957	59	
528	8.3.58	entseizoen — *spring vaccination* 1957	97	168
530	10.3.58	17.3.58	166	
531	14.3.58	entseizoen — *spring vaccination* 1957	162	
532	10.3.58	entseizoen — *spring vaccination* 1957	65	137
533	17.3.58	3.2.58	116	130
534	21.3.58	febr. 1958	155	
535	23.3.58	febr. 1958	153	
536	22.3.58	28.1.58	196	
537	17.3.58	begin maart — *beginning of March* 1958	116	
538	17.3.58	10.3.58	102	130
Number of the calf	*Birth date of calf*	*Date of last vaccination of mother*	*Age of calf in days at time of 1st vaccination*	*Age of calf in days at time of revaccination*

TABLE 43. *Data concerning the Dutch calves used in experiment no. 6*

bestond uit kalveren welke afkomstig waren van kort voor de partus herente moeders.

De dieren werden in quarantaine geplaatst en hun sera werden regelmatig op de gebruikelijke wijze onderzocht tegenover smetstof van het O-type. Bij alle kalveren werd tijdens de proef een afname van de oorspronkelijk aanwezige immuunstoffen vastgesteld. Indien in de loop van de proef bij een bepaald individu een titer van lager dan ongeveer 0,5 werd bereikt, werd het betreffende dier zo spoedig mogelijk gevaccineerd met 45 ml van een trivalent mond- en klauwzeervaccin.

Het serumonderzoek werd daarna voortgezet en dieren welke na een eerste enting geen duidelijke titerstijging vertoonden, werden gerevaccineerd.

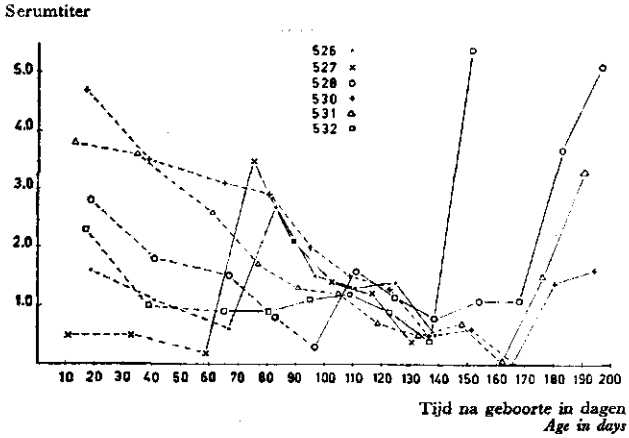


FIG. 26

Het verloop van de serumtiter bij Nederlandse kalveren, waarvan de moeder ongeveer een jaar voor de partus voor het laatst was geënt

----- titer vóór vaccinatie van het kalf — *serum titer before vaccination of the calf.*

—— titer na vaccinatie — *serum titer after vaccination.*

FIG. 26

The development of neutralizing antibodies in Dutch calves of mothers that had been revaccinated about one year before parturition

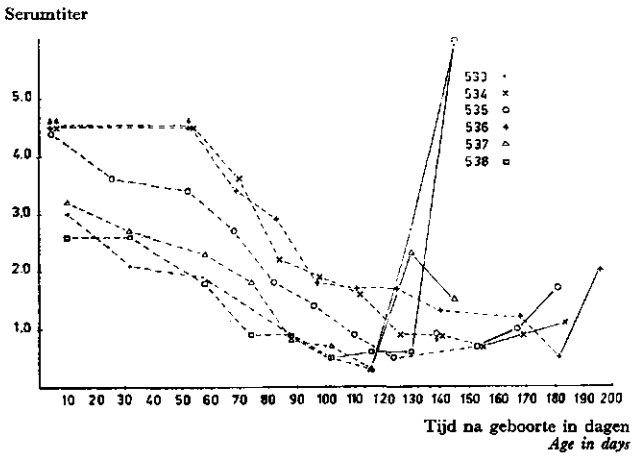


FIG. 27

Het verloop van de serumtiter bij Nederlandse kalveren, waarvan de moeder kort voor de partus was herënt

----- Titer vóór vaccinatie van het kalf — *serum titer before vaccination of the calf.*

—— titer na vaccinatie — *serum titer after vaccination.*

FIG. 27

The development of neutralizing antibodies in Dutch calves of recently revaccinated mothers

Tabel 43 geeft een overzicht van de samenstelling van beide groepen en van de data waarop de dieren geënt werden.

De fig. 26 en 27 geven een overzicht van het titerverloop bij de verschillende kalveren.

Wanneer wij eerst de groep kalveren van niet-gevaccineerde moeders bezien, blijkt dat vijf van deze zes dieren bij het begin van de proef, dat wil zeggen op een leeftijd van 10 tot 20 dagen, duidelijk positieve serumtiters hadden, welke varieerden van 1,5 tot 4,7.

Na ongeveer twee maanden werden drie dieren geënt. In twee gevallen trad een duidelijke titerstijging op, in het derde geval was deze onbetekenend, maar dit kalf reageerde zeer krachtig op een 2½ maand later uitgevoerde revaccinatie. Het vierde dier reageerde slechts zwak op de 95 dagen na de

geboorte toegediende entstof, de beide resterende werden eerst op een leeftijd van 162 en 166 dagen met succes gevaccineerd.

Bij de kalveren van de voor de partus gerevaccineerde moeders werden bij het begin van de proef gemiddeld hogere titers aangetroffen dan bij de leden van de andere groep. De laagste waarde was 2,5, drie dieren hadden titers van 4,5 of hoger. Een tweetal dieren bleek op een leeftijd van 116 dagen met goed gevolg gevaccineerd te kunnen worden. Bij een derde kalf werd een, op een leeftijd van 102 dagen gegeven, vaccininjectie niet gevolgd door een titerstijging, maar vier weken later vertoonde dit dier een zeer krachtige reactie op een tweede entstoftoediening.

Twee van de resterende dieren werden 153 en 155 dagen na de geboorte met redelijk succes gevaccineerd. Bij het zesde kalf werd pas tot vaccinatie overgegaan toen het een leeftijd van 182 dagen had bereikt; de enting had toen slechts een matig resultaat.

In alle gevallen bleek er een parallel te bestaan tussen de hoogte van de kort na de geboorte gevonden serumtiters en de tijd gedurende welke de passief verworven antistoffen in het bloed aantoonbaar bleven.

De remmende werking van de met het colostrum opgenomen antistoffen bleek ook in deze experimenten, afhankelijk van hun concentratie, te kunnen variëren van een totale inhibitie van de reactie van het kalf tot een nauwelijks waarneembare verlaging van de door het jonge dier bereikte maximumtiter.

De waarneming dat in deze proeven vijf van de twaalf dieren eerst op een leeftijd van vijf tot zes maanden in staat waren goed op de vaccininjectie te reageren, wettigt het vermoeden dat in het algemeen van de enting van jongvee geen volledig resultaat verwacht mag worden, voordat de dieren een leeftijd van ten minste een half jaar bereikt hebben. Om deze reden is de vaccinatie van jongere dieren, althans tegenover die smetstoftypen waartegen ook de volwassen runderen gevaccineerd worden, af te raden.

4. De distributie van neutraliserende antistoffen bij de Nederlandse rundveestapel

Proef 7. De serumtiter bij volwassen dieren van verschillende herkomst

Teneinde vast te stellen in welke mate de in ons land gevolgde vaccinatieregeling leidde tot de aanwezigheid van virusneutraliserende antistoffen bij onze rundveestapel, werd een aantal sera van Nederlandse runderen onderzocht. Er werd in dit geval gebruik gemaakt van aan het Amsterdamse abattoir aangevoerde slachtdieren. Tussen april 1955 en eind februari 1956 werden 185 serummonsters verzameld, terwijl in juli 1957 nog enkele aanvullende gegevens werden verkregen over 20 dieren. Van alle runderen waren de plaats van herkomst en de datum van de laatst verrichte mond- en klauwzeerenting

bekend. Tabel 44 geeft een overzicht van deze runderen, verdeeld naar de tijd van ontvangst van het serum en de provincie van herkomst.

Hieruit blijkt dat bijna twee derde van deze dieren afkomstig was uit de provincie Noord-Holland en wel voornamelijk uit de gebieden gelegen ten noorden van de spoorlijn Amsterdam-Haarlem.

Tabel 45 geeft een overzicht naar geboortejaar en de tijd verlopen tussen de laatste vaccinatie tegen mond- en klauwzeer en de slachtdatum. Dit laatste gegeven werd verkregen van het geleidebiljet.

De sera werden na inactivering in de verdunning 1/10 onderzocht tegenover verschillende verdunningen van een bij −30° C bewaarde O-virussuspensie. In een aantal gevallen werd tevens een onderzoek ingesteld naar neutraliserende immuunlichamen tegen beide andere virustypen. De uitkomsten werden op de gebruikelijke wijze gecorrigeerd. Fig. 28 geeft een overzicht van de resultaten van het onderzoek.

Aangezien vrijwel alle dieren ten tijde van de slachting ouder dan een jaar waren, mag aangenomen worden dat de grote meerderheid herhaaldelijk gevaccineerd was. Hiermede is in overeenstemming dat bij een aantal sera,

TABEL 44. Distributie van de Nederlandse slachtrunderen, welke sera voor onderzoek leverden, naar provincie van herkomst en maand van ontvangst van het serum

Provincie [1] *province*	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	Totaal *total*
Slachtmaand — *Month of bleeding*												
April 1955					6	1	3			4	2	16
Mei — *May* 1955		5	1	1			16					23
Juni — *June* 1955			3				9					12
Juli — *July* 1955	3	2	5		1		21					32
Aug. 1955							15					15
Sept. 1955	1	3		1		2	25					32
Okt. — *Oct.* 1955		8					8					16
Nov. 1955												—
Dec. 1955		3	1	1			6			2		13
Jan. 1956		2					11		3	5		21
Febr. 1956	1	1	1	1			1					5
Totaal — 1955—56 *total*	5	24	11	4	7	3	115	—	3	11	2	185
Juli — *July* 1957		2	2	16								20

[1] 1 Groningen, 2 Friesland, 3 Drente, 4 Overijssel, 5 Gelderland, 6 Utrecht, 7 N.-Holland, 8 Z.-Holland, 9 Zeeland, 10 N.-Brabant, 11 Limburg

TABLE 44. *Distribution of serum samples collected from Dutch cattle according to the province of origin and the date of bleeding*

TABEL 45. Verdeling van de Nederlandse slachtrunderen welke sera voor onderzoek leverden, naar geboortejaar en tijd verlopen sedert de laatste enting

Geboortejaar	Tijd verlopen sedert de laatste vaccinatie in dagen							
	0—49	50—99	100—149	150—199	200—249	250—299	300—349	Meer dan 350
1941							1	
1942		1				1		
1943								
1944	1	2		1		1	1	1
1945		2	2 (1) [1]					
1946	1	1	1 (2)			1	1	
1947		1	1			1	1	
1948		3	(2)	5	1			
1949	1	1	1	2		1	1	
1950	4		5 (3)	7		2	1	
1951	2	5	7	5 (2)	3	1	2	
1952	3	2	12 (2)	11	11	5	2	1
1953	7	8	6 (1)	7	4	5	5	
1954		1	3 (2)	1		1		
1955			(3)					
1956			(1)	(1)				
Year of birth	0—49	50—99	100—149	150—199	200—249	250—299	300—349	*More than* 350
	Time elapsed between previous vaccination and date of collection of blood sample in days							

[1] Tussen haakjes: serum in 1957 ontvangen. Alle andere in 1955 en 1956.
Between brackets: sample received in 1957. All other bleedings were done in 1955 and 1956.

TABLE 45. *Distribution of serum samples collected from Dutch cattle, according to the year of birth of the animal and the length of time elapsed since the previous vaccination*

welke korte tijd na de enting ontvangen werden, zeer hoge antistoftiters werden vastgesteld. In meerdere gevallen bleek het serum in de verdunning 1/10 de onverdunde smetstof geheel te neutraliseren, zodat geen eindpunt kon worden bepaald. Bij een aantal andere dieren werden minder hoge waarden gevonden. In deze gevallen bleven de serumtiters belangrijk lager dan die, welke wij vonden in de eerder beschreven proeven met twee maal gevaccineerde Ierse runderen.

Mogelijk trad bij deze Nederlandse runderen een remming van de door het antigeen uitgeoefende prikkel op ten gevolge van in de circulatie aanwezige actief gevormde antistoffen. Een dergelijke situatie werd ook bij andere antigenen wel waargenomen (EDSALL, 1953).

In de eerste drie maanden na de enting waren de titers hoog. Bij verschillende van de later verkregen sera werd soms een geringe neutraliserende activiteit gevonden.

Het in de eerste vijf maanden ontvangen materiaal vertoont een patroon,

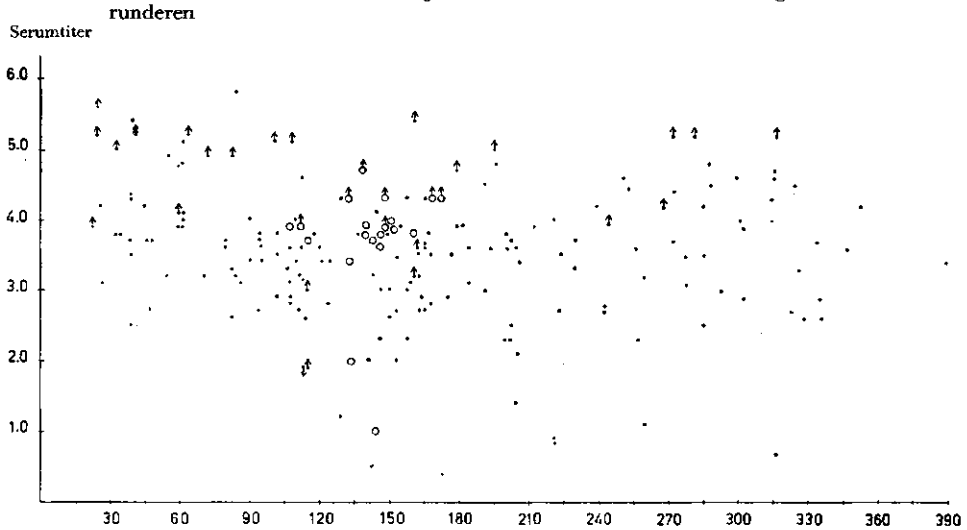
dat in grote lijnen overeenkomt met dat, wat bij onderzoek van de herhaaldelijk gevaccineerde Ierse runderen werd gevonden.

Talrijke van de zeven tot twaalf maanden na enting verzamelde sera geven eveneens hoge uitkomsten waarbij echter opnieuw een belangrijke individuële variatie de aandacht trok.

De gevonden waarden lijken wat hoger dan die, welke men op grond van de in de voorafgaande paragrafen beschreven proeven, waarbij slechts eenmaal herent werd, zou verwachten. Ze zijn echter in overeenstemming met niet-gepubliceerde waarnemingen van FRENKEL, waarbij deze vaststelde dat een zeer groot percentage van de Nederlandse runderen nog 9 tot 12 maanden post vaccinationem resistent is tegen kunstmatige besmetting. De oorzaak van een eventueel verschil tussen de serumtiters van onze Ierse proefrunderen en die van de Nederlandse dieren zou kunnen liggen in het groter aantal entingen, dat de onderzochte Nederlandse runderen ondergingen.

Dat bij de totstandkoming van de verdeling van de punten, vooral in de rechter helft van de grafiek van fig. 28, de leeftijd van de gebruikte proef-

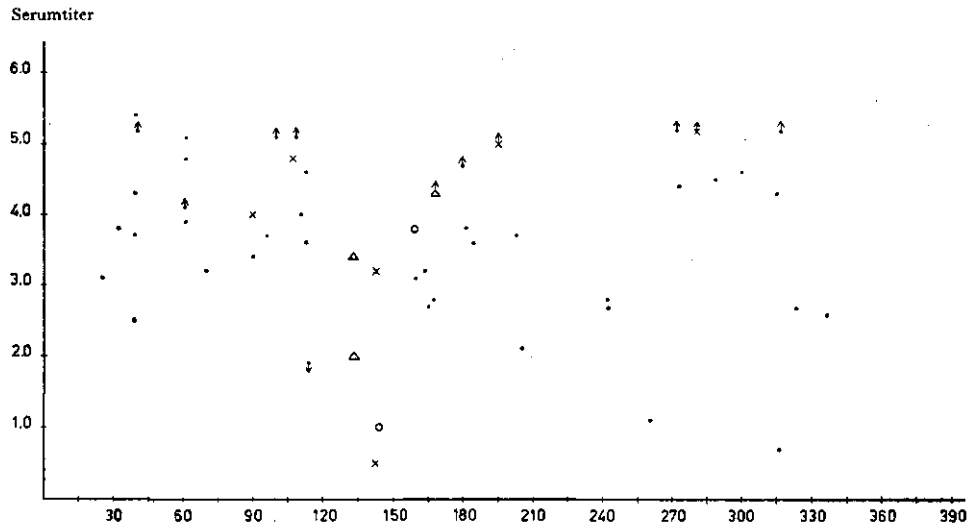
FIG. 28. Distributie van de serumtiters bij aan het Amsterdamse abattoir aangevoerde Nederlandse runderen



• in 1955 en 1956 ontvangen sera — *samples collected in 1955 and 1956.*
O in 1957 ontvangen sera — *sera collected in 1957.*
↓ eindpunt lager dan de aangegeven waarde — *end-point lower than value indicated.*
↑ eindpunt ten minste de aangegeven waarde — *end-point equal to or higher than value indicated.*

FIG. 28. *The distribution of the neutralizing antibodies in serum samples collected from Dutch cattle slaughtered at Amsterdam in 1955, 1956 and 1957*

FIG. 29. Distributie van de serumtiters bij aan het Amsterdamse abattoir aangevoerde runderen van ongeveer twee jaar of jonger



• Geboren in 1953, serum onderzocht in 1955/'56 — *year of birth 1953, serum tested in 1955/'56.*
× Geboren in 1954, serum onderzocht in 1955/'56 — *year of birth 1954, serum tested in 1955/'56.*
△ Geboren in 1955, serum onderzocht in 1957 — *year of birth 1955, serum tested in 1957.*
O Geboren in 1956, serum onderzocht in 1957 — *year of birth 1956, serum tested in 1957.*
↓ Eindpunt lager dan aangegeven waarde — *end-point lower than value indicated.*
↑ Eindpunt ten minste de aangegeven waarde — *end-point equal to or higher than value indicated.*

FIG. 29. *The distribution of the neutralizing antibodies in serum samples collected from Dutch cattle of approximately two years old or younger, that were slaughtered at Amsterdam in 1955, 1956 and 1957.*

dieren geen belangrijke rol heeft gespeeld, blijkt uit fig. 29. Hierin zijn verwerkt de met de beide jongste jaargroepen gevonden resultaten, welke voor het overgrote deel echter toch betrekking hebben op tweemaal geënte dieren. De distributie was bij deze groep nagenoeg gelijk aan die van de gehele proef, welke vele oudere dieren omvatte.

Als andere oorzaken, die mogelijk ten grondslag zouden kunnen liggen aan de hoge titers welke langere tijd na vaccinatie gevonden werden, zouden ook revaccinatie en infectie in aanmerking kunnen komen.

Een niet-geregistreerde herenting van een groot aantal dieren is niet waarschijnlijk. Bij Ministeriëel Besluit van 30 september 1955 werd wel in verband met de mond- en klauwzeerbestrijding het vervoer van runderen verder aan banden gelegd, doch herenting werd alleen gevorderd voor zover het dieren betrof geboren op of na 1 januari 1954.

Van de runderen welke meer dan zeven maanden na het entseizoen onder-

TABEL 46. Serologische reactie van monovalent geënte runderen na intradermolinguale infectie met 1000 ID_{50} homoloog virus

Nummer van het rund	Serumtiter voor infectie	Serumtiter 1 week na infectie	Titer-stijging	Sectiebevindingen - *Finding at post-mortem*
803	2,7	3,3	+ 0,6	Uitgebreid tongdefect - *Extensive tongue lesions*
810[1]	3,7	3,5	—	Geen afwijkingen - *No lesions*
817	1,8	2,9	+ 1,1	Klein tongdefect - *Small lesions on the tongue*
826	3,6	4,4	+ 0,8	Uitgebreid tongdefect - *Extensive tongue lesions*
829	4,9	4,9	—	Geen afwijkingen - *No lesions*
831	2,3	> 4,3	> 2,0	Generalisatie, 4 extr. - *Generalization to 4 feet*
841[1]	2,7	> 5,0	> 2,3	Klein tongdefect - *Small lesions on the tongue*
851	3,3	4,6	1,3	Geen afwijkingen - *No lesions*
969[2]	1,0	> 4,3	> 3,3	Generalisatie, 4 extr. - *Generalization to 4 feet*
976[2]	0,8	> 5,6	> 4,6	Generalisatie, 4 extr. - *Generalization to 4 feet*
No. of the animal	*Serum titer prior to challenge*	*Serum titer 1 week after infection*	*Increase of titer*	

1 Sera onderzocht in de verdunning 10^{-3} — *Sera tested in the dilution* 10^{-3}.
2 Niet-gevaccineerde controles — *Unvaccinated controls.*

TABLE 46. *Serological response of cattle vaccinated with a type C vaccine, to intradermolingual challenge with 1000* ID_{50} *of the homologous virus*

zocht werden, kwam ongeveer de helft uit het noordelijk deel van de provincie Noord-Holland. Hier werden in de tweede helft van 1955 ongeveer 12 000 doses trivalente entstof gedistribueerd op een rundveebezetting van circa 233 000 stuks, waaronder 67 000 dieren van jonger dan een jaar.

Het is dus onwaarschijnlijk dat er op enigszins uitgebreide schaal onder de oudere dieren geënt werd.

Proef 8. De invloed van infectie op de serumtiter van met monovalent vaccin geënte dieren

Teneinde te onderzoeken wat het effect van infectie op de serumtiters van gevaccineerde dieren is, werden op zeer beperkte schaal enkele proeven uitgevoerd.

Tabel 46 geeft een overzicht van de eerste hiervan. Een achttal gevacci-

neerde runderen werd, evenals twee niet-geënte controles, veertien dagen na vaccinatie met een C-vaccin besmet door intradermale injectie van 1000 ID_{50} van het homologe virus in de tong. Er werden serummonsters verkregen vóór de infectie alsmede ten tijde van de sectie, welke een week later werd uitgevoerd.

Weliswaar is dit tijdsinterval van zeven dagen kort, doch zowel uit de revaccinatieproeven als uit de reactie welke de niet-geënte controledieren vertoonden, blijkt dat deze termijn lang genoeg is om een voldoend duidelijke serologische verandering mogelijk te maken.

De sera werden na inactivering voor het merendeel in de verdunning 1/10 onderzocht tegenover C-virus. Voor de smetstof werd een tienvoudige verdunningsreeks gebruikt.

Zoals uit de tabel blijkt, vertoonden drie dieren bij de sectie in het geheel geen afwijkingen. De twee runderen met de hoogste serumtiters bleken ook serologisch niet op de infectie gereageerd te hebben.

In vier gevallen werd een matige stijging van de neutralisatietiter gevonden, drie van deze dieren bleken min of meer uitgebreide laesies in de mondholte te hebben. Bij de resterende runderen, die allen een krachtige serologische

TABEL 47. Serologische reactie van trivalent geënte Nederlandse runderen na intradermolinguale injectie met een onbekende dosis O-virus

Nummer van het rund	Serumtiter tegen type								
	O			A			C		
	a	b	c	a	b	c	a	b	c
1	1,3	> 5,7	> 4,4	3,9	> 5,7	> 1,8	1,6	3,0	1,4
2	5,2	5,1	— 0,1	4,8	4,3	— 0,5	3,7	3,6	— 0,1
3	4,1	5,2	1,1	4,1	3,9	— 0,2	2,6	3,2	0,6
4	3,5	5,2	1,7	3,6 [d]	3,2 [d]	— 0,4	3,7	4,3	0,6
5	3,1	5,2	2,1	4,7	4,7	0	1,8	2,2	0,4
	a	b	c	a	b	c	a	b	c
Number of the animal	O			A			C		
	Serumtiter against type								

a Titer voor infectie — *Serum titer prior to infection.*
b Titer 14 dagen na infectie — *Serum titer a fortnight after challenge.*
c Titerstijging ten gevolge van de infectie — *Increase of titer due to the infection.*
d Sera onderzocht in de verdunning 1/10. Alle andere werden gebruikt in de verdunning 1/100.
Sera tested in a dilution of 1/10. All other sera were tested at 1/100.

TABLE 47. *Serological response of Dutch cattle vaccinated with a trivalent vaccine, to intradermolingual challenge with an untitrated suspension of type O-virus*

reactie vertoonden, bevonden zich ook de twee niet-gevaccineerde controles.

Uit deze proef blijkt, dat bij kort tevoren gevaccineerde runderen, ook de klinisch waarneembare infectie met mond- en klauwzeer niet steeds aanleiding is tot een belangrijke titerstijging.

Proef 9. De invloed van infectie op de serumtiter van met trivalent vaccin geënte dieren

Tabel 47 demonstreert, dat ook bij een aantal langere tijd tevoren trivalent geënte dieren niet steeds na infectie een titerstijging optreedt.

In dit geval werd gebruik gemaakt van Nederlandse runderen, welke 310 tot 350 dagen na de laatste vaccinatie geïnfecteerd werden door injectie van 0,3 ml van een eenprocentige O-virussuspensie in het tongslijmvlies. Er werden zowel serummonsters verzameld voor de besmetting, als veertien dagen erna. Beide sera van elk dier werden na inactivering gelijktijdig onderzocht tegenover de drie Europese virustypen, waarbij de smetstofverdunningen in een reeks met tienvoudig interval werden gebruikt. In de meeste gevallen werd geen eindpunt verkregen met de verdunning 1/10, de proef werd dan

TABLE 48. Serologische reactie van trivalent geënte Nederlandse runderen na revaccinatie met 10 ml O-vaccin

Nummer van het rund	Serumtiter tegen type								
	O			A			C		
	a	b	c	a	b	c	a	b	c
542	2,5	5,2	2,7	3,2	3,3	0,1	1,5	1,6	0,1
543	3,7	> 6,2	> 2,5	3,1	3,4	0,3	2,2	2,4	0,2
547	3,0	> 5,2	> 2,2	3,6	3,8	0,2	0,8	1,0	0,2
552	4,4	> 6,7	> 2,3	3,4	3,5	0,1	2,1	2,5	0,4
553	3,6	> 6,2	> 2,6	3,1	3,4	0,3	0	0,6	0,6
	a	b	c	a	b	c	a	b	c
Number of the animal	O			A			C		
	Serum titer against type								

a Titer voor revaccinatie — *Titer prior to revaccination.*
b Titer 10 dagen na enting — *Titer 10 days after revaccination.*
c Titerstijging — *Increase of titer.*

TABLE 48. *Serological response of Dutch cattle vaccinated with a trivalent vaccine, to revaccination with 10 mls of an O-vaccine*

herhaald met de honderd maal verdunde sera. De dieren werden veertien dagen onder observatie gehouden en daarna geseceerd. Slechts bij een ervan waren toen nog sporen van een uitgebreid tongdefect aanwezig en bestonden er ook kleine afwijkingen aan gehemelte en pens. Alle andere runderen hadden alleen beperkte, reeds grotendeels genezen veranderingen op de injectieplaats.

Een van de in deze proef gebruikte dieren, en dit was juist de koe met de hoogste serumtiter, vertoonde noch tegen het geïnjicieerde virus, noch tegen een van de andere typen, een titerstijging, terwijl bij een ander dier een belangrijke toename van de O-virusneutraliserende antistoffen en een wat geringere vermeerdering van de tegen de andere virustypen gerichte immuunlichamen werd vastgesteld.

De drie resterende proefdieren vertoonden matige titerstijgingen tegenover O-virus en kleine verhogingen van de anti-C-titers. In deze laatste gevallen was de toename van de tegen het C-type gerichte antilichamen groter dan die tegen A-virus. Mogelijk hing dit verschil in gedrag tegenover de beide heterologe stammen samen met de gemiddeld lagere begintiter van de C-antistoffen.

In verband met deze niet-typespecifieke reactie van trivalent geënte runderen op infectie, is het interessant vast te stellen dat monovalente revaccinatie bij een min of meer overeenkomstige groep dieren geen aanleiding gaf tot toename van de heterologe antistoffen.

Proef 10. De invloed van revaccinatie met monovalente entstof op de serumtiter van trivalent geënte runderen

Tabel 48 geeft een overzicht van een proef, waarbij onderzocht werd welk resultaat herenting met een monovalente entstof had op de heterologe serumtiters. Dit experiment werd in 1957 uitgevoerd, vier van de gebruikte dieren waren in 1955 en 1956 geboren.
De dieren waren 218 tot 265 dagen tevoren geënt en hadden gemiddeld wat lagere antistoftiters dan die uit de vorige proef.

De serummonsters werden voor de revaccinatie en tien dagen erna afgenomen. Ze werden na inactivering in de verdunning 1/10 onderzocht tegenover met tienvoudig interval bereide virusverdunningen. "Vroeg" en "laat" serum van hetzelfde dier werden steeds in één proef vergeleken.

In alle gevallen was de titerstijging tegen het homologe virus belangrijk, die tegen de heterologe stammen echter te verwaarlozen.

Proef 11. De antistoffen tegen de drie virustypen

Ter completering van de in tabel 47 gegeven proefuitkomsten werd een aantal sera van Nederlandse slachtrunderen, welke belangrijke hoeveelheden

TABEL 49. Serumtiters van trivalent geënte Nederlandse runderen tegenover verschillende virustypen

Nummer van het rund	Aantal dagen verlopen sedert laatste enting	Serumtiter tegen type		
		O	A	C
Jan. 4	334	2,9	4,2	2,3
Jan. 6	288	4,5	4,3	niet ingezet *not done*
Jan. 8	285	3,5	2,7	3,1
Jan. 9	285	4,2	3,4	3,5
Jan. 17	301	4,0	3,8	3,3
Jan. 23	287	4,8	3,5	4,3
Jan. 24	302	3,9	4,3	niet ingezet *not done*
Jan. 25	278	3,5	2,5	2,0
Jan. 26	324	4,5	3,4	niet ingezet *not done*
Jan. 37	314	4,3	3,7	niet ingezet *not done*
Jan. 242	315	4,7	4,3	niet ingezet *not done*
Jan. 252	293	3,0	niet ingezet — *not done*	3,2
Number of the animal	*Number of days elapsed since last vaccination*	O	A	C
		Serum titer against type		

TABLE 49. *Serum titers against different virus types in Dutch cattle immunized with trivalent vaccines under field conditions*

O-antilichamen bevatten, op de gebruikelijke wijze eveneens tegenover de beide andere typen onderzocht.

Zoals uit tabel 49 blijkt, waren ook A- en C-antistoffen tot hoge titer aanwezig. De tegen de drie typen gevonden titers lopen niet belangrijk uiteen. Wij hebben daarbij, mede op grond van de in tabel 47 vermelde gegevens, geen aanwijzingen om dit resultaat aan een recente infectie toe te schrijven.

Hier kan nog aan toegevoegd worden, dat in de tweede helft van 1955 de kans op infectie met mond- en klauwzeervirus gering was. In september, oktober en november deden zich een aantal ziektegevallen in verschillende provincies voor, welke alle veroorzaakt werden door smetstof van het C-type. Al deze besmettingen konden worden teruggebracht tot de markt te Leeuwarden; de aangetaste dieren werden afgemaakt.

In de drie volgende maanden werd ook enkele malen mond- en klauwzeer vastgesteld bij varkens waarbij O-virus werd gevonden. Er kwamen geen gevallen voor in het noordelijk deel van de provincie Noord-Holland, waaruit een groot deel van onze proefdieren afkomstig was. Hoewel verscheidene van onze runderen een aantal malen van eigenaar verwisseld waren, was in de meeste gevallen contact met de smetstof toch wel uitermate onwaarschijnlijk.

Bespreking

Onze proeven geven een zeer bevredigend beeld van de entingstoestand van de Nederlandse rundveestapel, een resultaat, dat wel toegeschreven moet worden aan de jaarlijks herhaalde vaccinatie van een zeer hoog percentage van onze runderen.

Met betrekking tot twee punten moeten wij echter enig voorbehoud maken. Het onderzoek werd om technische redenen in hoofdzaak beperkt tot het O-virus en de daartegen gerichte antilichamen. De enkele proeven, die wij met de andere smetstoftypen konden uitvoeren, vestigen de indruk dat de tegenover het A-virus verkregen uitkomsten even bevredigend zijn, die tegen C-smetstof blijven hier echter mogelijk enigszins bij achter.

Het tweede punt betreft de dieren van jonger dan twee jaar.

Deze groep is in ons proefmateriaal slechts zeer zwak vertegenwoordigd, maar maakt een relatief groot deel van onze veestapel uit. Indien in de voorjaarsentcampagne 95% van onze runderen wordt gevaccineerd, wordt hierbij de grote meerderheid van de in het voorafgaande jaar geboren kalveren voor het eerst bereikt. De bij deze dieren opgewekte weerstand zal van kortere duur zijn dan die verkregen bij oudere runderen.

Kalveren van jonger dan twee maanden behoeven volgens de voorschriften niet geënt te worden. Deze bepalingen worden soms wel wat ruim opgevat, doch onze waarnemingen tonen aan dat enting van deze groep, alsook die van wat oudere dieren, inderdaad weinig zin zou hebben. Wel genieten de jonge dieren nog gedurende een wisselend aantal maanden protectie door met het colostrum opgenomen antistoffen, maar deze passieve immuniteit zal verdwenen moeten zijn voordat een succesvolle eerste enting mogelijk is.

In een bepaald jaar treffen wij dus de volgende situatie aan:

De grote meerderheid der oudere dieren is geënt. Deze zullen zeker de eerste zes maanden ongevoelig zijn voor infectie. Bij een klein percentage runderen zou later, onder invloed van individuële factoren, de weerstand tekort kunnen schieten. Deze groep is echter klein en het gevaar van besmetting gedurende de stalperiode is gering.

De in het betreffende jaar voor het eerst geënte dieren vormen gedurende de periode van zes tot twaalf maanden na de vaccinatie een minder goed beschermde groep, welke bovendien betrekkelijk talrijk is. Wel worden nog enkele der jonge dieren gedurende het najaar bereikt en deze extra-enting

vormt een maatregel, welke vooral uit een oogpunt van beperking van smetstofverspreiding door deze dieren gunstig genoemd mag worden, maar de meerderheid van het één jaar oude vee zal toch minder goed beschermd zijn.

De in hetzelfde jaar geboren kalveren zijn gedurende ongeveer drie tot vijf maanden resistent, daarna moeten deze dieren echter, behalve de kleine groep welke van eigenaar wisselt of uit anderen hoofde geënt wordt, als geheel gevoelig beschouwd worden.

Naarmate de enting langer geleden is, stijgt het percentage gevoelige kalveren. Het bereikt zijn maximum tegen de volgende voorjaarscampagne en zou dan, volgens de in 1957 gepubliceerde landbouwcijfers van het Landbouw-Economisch Instituut, geschat kunnen worden op 20% van de rundveestapel.

Onze bestrijdingsmaatregelen zullen erop gericht dienen te zijn in de eerste plaats de introductie van smetstof in onze veekoppels te voorkomen.

Hierbij heeft het op het afmaken van smetstofproducerende dieren gebaseerde systeem, zoals dat in binnen- en buitenland wordt toegepast, zich effectief getoond. De voortgezette enting zal daarnaast het aantal gevoelige dieren tot een minimum moeten beperken. Wij moeten hierbij inderdaad streven naar het hoogst bereikbare, daar weliswaar het er alle schijn van heeft dat thans het percentage geïmmuniseerde dieren voldoende is om een grotere verspreiding van de ziekte onder het rundvee — zolang althans geen smetstofstam van afwijkende antigeenstructuur wordt ingevoerd — te voorkomen, maar elk ziektegeval op zich zelf, hoe beperkt ook het aantal aangetaste dieren moge zijn, belangrijke repercussies van economische aard heeft.

Wij kunnen niet hopen de kleine groep minder resistente oudere dieren te bereiken, maar het lijkt wel waarschijnlijk dat een eerste enting van alle jonge dieren op een leeftijd van zes tot zeven maanden in plaats van in het voorjaar, een doeltreffende methode zou zijn om de resistentie van het jongvee in belangrijke mate op te voeren.

Een dergelijke maatregel zou namelijk niet alleen de jongste groep dieren protectie verlenen gedurende de tweede helft van het eerste levensjaar, maar zou bovendien van de volgende voorjaarsenting een revaccinatie maken met overeenkomstige verhoging en verlenging van de verkregen weerstand.

5. Serumtiter en immuniteit

Francis (1947) verdeelt de dierlijke virusziekten naar de opgewekte resistentie en het persisteren van de smetstof in vier groepen. In de eerste plaats onderscheidt hij infecties waarbij het agens aanwezig blijft, de immuniteit echter slechts van tijdelijke aard is. Een tweede groep omvat de aandoeningen waarbij een langdurige resistentie optreedt, hoewel het virus zelf spoedig niet meer aangetoond kan worden. In de derde plaats komen dan de virusziekten, waarbij zowel de smetstof als de ertegen verworven weerstand

slechts korte tijd aantoonbaar blijven en in de vierde plaats de gevallen, waarin infectie en immuniteit zich lange tijd naast elkaar handhaven.

WILSON en MILES (1955) geven in hun bekende boek een overzicht van de zeer grote betekenis van de neutraliserende antistoffen voor de weerstand tegen verschillende virusinfecties.

In vele gevallen berust de specifieke resistentie op de aanwezigheid van immuunlichamen. Deze zijn echter niet altijd aantoonbaar. Zo is volgens TRAUB (1936, 1938) de weerstand tegenover lymphocytaire choriomeningitis bij muizen in vele gevallen gebonden aan de aanwezigheid van smetstof, zonder dat antistoffen aan te tonen zijn.

Voor een praktische betekenis van een "cellulaire" immuniteit, welke ware op te vatten als een verworven, specifieke, niet op humorale factoren gebaseerde resistentie van een bepaald weefselgebied of celsysteem in de door BESREDKA (1937) aangegeven zin, bestaan weinig aanwijzingen. Deze materie is de laatste jaren op tamelijk uitgebreide schaal o.a. door DULBECCO (1956) bestudeerd met behulp van de weefselcultuurtechniek zonder dat de betekenis van een dergelijk mechanisme waarschijnlijk kon worden gemaakt. Vele gevallen waarin een verhoogde lokale weerstand wordt waargenomen, zijn terug te brengen tot een plaatselijk verhoogde antistofconcentratie, welke een gevolg is van produktie ter plaatse.

Algemeen missen de antistoffen het vermogen reeds in de cellen doorgedrongen smetstof te neutraliseren. Er zijn in de literatuur gevallen te over bekend, waarbij een virusinfectie een letaal einde nam, ondanks een inmiddels op gang gekomen antistofproduktie en de reeds bereikte hoge neutraliserende activiteit van de in de circulatie gebrachte afweerstoffen.

Op het tijdstip van de infectie reeds aanwezige immuunstoffen kunnen wèl het ziekteverloop in belangrijke mate beïnvloeden.

In de eerste plaats kan dit het geval zijn, doordat de antilichamen het tot stand komen van de infectie verhinderen door het virus te neutraliseren voordat dit zich met de gevoelige cellen heeft kunnen verenigen. Dit is o.a. waargenomen bij influenzabesmettingen, indien de concentratie der antilichamen op het slijmvlies van de bovenste ademhalingswegen voldoende groot was (BURNET en medewerkers, 1939).

Een tweede mogelijkheid is, dat weliswaar de concentratie der verdedigingsmiddelen bij de porte d'entrée tekortschiet, maar dat verdere verspreiding van de smetstof in het lichaam door de in de circulatie aanwezige immuunstoffen effectief wordt verhinderd, een proces waarbij ook inmiddels nieuw geproduceerde antistoffen een rol kunnen spelen.

Overigens zal het ziekteverloop in belangrijke mate mede bepaald worden door de aard van het infecterend agens. Hierbij zijn factoren als vermeerderingssnelheid, lokalisatie van de aangetaste cellen, invasief vermogen e.d. van betekenis. Zo kan zich bij voorbeeld het geval voordoen, dat een acuut verlopende infectie het afweermechanisme geen tijd laat een versnelde antistofproduktie voldoende op gang te brengen, nadat eventueel reeds aanwezige

immuunlichamen tekortschoten (SCHLESINGER, 1949). Aan het andere uiterste staan smetstoffen, welke zich kunnen vermeerderen in weefsels die een minder goede antistofvoorziening hebben, daardoor mogelijk wel in staat zijn een infectie tot stand te brengen, maar dikwijls ten gevolge van kleine hoeveelheden circulerende immuunlichamen niet de gelegenheid krijgen zich haematogeen te verspreiden.

BEVERIDGE (1952) wijst er op, dat de in FRANCIS' derde groep ingedeelde virussen zich gedragen volgens dit laatste patroon. Een typische vertegenwoordiger van deze groep is het herpes-virus, dat zich zeer lang aan de periferie van het lichaam kan handhaven, ondanks hoge antistofconcentraties van het serum. Vermoedelijk speelt hierbij de, in weefselcultuur waargenomen, verspreiding van dit agens van cel tot cel een rol (BLACK en MELNICK, 1955). Ook in vitro vermogen in het milieu aanwezige specifieke immuunlichamen niet het voortschrijden van de celdegeneratie ten gevolge van infectie te beperken.

Bij de kunstmatige infectie van runderen met mond- en klauwzeervirus door intradermolinguale injectie doet zich vermoedelijk een enigszins overeenkomstige situatie voor.

Bij deze wijze van besmetten wordt het virus direct in het gevoelige tongslijmvlies geïnjicieerd, zodat de cellen daarvan rechtstreeks aan de smetstof worden blootgesteld. Uit de ervaringen van vele onderzoekers blijkt, dat bij een dergelijke infectie bij vrijwel alle gevoelige dieren en ook bij vele gevaccineerde runderen op de entingsplaats een typische mond- en klauwzeerblaar ontstaat.

Volgens de door WALDMANN (1939) geformuleerde opvattingen vindt ook de natuurlijke besmetting plaats via de digestietractus, en wel voornamelijk via het epitheel van de mondholte. De eerste afwijkingen zouden voornamelijk voor en naast de tongwrong gelokaliseerd zijn. In dit stadium van de ziekte kan nog geen storing van het algemeen welzijn worden vastgesteld. Van de primaire laesie uit volgt dan verdere verspreiding in het lichaam o.a. via de bloedbaan.

KORN (1957) voert in een recente publikatie waarnemingen aan, welke erop zouden kunnen wijzen dat bij de natuurlijke infectie de primaire virusvermeerdering hoofdzakelijk in het neusslijmvlies plaatsvindt. Het virus zou de bloedstroom via de lymfvaten bereiken. De vorming van blaren op de andere praedilectieplaatsen zou afhankelijk zijn van het afweervermogen van het lichaam. In de mondholte zou bij de natuurlijke infectie geen primaire blaar optreden. Deze opvatting is voornamelijk gebaseerd op de waarneming, dat bij 24 van de 51 via de neusspiegel geïnfecteerde proefrunderen gedurende het incubatiestadium virus in het slijmvlies van neusholte, sinus of trachea kon worden aangetoond, terwijl gelijktijdig verricht onderzoek van het epitheel van de tong negatief uitviel. Ze is moeilijk te rijmen met het feit dat bij onder natuurlijke omstandigheden optredende immuniteitsdoorbraken bij gevaccineerde runderen de frequentie van laesies van de mondholte belangrijk hoger

ligt dan die van klauwafwijkingen, tenzij men aanneemt dat voor infectie van het mondslijmvlies een belangrijk kleinere hoeveelheid haematogeen aangevoerde smetstof nodig zou zijn dan voor de infectie van het eveneens gevoelige epitheel van de extremiteiten. Aanwijzingen welke deze hypothese zouden kunnen steunen, zijn ons niet bekend.

Bij de gebruikelijke methoden van kunstmatige besmetting wordt de virussuspensie per os geïntroduceerd. De ontwikkeling van de specifieke laesies in de mondholte is zijdelings afhankelijk van de concentratie van de in de circulatie aanwezige antistoffen en wordt direct beïnvloed door die, welke in het epitheel aanwezig zijn. Experimenteel konden met de door ons gebruikte methode in speeksel van immune dieren geen thermostabiele antilichamen worden aangetoond. Behalve de in het serum circulerende immuunlichamen, zouden ook "gefixeerde" antilichamen het verloop van de infectie van mond- en pensslijmvlies door virus dat van het lumen uit penetreert, kunnen beïnvloeden. De waarnemingen van Beck en Zimmermann (1954) betreffende het o.a. met oedeem van de tong gepaard gaande optreden van anafylaxie bij geënte of doorgeziekte runderen, kunnen als indicatie voor het voorkomen van dergelijke antistoffen worden opgevat. De resultaten verkregen met geëxplanteerd tongweefsel van recent gevaccineerde dieren demonstreren een betrekkelijke resistentie van dit weefsel tegen infectie in vitro, welke ongedwongen verklaard kan worden door te veronderstellen dat antistoffen in de oppervlakkige epitheellagen aanwezig zijn.

Hun activiteit is vooral korte tijd na de revaccinatie waarneembaar, ze verdwijnt echter betrekkelijk spoedig.

Bij de generalisatie via de bloedbaan treedt de betekenis van de in de circulatie aanwezige antistoffen nog duidelijker op de voorgrond dan bij de bestrijding van een locale infectie. De factoren welke laatstgenoemde fase van het ziekteverloop bepalen zijn moeilijker te overzien dan die, welke van invloed zijn bij de haematogene verspreiding, hoewel ook deze niet geheel bekend zijn.

In het algemeen geldt dat bij smetstofinjectie in het tongepitheel, de lokale immuniteit aan de porte d'entrée eerder tekortschiet dan die afweermiddelen, welke de haematogene verspreiding tegengaan.

Teneinde vast te stellen in hoeverre er een parallel bestaat tussen de titer der virusneutraliserende antistoffen in het serum en de resistentie van het betreffende dier tegen besmetting, een parallel welke bij verschillende andere door filtreerbare smetstoffen veroorzaakte ziekten is waargenomen, werd van een aantal groepen gevaccineerde runderen, alsmede van een aantal niet-gevaccineerde controledieren, kort voor de infectie een serummonster afgenomen. Dit werd na inactivering op de gebruikelijke wijze in de verdunning 1/10 onderzocht.

In het totaal waren voor deze 3 proeven 270 dieren beschikbaar, waaronder geen lacterende melkkoeien. 38 runderen waren niet gevaccineerd.

Bij verschillende wel geënte dieren was deze ingreep niet steeds even lang

TABEL 50. Overzicht van in de besmettingsproeven gebruikte runderen

Proef-nummer	Aantal geënte dieren	Herkomst	Aantal controle-dieren	Aard van de enting	Tijd verlopen sedert enting	Aantal vaccinaties	Virus-type	Wijze van besmetten
12 a	12	H[3]	3	trival.	21 — 113 d.	meerdere – *several*	O	2% suspensie met lap
b	12	I[4]	—[5]	monov.	15 — 22 w.	1 of / *or* 2	O	2% suspensie met lap
c	21	H	3	trival.	26 — 34 w.	1 of / *or* 2	O	2% suspensie met lap
d	23	I	4	monov.	14 d.	1	O	2% suspensie met lap
e	16	I	4	monov.	14 d.	1	O	2% suspensie met lap
f	20	I	4	monov.	14 d.	1	O	2% suspensie met lap
13 a	16	H	—[5]	trival.	141 — 206 d.	meerdere – *several*	O	0,3 ml 5% susp., i.d.[6] injectie *injection*
b	10	H	4	trival.	17 w.	2	O	0,2 ml 1% susp., i.d. injectie *injection*
c	5[2]	H	1	trival.	11 w.	1	O	0,2 ml 1% susp., i.d. injectie *injection*
d	24	I	—[5]	monov.	18 w.	1	O	0,2 ml 0,5% susp., i.d. injectie *injection*
e	—	H	5	—	—	—	O	0,2 ml 0,5% susp., i.d. injectie *injection*
14 a	19	I	2	trival.	18 w.	1 of / *or* 2	O	10^4 ID_{50} in 0,3 ml i.d. injectie *injection*
b	10	I	2	monov.	14 d.	1	C	10^3 ID_{50} in 0,3 ml i.d. injectie *injection*
c[1]	24	I	3	monov.	14 d.	1	O	10^3 ID_{50} in 0,3 ml i.d. injectie *injection*
d	21	I	2	monov.	14 d.	1	O	10^3 ID_{50} in 0,3 ml i.d. injectie *injection*
Number of test	*Number of vaccinated animals*	*Origin*	*Number of unvaccinated controls*	*Vaccination*	*Time elapsed since vaccination*	*Number of vaccine injections*	*Type of virus*	*Method of exposure*

2% suspension administered by swabbing the mouth

1 Neutralisatieproef uitgevoerd met 1.0 log verdunningsinterval — *Neutralization test carried out with 1.0 log interval.*
2 Een van deze dieren werd slechts "met de lap" besmet — *One of these animals was challenged by swabbing the mouth.*
3 Nederlands runderen — *Dutch cattle.*
4 Geïmporteerde Ierse runderen — *Imported Irish cattle.*
5 Sera van controlerunderen niet onderzocht — *The sera of the unvaccinated controls were not tested in this case.*
6 i.d. = intradermale injectie in het tongslijmvlies — *Intradermolingual injection.*

TABLE 50. *Data on cattle used in challenge experiments*

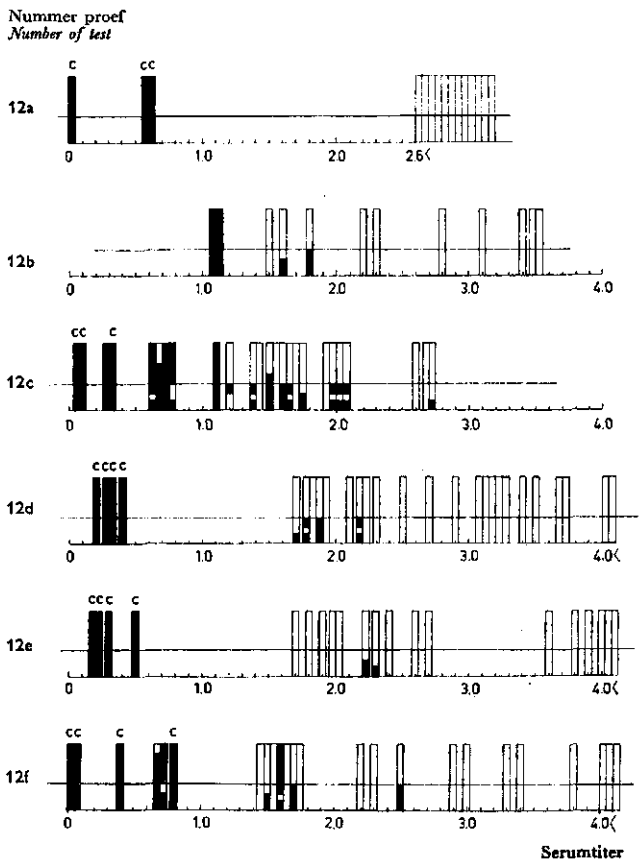
tevoren geschied, terwijl een deel ervan ook herhaaldelijk geënt was, hetzij monovalent, hetzij trivalent.

Tabel 50 geeft een overzicht van deze details voor de drie volgende proeven.

Zoals hieruit blijkt, werden drie verschillende infectiemethoden onderzocht. In alle gevallen werd gebruik gemaakt van slechts in runderen voortgeënt materiaal van de, voor de vaccinbereiding, aan weefselcultuur geadapteerde virusstammen.

Het voor een proefinfectie benodigde virus werd verkregen door bij -30° C bewaarde smetstof intradermaal in de tong van meerdere gevoelige dieren in te spuiten. Het virus werd circa 24 uur post infectionem geoogst, het werd in bevroren toestand in gebufferde glycerol bewaard tot het gebruik.

FIG. 30. Resistentie van runderen met verschillende serumtiters tegen infectie door inwrijven van de mondholte met een in virussuspensie gedrenkte lap



Elk zuiltje stelt een proefrund voor. De uitbreiding van de mond- en klauwzeerafwijkingen is aangegeven door voor elk aangetast weefsel of lichaamsdeel een blokje zwart te maken. Hiervoor is het volgende schema gebruikt:

7 1 Beperkte afwijking op
6 de tong.
5 2 Uitgebreide tonglaesie.
4 3 Defecten aan verhemelte, lippen en/of pens.
3
2 4
1 5 } Afwijkingen aan ex-
6 } tremiteiten.
6
7

c = ongeënt rund.

One column is used for each animal. The degree of involvement is recorded by blackening squares for the affected tissues according to the following arrangement.

1 Local lesion on the tongue.
2 Extensive tongue lesions.
3 Vesicles formed on palate, lips, dental pad and/or rumen.
4 5 6 7 } Foot lesions.

c = Non-vaccinated control.

FIG. 30. *Resistance against challenge by swabbing the mouth with a towel drenched in a virus suspension, in cattle with different levels or neutralizing antibody*

Proef 12. De resistentie van runderen met uiteenlopende antistoftiters tegen besmetting door inwrijven van virus in de mondholte

De besmetting "met de lap" werd uitgevoerd door de mondholte van de dieren in te wrijven met een doek gedrenkt in een 2% suspensie van het virulente materiaal in fosfaatbuffer van pH 7,5. Met deze methode werden totaal 122 dieren besmet, waaronder 18 niet-gevaccineerde.

Bij alle runderen werd tweemaal per dag de temperatuur bepaald; ze werden geregeld geobserveerd en dagelijks geïnspecteerd. De sectie vond een week na de infectie plaats.

Fig. 30 geeft een overzicht van de mond- en klauwzeerveranderingen welke gevonden werden bij dieren met verschillende serumtiters.

Zowel bij de runderen welke kort tevoren geënt waren, als bij de andere dieren, bleek er een nauw verband te bestaan tussen de serumactiviteit in vitro en het optreden van generalisatielaesies aan de klauwen. Bij alle dieren welke een titer van kleiner dan 1,2 hadden, traden zowel in de mondholte als aan de extremiteiten uitgebreide afwijkingen op. Hieronder waren alle ongeënte controles. Slechts twee van de 94 runderen met een titer van 1,2 of hoger, toonden klauwafwijkingen en deze bleven in één geval beperkt tot één van de achtervoeten. Beide dieren hadden een titer van 1,5. De invloed van de in het serum gevonden antistoffen op de uitbreiding van de laesies in de mondholte, treedt minder duidelijk aan het licht. Geen van de runderen met een titer van 3,0 of meer vertoonde monddefecten, terwijl van de 66 dieren met titers variërend van 2,0 tot 3,0 er zeven min of meer uitgebreide veranderingen hadden. Naarmate de serumtiter afnam werd het aantal dieren met mondafwijkingen groter, zonder dat er echter een scherpe overgang was aan te geven.

Er bestond in dit opzicht verschil tussen de groepen onderling, zonder dat er een duidelijk verband aanwezig was met de leeftijd van de proefdieren of de tijd verlopen tussen enting en infectie.

De verschillende groepen vertonen een groot leeftijdsverschil, terwijl ook het aantal ontvangen vaccininjecties uiteenliep. Groep 3 omvatte de jongste dieren, welke bovendien het langst geleden geënt waren.

Proef 13. Serumtiter en weerstand tegen smetstoftoediening door intradermolinguale injectie van een onbekende virusdosis

In deze serie experimenten werd de infectie uitgevoerd door één intradermale injectie van 0,2 ml van een niet tevoren getitreerde, in de regel ½- of 1-procentige, smetstofsuspensie in de tong.

Slechts in een geval werd een hogere concentratie gebruikt, namelijk 5%. Er werden in totaal 65 dieren, verdeeld over 5 groepen, met behulp van deze methode onderzocht; 10 van deze runderen waren niet gevaccineerd. De

FIG. 31. Resistentie van runderen met verschillende serumtiters tegen infectie door intradermale injectie van een niet-getitreerde virusdosis in het tongslijmvlies

Elk zuiltje stelt een proefrund voor. De uitbreiding van de mond- en klauwzeerafwijkingen is aangegeven door voor elk aangetast weefsel of lichaamsdeel een blokje zwart te maken. Hiervoor is het volgende schema gebruikt:

7 1 Beperkte afwijking op
6 de tong.
5 2 Uitgebreide tonglaesie.
4 3 Defecten aan verhemelte, lippen en/of pens.
3
2 4
1 5 } Afwijkingen aan ex-
6 } tremiteiten.
7

c = ongeënt rund.

* Dit kalf werd alleen met de lap besmet.

One column is used for each animal. The degree of involvement is recorded by blackening squares for the affected tissues according to the following arrangement.

1 Local lesion on the tongue.
2 Extensive tongue lesions.
3 Vesicles formed on palate, lips, dental pad and/or rumen.
4
5 } *Foot lesions.*
6
7

c = Non-vaccinated control.

* *This calf was only exposed by swabbing the mouth.*

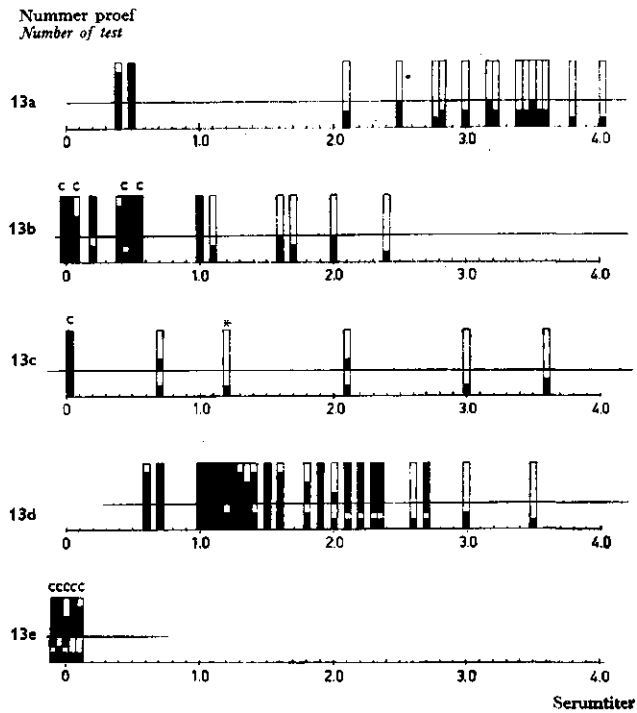


FIG. 31. *Resistance against challenge by intradermolingual injection of an unknown dose of virus, in cattle with different levels of neutralizing antibody*

onderdelen 13 b, c en e (tabel 50) hadden betrekking op kalveren. De proefdieren werden behandeld als die van proef 12.

Fig. 31 geeft een overzicht van de resultaten van deze infectieproeven.

Indien men de grafiek beschouwt, valt in de eerste plaats op, dat alle op deze wijze besmette dieren bij sectie een defect op de injectieplaats, het tongslijmvlies, vertoonden. Alle ongeënte runderen hadden verder klauwafwijkingen.

Wat betreft de resistentie van de gevaccineerde dieren tegen generalisatie liepen de verschillende groepen belangrijk uiteen. In twee van de groepen, nl. 13 a en b, welke totaal 26 geënte dieren bevatten, vertoonde geen van de runderen met een titer van 1,1 of hoger, klauwafwijkingen.

Groep c van deze proef had slechts betrekking op vier gevaccineerde

dieren. Een hiervan had een klein defect in een van de tussenklauwspleten, bij een serumtiter van 2,1.

In groep d van deze proef trad generalisatie op bij alle runderen met titers van lager dan 2,5.

Het is niet waarschijnlijk dat bij het tot stand komen van dit resultaat de leeftijd van de runderen een doorslaggevende factor was, aangezien de proefdieren van deze groep in dit opzicht vergelijkbaar waren met die van groep a.

Het ligt voor de hand de oorzaak van de ongelijke uitkomsten van verschillende experimenten in de eerste plaats te zoeken in de gebruikte smetstof, nl. het ingespoten aantal infectieuze eenheden. Een ongelijk virusgehalte van de op verschillende dagen voor infectie gebruikte weefselsuspensie is zeer wel mogelijk, aangezien deze bereid werd uit kleine hoeveelheden blaarwand, welke aanzienlijk in smetstofconcentratie zouden kunnen uiteenlopen.

Teneinde de betekenis van de ingespoten virushoeveelheid aan een nader onderzoek te onderwerpen, werd in een viertal volgende proeven een bekend aantal ID_{50} intradermaal in de tong geïnjicieerd. In dit geval werd het O-virus verkregen door het na 24 uur van een tweetal intradermaal besmette gevoelige runderen geoogste materiaal te verzamelen. Dit weefsel werd met de schaar verkleind en vervolgens met behulp van een BÜHLER-homogenisator gesuspendeerd in drie volumina fosfaatbuffer, waaraan een half volume geinactiveerd serum van een gevoelig rund was toegevoegd. Vervolgens werd deze vloeistof, terwijl de weefselresten in suspensie werden gehouden met behulp van een magnetisch roerapparaat, over een aantal 5-ml-flesjes verdeeld. Nadat deze met een schroefdop waren gesloten, werden ze, om de inhoud snel af te koelen, in een koudmakend mengsel van $\pm$ —18° C geplaatst. Bij vergelijkende titraties bleek de op deze wijze bewaarde smetstof minstens een half jaar een constante infectiositeit te bewaren.

De titratie van de voor runderen te gebruiken smetstof werd uitgevoerd door een flesje te ontdooien, 1,0 ml van de inhoud bij 9,0 ml verdunningsvloeistof te voegen en dit volume gedurende 10 minuten bij 3000 rpm te centrifugeren. De bovenstaande vloeistof werd opgevat als de verdunning 10^{-1}; hiervan uitgaand werden de verdunningen 10^{-5}, 10^{-6} en 10^{-7} bereid. Deze werden volgens de methode van HENDERSON (1949) getitreerd op de tongen van twee gevoelige Ierse runderen. Elk dier ontving 5 injecties van elke verdunning. Uit de proefuitkomsten werd een titratie-eindpunt berekend van $10^{-5,8}$, hetgeen neerkomt op ongeveer 6 800 000 ID_{50} per ml.

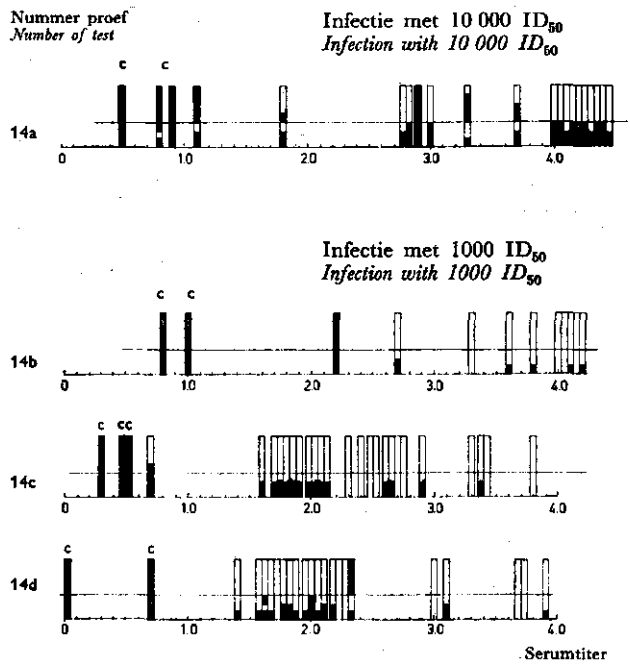
Bij de eerste proef werd per dier 10 000 ID_{50} in een volume van 0,3 ml intradermaal in de tong ingespoten.

Er waren voor deze proef 21 kalveren beschikbaar, waarvan er twee niet geënt waren. Al deze proefdieren ontwikkelden blaren op de injectieplaats. Zoals uit fig. 32 blijkt toonden de beide controles, alsmede twee geente dieren met titers van resp. 1,1 en 0,9 en één met een titer van 2,9, bij de sectie laesies aan alle vier extremiteiten. Klauwafwijkingen werden even-

FIG. 32. Resistentie van runderen met verschillende serumtiters tegen infectie door intradermale injectie van bekende virusdoses in het tongslijmvlies

Elk zuiltje stelt een proefrund voor. De uitbreiding van de mond- en klauwzeerafwijkingen is aangegeven door voor elk aangetast weefsel of lichaamsdeel een blokje zwart te maken.

Hiervoor is het volgende schema gebruikt:



7 1 Beperkte afwijking op
6 de tong.
5 2 Uitgebreide tonglaesie.
4 3 Defecten aan verhemelte, lippen en/of pens.
3
2 4
1 5 } Afwijkingen aan extremiteiten.
6 }
7 }

c = ongeënt rund.

One column is used for each animal. The degree of involvement is recorded by blackening squares for the affected tissues according to the following arrangement.

1 Local lesion on the tongue.
2 Extensive tongue lesions.
3 Vesicles formed on palate, lips, dental pad and/or rumen.
4
5 } *Foot lesions.*
6
7

c = non-vaccinated control.

FIG. 32. *Resistance against challenge by intradermolingual injection with various quantities of virus, in cattle with different levels of neutralizing antibody*

eens vastgesteld bij een drietal runderen, welke titers van 3,7, 3,3 en 1,8 hadden. In dit geval waren slechts resp. 2, 3 en 1 voet aangetast. Alle dieren met titers van hoger dan 4,0, twee met waarden van 2,8 en één met 3,0, hadden geen klauwaandoening.

Bij dit experiment was er dus geen scherpe grens tussen de serumtiters welke voldoende waren voor bescherming tegen generalisatie en die, welke in dit opzicht tekortschoten.

Proef 14. Serumtiter en weerstand tegen smetstoftoediening door intradermolinguale injectie van een bekende virusdosis

Een scherpe overgang ontbrak ook in enkele later uitgevoerde experimenten, waarbij slechts 1000 ID_{50} werden geïnjicieerd. Totaal waren 62 dieren

hiervoor beschikbaar, waarvan 7 niet-gevaccineerde. Een van deze proeven werd uitgevoerd met C-virus. De daarbij voor de infectie gebruikte smetstofsuspensie werd bereid op overeenkomstige wijze als die toegepast bij het eerder beschreven onderzoek met het O-type. In deze drie proeven werden slechts veertien dagen tevoren monovalent geënte runderen gebruikt.

Zoals uit fig. 32 blijkt, trad ook bij gebruik van deze kleinere virusdosis bij alle ongeënte controles generalisatie op. Van de 55 gevaccineerde dieren vertoonden er zeventien bij de sectie geen zichtbare reactie op de injectieplaats. In de regel waren dit dieren met hogere serumtiters, hoewel ook bij enkele van deze laatste tongafwijkingen voorkwamen.

Generalisatie trad slechts op bij 3 van de gevaccineerde runderen nl. bij dieren met titers van resp. 0,7, 2,2 en 2,3. Alle runderen met serumtiters liggend boven deze laatste waarde bleken beschermd tegen generalisatie; dit was echter ook het geval bij vele runderen waarbij een aanzienlijk lagere waarde was vastgesteld.

Bespreking

Alvorens nog nader in te gaan op de resultaten van deze proeven, willen wij er op wijzen dat het gebruikte rundermateriaal zeer heterogeen was.

Een groot deel van de beschikbare Ierse runderen waren droogstaande oudere koeien. Daarnaast werd een aantal ossen gebruikt. De Nederlandse runderen waren eveneens oudere melkkoeien, maar sommige proeven werden uitgevoerd met jongvee.

Het gebruik van dit zeer uiteenlopende diermateriaal bood het nadeel dat de vergelijkbaarheid van verschillende proeven twijfelachtig is. Het temperatuurverloop bood soms weinig informatie aangaande de ontwikkeling van de mond- en klauwzeerinfectie. Terwijl enerzijds dikwijls dieren welke bij sectie slechts lokale afwijkingen bleken te hebben, belangrijke en langdurige temperatuurverhoging, b.v. ten gevolge van mastitis, vertoonden, werden in andere gevallen gedurende de gehele observatieperiode geen febriele temperaturen waargenomen, hoewel bij sectie toch uitgebreide klauwlaesies bleken te bestaan.

Een klein voordeel van het gebruik van een heterogeen proefdiermateriaal was wellicht, dat een ruimer indruk van de praktische bruikbaarheid van de antilichaamtiter van het serum voor de waardering van de resistentie werd verkregen, dan het geval zou zijn geweest indien meer geselecteerde runderen waren gebruikt.

Het begrip generalisatie wordt door verschillende auteurs ongelijk omschreven.

Terwijl men enerzijds de mening aantreft dat bij besmetting door injectie elke uitbreiding buiten de primaire laesie als generalisatie dient te worden

opgevat, menen andere onderzoekers dat slechts het optreden van klauwafwijkingen wijst op onvoldoende weerstand van het betreffende proefdier.

Speciaal ten gevolge van de eraan verbonden consequenties bij de waardebepaling van vaccins, heeft een dergelijk verschil in beoordeling praktische betekenis. Bij besmetting "met de lap" worden ook de tongafwijkingen niet steeds gelijk gewaardeerd.

Uit ons onderzoek blijkt dat indien de proefinfectie plaats vindt door injectie in het tongslijmvlies, het in de eerste plaats de smetstofdosis is welke, tezamen met individuele factoren, de uitgebreidheid van het primaire defect bepaalt. Bij gebruik van 1000 ID_{50} ontbrak bij een aantal runderen met hogere antistoftiters de primaire blaar geheel. Werd een veel grotere smetstofdosis toegediend en dit was zonder twijfel het geval indien een half- of éénprocentige weefselsuspensie werd gebruikt, dan ontstond steeds een slijmvliesdefect op de injectieplaats.

Bij de infectie "met de lap" was het percentage runderen, waarbij na één week in het geheel geen pathologische veranderingen waren vast te stellen, nog groter dan wanneer een hoeveelheid van 1000 ID_{50} werd geïnjicieerd.

Zowel bij de groep welke door inwrijven van de mondholte werd besmet, als bij de door injectie geïnfecteerde runderen, bestond een betere correlatie tussen de serumtiter en het ontbreken van klauwafwijkingen dan tussen antistofgehalte en generalisatieverschijnselen "in ruimere zin". Dit verschil trad zowel aan het licht bij vergelijking van dieren binnen een groep, als bij vergelijking van verschillende groepen onderling. Het kan slechts toegeschreven worden aan het optreden van niet controleerbare, bij verschillende dieren ongelijk werkzame factoren.

Wij menen daarom op grond van deze waarnemingen slechts klauwafwijkingen te moeten accepteren als criterium voor generalisatie.

Dat het verband tussen het optreden van specifieke slijmvliesveranderingen aan verhemelte en pens en de serumtiter minder duidelijk is, dan dat tussen titer en klauwafwijkingen, is begrijpelijk. Laatstgenoemde veranderingen zullen uitsluitend tot stand kunnen komen na passage van het virus via de bloedbaan.

Infectie van verhemelte, lippen en pensslijmvlies kan langs dezelfde weg plaats vinden. Noodzakelijk is dit echter niet, daar ook een meer directe besmetting mogelijk is via de kortere weg door mondholte en slokdarm. Hoewel ook bij deze vorm van disseminatie de beschermende werking van antistoffen zich kan doen gelden bij het binnendringen van de smetstof, is het virus toch gedurende een deel van het transport hiertegen gevrijwaard. Wel kunnen bij deze fase van de verspreiding meer van het toeval afhankelijke factoren, als slijmvliesdefecten, verdunning en chemische en fysische invloeden een belangrijke rol spelen.

Van de voor besmetting gebruikte virusdosis mag verwacht worden dat deze het ziekteverloop beïnvloedt. Infectie van een groter aantal cellen zal kunnen leiden tot produktie van een groter kwantum virus. Hierdoor zal meer smetstof in de circulatie terecht komen, zodat het afweersysteem dus zwaarder

belast wordt dan indien aan de porte d'entrée minder smetstof ware geproduceerd. Verder verhoogt het vrijkomen van meer smetstof in de mondholte ook de kans dat secundaire blaarvorming op het palatum en in de pens plaats vindt. De primaire virusvermeerdering aan de porte d'entrée staat vanzelfsprekend wederom onder invloed van immuunstoffen, die uit de circulatie in het tongepitheel diffunderen. Dit proces is echter moeilijk te overzien en onze proefuitkomsten suggereren dat er geen eenvoudig, min of meer kwantitatief verband is aan te tonen tussen serumtiter, virusproduktie op de injectieplaats en uitbreiding van de primaire laesie.

Het ontbreken van een overeenstemming tussen resistentie en serumtiter, dat bij een aantal individuen werd waargenomen en dat in onze gevallen neerkomt op het tekortschieten van de immuniteit bij dieren met betrekkelijk grote hoeveelheden antilichamen in de circulatie, zou meerdere oorzaken kunnen hebben.

In de eerste plaats denken wij hierbij aan een onjuiste uitslag van de titerbepaling. Zoals in een eerder hoofdstuk vermeld, moet bij de neutralisatieproef gerekend worden met een standaardafwijking van de grootte-orde van 0,2 tot 0,3 log. Een te hoge schatting zou dus wel in de grafiek een enigszins verkeerde voorstelling van zaken ten gevolge kunnen hebben.

Als andere factoren welke mogelijk van invloed zouden kunnen zijn, moeten genoemd worden:

a. de gezondheidstoestand van het dier,
b. mechanische oorzaken en
c. hormonale invloeden.

De algemene gezondheidstoestand van het rund kan van invloed zijn op het verloop van een mond- en klauwzeerinfectie. Het mechanisme van dit proces is niet bekend, de waarneming dat cachectische dieren een verminderde gevoeligheid aan de dag leggen, is echter door verschillende auteurs vermeld (RÖHRER en PYL, 1958). Met de mogelijkheid dat een verhoogde gevoeligheid zou kunnen bestaan bij in zeer goede conditie verkerende runderen, dient rekening gehouden te worden. Er zijn verschillende praktijkwaarnemingen die in deze richting wijzen, de experimentele bevestiging ontbreekt echter.

Volgens MAITLAND (1928) kan het ontstaan van blaren aan de pootjes van caviae voorkomen worden door de dieren te verhinderen erop te lopen of te rusten. Experimenten in deze richting uitgevoerd met grote proefdieren zijn ons niet bekend, hoewel enkele praktijkwaarnemingen wel voor de invloed van een factor als lichaamsgewicht pleiten. Zo verlopen dikwijls de klauwaandoeningen bij jonge dieren minder ernstig dan bij volwassen individuen. Een zelfde mechanisme zou ten grondslag kunnen liggen aan het dikwijls goedaardige verloop van de mond- en klauwzeerinfectie bij verschillende exotische runderrassen.

Hormonale factoren, met name bijnierschorsprodukten, kunnen snelle verhogingen van de antistoftiters van proefdiersera veroorzaken, zoals blijkt uit de onderzoekingen van DOUGHERTY en WHITE (1947) en HAMMON en NOVAK (1950).

Ook een invloed van geslachtshormonen op de weerstand tegen infectie is door meerdere onderzoekers beschreven. Over de frequentie waarmede titerschommelingen onder natuurlijke omstandigheden voorkomen en met betrekking tot de graad van verandering, welke als gevolg van een fysiologische reactie kan optreden, is niets bekend. Een dergelijke hormonale activiteit zou zowel oorzaak kunnen zijn van een geflatteerde uitkomst van de neutralisatieproef, als van een hogere weerstand dan de uitslag van de in vitro uitgevoerde reactie zou doen verwachten.

Ook zonder het optreden van een uitzonderlijke reactie zal enige verandering in het antistofgehalte van de sera kunnen plaatsvinden tussen het moment waarop serum afgenomen werd of infectie plaatsvond en het ogenblik waarop het afweersysteem door het in de circulatie verschijnende virus op de proef werd gesteld. Dit verschil zal het meest uitgesproken zijn indien dit tijdsverloop lang is en valt in een periode waarin de serumtiter zich snel wijzigt, dus bij infectie "met de lap" en bij kort geleden geënte dieren.

Het is hier niet mogelijk uit te maken of, en zo ja, welke van genoemde mogelijkheden praktisch van belang zijn. Het ontbreken van een absoluut verband tussen antilichaamtiter en resistentie tegen infectie, ook bij gevaccineerde runderen, is in de laatste tijd door verschillende onderzoekers vermeld (MACKOWIAK en LANG, 1958, WILLEMS, TRAUB, KOMAROV en SCHNEIDER, 1958), hoewel de, in de regel niet in details gepubliceerde, in verschillende laboratoria opgedane ervaringen uiteenlopen.

De wisselwerking tussen smetstof en afweermiddelen is een uitermate gecompliceerd proces, waarin onze inzichten nog zeer beperkt zijn en waarbij zonder twijfel talrijke, voor verschillende individuen niet in gelijke mate werkzame factoren zich kunnen doen gelden.

Over het geheel menen wij echter te mogen vaststellen dat een voldoend hoge serumtiter een belangrijke garantie biedt voor resistentie tegen kunstmatige besmetting. In een zeker percentage van de gevallen treden echter miswijzingen op.

SAMENVATTING

Bij de waardering van de immunisatietoestand van de rundveestapel en bij het onderzoek van mond- en klauwzeerentstoffen met behulp van runderen, bleef in het verleden het gebruik van serologische methoden tot enkele incidentele gevallen beperkt.

Het ontwikkelen van een eenvoudige methodiek en het demonstreren van de waarde van de ermee verkregen resultaten was het doel van dit proefschrift.

Gezien de uitkomsten verkregen, zowel door het mond- en klauwzeeronderzoek als bij de bestudering van andere virusziekten, leek de verwachting gewettigd dat een methode welke de virusneutraliserende antistoffen aantoonde, het meest waardevol zou blijken voor het beoordelen van de entingsresultaten. Verder werd gemeend dat, mede in verband met de aan het gebruik van verschillende andere proefsystemen verbonden nadelen, aan de door BROOKSBY en WARDLE in 1953 beschreven werkwijze voor dit onderzoek de voorkeur moest worden gegeven boven andere in aanmerking komende methoden.

Deze techniek, welke overlevend rundertongepitheel gebruikt als substraat voor de virusvermeerdering en aan het einde van de incubatieperiode het in de cultures gevormde virus aantoont met behulp van de complementbindingsreactie, bleek ook bruikbare resultaten te leveren indien weefsel van immune dieren werd gebruikt. Bij de toegepaste proefopstelling werden tevoren geïnactiveerde rundersera in een constante verdunning van 1/10 onderzocht tegenover verschillende concentraties van een tegelijkertijd getitreerde virussuspensie. De serumtiter werd uitgedrukt als de logaritme van het aantal door de onderzochte verdunning geneutraliseerde ID_{50}.

Verschillende modificaties van de proefopstelling werden aan een nader onderzoek onderworpen. Indien de serum-virusmengsels gedurende één uur bij 25° C werden geïncubeerd, bleek de serumactiviteit vrijwel optimaal te zijn. Bij voortgezette serumverdunning neemt de hoeveelheid geneutraliseerd virus relatief sterk af; de helling van de lijn welke het verband tussen de log van de serumverdunning en de log van het aantal geneutraliseerde ID_{50} geeft, bedraagt ongeveer 1,4. Het weefsel, alsmede de gebruikte virussuspensie, bleken de oorzaken te kunnen zijn van belangrijke verschillen tussen de uitkomsten van op onderscheiden dagen uitgevoerde proeven.

Voor een goede reproduceerbaarheid van de proefresultaten, bleek het gewenst één enkele, bij —30° C bewaarde, smetstofsuspensie voor een zo groot mogelijk aantal experimenten te gebruiken. Daarnaast bleek door het routinegebruik van een controle-immuunserum, correctie mogelijk van de variabiliteit ten gevolge van verschillen in weefselgevoeligheid, welke met de immunisatie samenhangen. Bij het onderzoek dat tot deze conclusie leidde, werd vastgesteld dat het weefsel de titers van verschillende gelijktijdig

onderzochte sera wel in gelijke richting, doch in ongelijke mate beïnvloedt. Het gebruik van epitheel van gevoelige dieren biedt daarom verschillende voordelen.

Het onderzoek werd voornamelijk uitgevoerd met smetstof van het O-type.

Sera van niet-geënte gevoelige dieren vertoonden zelden titers hoger dan 0,5.

Bij volwassen dieren welke met het in de praktijk gebruikte vaccin werden geënt, waren in de regel een week na de eerste vaccinatie antilichamen aantoonbaar. Maximale waarden, variërend van 2,0 tot 5,0, werden na twee tot vijf weken gevonden. Na achttien weken werden serumtiters van 0,8 tot 3,2 aangetroffen. Bij alle proeven bleken er belangrijke verschillen te bestaan tussen op gelijke wijze behandelde runderen. Deze manifesteerden zich zowel in de snelheid waarmede bij verschillende dieren de immuunstoffen uit de circulatie verdwenen, als in de maximaal bereikte titers. Dergelijke individuele verschillen in reactie op eenzelfde vaccin doen twijfelen aan de waarde van met kleine aantallen runderen verkregen proefresultaten.

Bij een groep van vier runderen welke met 60 ml O-vaccin werden geënt, lag de maximaal bereikte titer gemiddeld wel hoger dan bij een tegelijkertijd met de gebruikelijke dosis van 15 ml geënte controlegroep; in het verdere verloop van deze proef bleef dit verschil echter niet gehandhaafd.

Na revaccinatie trad een typische secundaire reactie op; de serumtiters stegen snel, zodat na één week reeds waarden gevonden werden welke ver boven het maximum lagen dat na één injectie werd bereikt; de antistoffen persisteerden langer dan na een primovaccinatie.

Met behulp van twee groepen van twaalf dieren werd het effect van toediening van de gebruikelijke dosis antigeen in een sterk verminderde hoeveelheid aluminiumhydroxyde onderzocht. Na injectie van het normale vaccin bereikten de meeste hiermee behandelde dieren een hogere titer dan de leden van de groep welke met de geconcentreerde entstof was gevaccineerd. Deze verhouding bleef bestaan gedurende de gehele achttien weken welke de proef duurde.

Kalveren van geïmmuniseerde moeders bleken zonder aantoonbare immuunstoffen ter wereld te komen. Ze namen deze echter met het colostrum op. De antilichamen konden, afhankelijk van de titer van het serum van de moeder, op een leeftijd van twee tot zes maanden nog aangetoond worden.

Sporen passief verworven antistoffen zijn in staat het vermogen van het vaccin om virusneutraliserende immuunlichamen op te wekken, geheel of ten dele te onderdrukken. Dit effect is soms ook nog merkbaar bij een later uitgevoerde revaccinatie. Geïmporteerde kalveren afkomstig van gevoelige moeders zijn op een leeftijd van zes tot tien weken wel in staat op een vaccininjectie te reageren met de produktie van virusneutraliserende antistoffen tot hoge titer; na revaccinatie vertonen dergelijke dieren steeds een secundaire reactie.

Uit deze resultaten mag worden geconcludeerd dat de toepassing van de thans geldende voorschriften, waarbij alle dieren ouder dan twee maanden,

aan vaccinatie worden onderworpen, geen optimale resultaten zal geven. Een verbetering zal vermoedelijk worden bereikt door de eerste enting van het jongvee op een leeftijd van ruim een half jaar uit te voeren. Op deze wijze zal namelijk niet slechts een meer effectieve protectie verkregen worden gedurende de tweede helft van het eerste levensjaar, maar bovendien mag van de in het volgend voorjaar uitgevoerde vaccinatie, welke dus een herenting zal zijn, een beter resultaat verwacht worden.

Onderzoek van een 200-tal, voornamelijk in 1955 en 1956 op verschillende tijdstippen na de jaarlijkse enting verzamelde sera van volwassen Nederlandse slachtrunderen, afkomstig uit verschillende provincies, toonde aan dat een zeer hoog percentage van de rundveestapel nog lange tijd na de laatste vaccinatie over grote hoeveelheden O-antilichamen beschikt. Dat deze situatie geen gevolg is van infectie, kon waarschijnlijk gemaakt worden doordat in de sera van een twaalftal runderen welke ook tegenover A- en C-virus onderzocht werden, eveneens de tegen deze typen gerichte antistoffen tot hoge titer aanwezig bleken te zijn. Zowel bij monovalent geënte runderen, als bij dieren welke tegen alle drie typen gevaccineerd waren, werd kunstmatige infectie door middel van injectie van smetstof in het tongslijmvlies, niet steeds gevolgd door toename van de homologe antistoffen. In de betreffende jaren kwam overigens slechts een gering aantal besmettingen met virus van het 0-type voor, zodat ook de kans dat een enigszins belangrijk percentage van de onderzochte dieren hieraan werd blootgesteld, zeer gering is te achten.

Het verband tussen de bij infectie waargenomen resistentie en de op het tijdstip van besmetting in de circulatie aanwezige immuunstoffen, werd onderzocht aan de hand van proefuitkomsten, verkregen met 270 dieren welke voor het merendeel gevaccineerd waren. Bij de verschillende wijzen van infectie bleken niet steeds gelijke antistofconcentraties voldoende om protectie tegen generalisatie te verlenen.

Van de runderen welke werden besmet door inwrijven van het mondslijmvlies met een virussuspensie, bleken 28 dieren met een serumtiter van kleiner dan 1,2 geheel gevoelig, terwijl van de 94 dieren welke titers variërend van 1,2 tot 4,2 hadden, er slechts twee klauwafwijkingen kregen. Bij deze runderen werd een titer van 1,5 gevonden.

Wanneer het virus door injectie in het slijmvlies werd toegediend, bleek de correlatie tussen serumtiter en weerstand tegen generalisatie enigszins minder duidelijk.

Werd een niet tevoren getitreerde smetstofhoeveelheid gebruikt, dan liepen de in verschillende proeven gevonden resultaten onderling vrij sterk uiteen; bij een groep dieren welke werd geïnfecteerd door een intradermolinguale injectie van 10 000 ID_{50} en bij meerdere andere groepen, welke op overeenkomstige wijze met een tiende van deze hoeveelheid werden besmet, bleken eveneens enkele dieren met relatief hoge antistoftiters niet beschermd te zijn tegen klauwafwijkingen.

Het verband tussen de serumtiter en de uitgebreidheid van de slijmvliesdefecten in de mondholte was minder duidelijk dan dat tussen klauwafwijkingen en antistoftiter. Bij injectie van grote smetstofhoeveelheden in het tongslijmvlies ontwikkelde zich bij alle proefdieren een blaar op de injectieplaats; bij gebruik van kleinere doses was dit niet het geval. Het waren dan voornamelijk de runderen met hogere antistoftiters die de besmetting weerstonden; ook bij deze dieren kwamen echter dikwijls beperkte mondafwijkingen voor. Daarentegen bleken de door inwrijving van de mondholte besmette dieren met serumtiters van 2,5 of meer, bijna alle geheel beschermd te zijn. Bij waarden tussen 1,2 en 2,5 was dit bij ongeveer 50% van de dieren het geval.

Deze resultaten demonstreren dat de kwantitatieve bepaling van de mond- en klauwzeervirusneutraliserende antistoffen in rundersera met succes kan worden toegepast bij de bestudering van verschillende met de vaccinatie samenhangende problemen. In het algemeen blijkt de serumtiter een maat voor de resistentie tegen infectie.

De gebruikte techniek werd uitvoerig beschreven.

SUMMARY

NEUTRALIZING ANTIBODIES IN SERA OF CATTLE VACCINATED AGAINST FOOT-AND-MOUTH DISEASE

In the past serological methods have only rarely been used for the study of immunity against foot-and-mouth disease in cattle, or for the evaluation of vaccines in this species. The development of a relatively simple method for the assay of antibodies and the confirmation of the value of such a technique, were the purposes of this thesis.

From observations made in work with foot-and-mouth disease, as well as from experience obtained by workers in related fields, it was apparent, that a technique measuring virus neutralizing antibodies, might be expected to yield more valuable information concerning the resistance to infection, than any other serological test method available.

Because of certain disadvantages associated with the other systems developed for the serological study of foot-and-mouth disease virus, preference was given to a modification of the technique described by BROOKSBY and WARDLE (1953).

According to this method the virus is grown in surviving cattle tongue epithelium, which is held in the depressions of a perspex plate, in a fluid medium. At the end of an incubation period of three days the presence of specific antigen is demonstrated by means of a complement-fixation test.

Useful results had not only be obtained if tissue from susceptible animals was employed, but also when epithelium derived from immune cattle was used.

As a routine, the inactivated cattle sera were tested in a dilution of 1/10 against several virus dilutions. In each instance, the virus suspension used was also titrated in the same tissue. The serum titer was expressed as the logarithm of the number of ID_{50} of virus neutralized. The optimal serum activity was observed, if serum and virus were incubated for one hour at 25° C prior to addition to the cultures.

Further dilution of the serum produced a progressive decrease of the amount of virus neutralized. For any serum the line giving the relationship between the log of the serum dilution and the log of the number of ID_{50} neutralized, is straight, with a slope of about 1.4.

Both tissue and virus suspension were found to be a possible source of important errors. In order to ensure a satisfactory degree of reproducibility between experiments carried out on different days, the use of a single pool of virus stored at –30°C for each series of experiments, was introduced.

Tissue susceptibility was found to be lower immediately following the annual field vaccination. The variation in tissue susceptibility influenced results obtained in the neutralization tests. This influence was in the same direction, however not necessarily to the same degree when different sera

were tested simultaneously. Correction of this variation proved to be feasible by routinely including a control immune serum in each experiment. The use of tissue from susceptible animals however remained advisable.

Sera from non-vaccinated cattle rarely showed titers of more than 0.5.

In adult animals immunized with stock vaccines produced according to FRENKEL's method, antibodies as a rule were present one week after primary vaccination. Peak values varying from 2.0 to 5.0 were observed after 2 to 5 weeks. After 18 weeks serum titers were found to range from 0.8 to 3.2. In all experiments large differences in the rate of disappearance of the antibodies from the circulation, as well as in the maximum values attained, were observed between cattle which had received a comparable treatment.

These individual variations markedly decrease the value of results obtained with a small number of experimental animals.

Although in one group of four cattle, that had been vaccinated with 60 mls of a type O-vaccine, the average peak value was higher than that seen in a comparable group, that had received the usual dose of 15 mls, this difference subsequently was not maintained.

After revaccination a typical secondary response occurred, routinely after one week values were found to be very much in excess of those seen after one injection of vaccine. In these cases the antibodies persisted longer than after primary vaccination.

The consequences of the administration of the customary dose of antigen with one third of the normal quantity of aluminum hydroxide, was investigated with the aid of two groups of twelve animals each. The cattle injected with the normal stock vaccine reached higher antibody levels, and this difference was maintained throughout the observation period, i.e. 18 weeks after the beginning of the experiment.

Calves from immune mothers could be shown to be born without an appreciable antibody titer. Antibodies were ingested with the colostrum, and, depending on the titer of the mother's serum, could still be found in calves two to six months of age.

Traces of maternal antibody could partially or completely destroy the ability of the vaccine to evoke an immune response. In some instances a second injection of vaccine administered 10 weeks after the first one, was also observed to elicit only a very limited reaction. Six to ten weeks old calves from susceptible mothers were able to respond fully to the administration of vaccine. After revaccination such animals showed a typical secondary response. From these results may be concluded, that the foot-and-mouth disease vaccination program presently in use in the Netherlands, which demands vaccination of all calves of over two months old, between February 1st and April 15th of each year, may not be expected to yield optimal results. An improvement might be obtained by giving a first dose of vaccine at the age of six to seven months. In this way, not only an effective protection will be ensured during the second half of the first year of life, but also, the vaccine injection given

the following spring will automatically become a revaccination, and may be expected to elicit a better response.

In 1955 and 1956 the examination of some 200 sera of adult Dutch cattle from various districts obtained at different intervals after vaccination, showed, that a high percentage of these animals had high antibody titers. It does not seem probable, that these results were due to an intercurrent infection with the virus, as a number of these sera, which were also tested against the A-and C-types, showed similar titers against these viruses. The incidence of foot-and-mouth disease was low in these years, it therefore does not seem very likely, that a large percentage of the animals examined in these experiments could have been exposed accidentally to each of these strains.

The relationship between antibody titer and resistance to challenge was investigated. In this phase of the work 270 animals were used. When several methods of exposure were compared, different antibody levels were found to protect against generalization.

Of 122 cattle exposed by swabbing the mouth, 28 with a titer of less than 1.2 proved to be fully susceptible. Of the remaining 94, which had antibody titers varying from 1.2 to 4.2, only two showed foot lesions. Both of these had serum titers of 1.5.

If the virus was administered intradermolingually, the relationship between titer and resistance was less clearcut. When an unknown dose of virus was injected, the results obtained in different experiments were found to vary markedly. In one group of cattle, that was exposed by injection of 10,000 ID_{50}, as well as in several other groups, of which each individual received 1000 ID_{50} intradermolingually, some animals having relatively high antibody titers were also found not to be protected against foot lesions.

The relationship between serum titer and the extent to which lesions developed in the mouth and rumen, was less distinct than that between serum antibody and the occurrence of foot lesions.

If large quantities of virus were inoculated into the mucosa of the tongue, a vesicle always developed. In case smaller doses were used, chiefly those animals showing higher antibody levels were found to be protected, although occasionally local lesions at the site of injection were seen in this group also.

If virus was applied by swabbing only, almost all cattle having antibody titers of over 2.5 were protected completely. This also was the case in about 50% of the animals with titers between 1.2 and 2.5.

These results show, that the quantitative determination of the foot-and-mouth disease virus neutralizing antibodies can be applied successfully to the study of problems related to vaccination. In general, the serum titer is an indication of resistance to infection.

The technique is given in detail.

ZUSAMMENFASSUNG

NEUTRALISIERENDE ANTIKÖRPER IN SERA VON GEGEN MAUL- UND KLAUENSEUCHE GEIMPFTEN RINDERN

Nur selten wurden serologische Methoden zum Studium der Immunität bei der Maul- und Klauenseuche beim Rind, oder für die Auswertung von Vakzinen, verwendet.

Die Entwicklung einer verhältnismässig einfachen Methode für die Prüfung der Antikörper und die Bestätigung des Wertes einer solchen Technik, war der Zweck der vorliegenden Dissertation.

Auf Grund der gemachten Erfahrungen bei Arbeiten mit der Maul- und Klauenseuche und auf Grund von Erfahrungen anderer Bearbeiter dieses Gebietes schien es offensichtlich, dass man durch den Nachweis virusneutralisierender Antikörper einen weit besseren Einblick in die Immunitätsvorgänge erhalten könnte als es bisher mit anderen serologischen Methoden der Fall war.

Infolge verschiedener Nachteile anderer Systeme, die für das Studium des Maul- und Klauenseuche-Virus entwickelt wurden, wurde einer Modifikation der von BROOKSBY und WARDLE (1953) beschriebenen Methode der Vorzug gegeben.

Nach dieser Methode wird das Virus in überlebendem Zungenepithel des Rindes gezüchtet, das in Vertiefungen einer Perspex-Platte in einem flüssigen Medium gehalten wird. Nach einer Inkubationszeit von 3 Tagen wird die Anwesenheit spezifischer Antigene mit dem Komplementbindings-Test nachgewiesen. Man erhielt brauchbare Resultate sowohl mit Geweben von empfänglichen Tieren als auch mit Epithel von immunen Rindern.

Routinemässig wurden 1 : 10 verdünnte Rindersera mit verschiedenen Virusverdünnungen geprüft. In jedem Fall wurde die verwendete Virussuspension auch im gleichen Gewebe titriert. Der Serumtiter wurde als Logarithmus der ID_{50} des neutralisierten Virus ausgedrückt. Eine optimale Serumaktivität wurde beobachtet, wenn das Serum und Virus bei 25° C bebrütet wurden, bevor sie zu den Kulturen zugesetzt wurden.

Höhere Serumverdünnungen verursachten eine Verringerung der neutralisierten Virusmenge.

Die Linie, welche das Verhältnis zwischen dem Logarithmus der Serumverdünnung und der neutralisierten ID_{50} ausdrückt, ist eine Gerade mit einer Neigung um ungefähr 1,4.

Sowohl das Gewebe als auch die Virussuspension können Quellen von Fehlern sein. Um eine befriedigende Reproduzierbarkeit bei Versuchen, die an verschiedenen Tagen ausgeführt wurden, zu gewährleisten, wurde eine einheitliche, bei —30° C aufbewahrte Virusreserve für die ganze Versuchsreihe verwendet.

Es wurde gefunden, dass die Gewebsempfänglichkeit unmittelbar nach der jährlichen Vakzination geringer war. Die Schwankungen in der Gewebs-

empfänglichkeit beeinflussten die Ergebnisse des Neutralisations-Testes. In gleicher Richtung, aber nicht in gleichem Ausmass, war die Beeinflüssung nachweisbar, wenn verschiedene Sera simultan geprüft wurden. Das Mitführen eines Kontrollserums bei jedem Versuch ermöglichte die Schwankungen zu korrigieren. Die Verwendung von Geweben von empfänglichen Tieren bleibt aber angezeigt.

Sera von nicht vakzinierten Tieren zeigten nur selten Titer höher als 0,5.

Erwachsene Tiere, die mit Vakzinen geimpft wurden, die nach der Methode FRENKEL erzeugt wurden, wiesen in der Regel eine Woche nach der Impfung Antikörper auf. Spitzenwerte von 2,0 — 5,0 wurden nach 2— 5 Wochen beobachtet. Nach 18 Wochen betrugen die Serumtiter 0,8 — 3,2.

In allen Experimenten wurden grosse Unterschiede in der Abnahmegeschwindigkeit der Antikörper und in den erreichten Maximalwerten beobachtet, obwohl die Rinder einer vergleichbaren Behandlung unterworfen worden waren. Diese individuellen Schwankungen vermindern beachtlich den Wert der Ergebnisse, die man mit einer geringen Anzahl von Versuchstieren erhielt.

In einer Gruppe von vier Rindern, welche mit 60 Ml einer Vakzine des Types O geimpft wurden, war der Spitzenwert höher als bei der Vergleichsgruppe, die nur die übliche Dosis von 15 Ml erhielt. Dieser Unterschied blieb aber später nicht bestehen.

Nach der Revakzination trat ein typischer Sekundäreffekt auf. Nach einer Woche waren meist Werte nachzuweisen, die die nach einer einzigen Vakzine-Injektion erreichten Titer weit übertrafen. In diesen Fällen persistierten die Antikörper auch länger als nach Erstimpfung.

Die Wirkung der Verabreichung der üblichen Antigendosis mit einem Drittel der normalen Menge Aluminium-Hydroxyd wurde an zwei Gruppen mit je 12 Rindern geprüft.

Rinder, die mit der üblichen Stammvakzine behandelt wurden, erreichten einen höheren Antikörperspiegel. Dieser Unterschied blieb während der ganzen Untersuchungszeit von 18 Wochen bestehen.

Bei Kälbern, die von immunen Müttern stammten, konnten vor der Fütterung keine Antikörper nachgewiesen werden. Die Antikörper wurden mit dem Kolostrum aufgenommen und je nach dem Serumtiter der Mutter, konnten diese noch bei zwei bis sechs Monate alten Kälbern ermittelt werden.

Spuren von mütterlichen Antikörpern konnten teilweise oder vollständig die immunisierende Fähigkeit des Impfstoffs aufheben. In manchen Fällen löste eine zweite Vakzine-Injektion, die zehn Wochen nach der ersten verabreicht wurde, nur eine begrenzte Reaktion aus. Sechs bis zehn Wochen alte, von empfänglichen Müttern stammende Kälber reagierten hingegen voll auf die verabreichte Vakzine. Nach der Zweitimpfung zeigten solche Tiere eine typische Secundärreaktion.

Auf Grund dieser Resultate kann nicht erwartet werden, dass das derzeit in Holland gegen die Maul- und Klauenseuche in Verwendung stehende Impf-

programm, nach dem alle über 2 Monate alte Kälber in der Zeit von 1 Februar bis 15 April geimpft sein müssen, ein voller Erfolg beschieden sein wird. Eine Verbesserung könnte erzielt werden, wenn die erste Vakzinedosis im Alter von sechs bis sieben Monaten verabreicht wird. Auf diese Weise wird nicht nur für die zweite Hälfte des ersten Lebensjahres ein wirksamer Schutz gesichert, sondern es wird auch dadurch die im nächsten Frühjahr erfolgende Impfung zu einer Revakzination, von der auch eine entsprechend bessere Reaktion erwartet werden kann.

In den Jahren 1955 und 1956 erfolgte eine Untersuchung von über 200 Sera, die von erwachsenen holländischen Kühen aus verschiedenen Gegenden stammten. Diese Untersuchung zeigte, dass ein hoher Prozentsatz dieser Tiere einen hohen Antikörpergehalt aufwies. Es ist unwahrscheinlich, dass diese Resultate infolge einer interkurrenten Virusinfektion ausgelöst wurden, zumal eine Anzahl dieser Sera auch ähnliche Titer mit den Virustypen A und C ergaben. In diesen Jahren war auch die Verbreitung der Maul- und Klauenseuche gering und es scheint unwahrscheinlich, dass ein grösserer Prozentsatz der Versuchstiere allen 3 Virustypen ausgesetzt war.

Die Beziehung zwischen dem Antikörpertiter und der Resistenz gegenüber der künstlichen Infektion wurde geprüft an 270 Tiere. Es konnten verschiedene die Generalisation verhinderden Antikörperspiegel gefunden werden, wenn verschiedene Infektionsmethoden verwendet wurden. Von 122 Rindern, die der Tuchinfektion ausgesetzt wurden, waren 28 mit einem tieferen Titer als 1,2 voll empfänglich. Von den restlichen 94, mit Titern 1,2 bis 4,2 zeigten nur zwei Tiere Klauenveränderungen. Beide hatten Serumtiter von 1,5.

Wenn die Infektion intradermolingual erfolgte, dann war die Beziehung des Titers zur Resistenz nicht so offensichtlich. Wenn unbekannte Virusdosen injiziert wurden, schwankten die Resultate beachtlich in den verschiedenen Versuchen. In einer Gruppe von Rindern, die einer Injektion von 10 000 ID_{50} ausgesetzt waren und auch in anderen Gruppen, wo jedes Tier 1000 ID_{50} intradermolingual erhielt, hatten manche Tiere Klauenläsionen, obwohl sie verhältnismässig hohe Serumtiter zeigten.

Das Verhältnis zwischen Serumtiter und Ausdehnung von Maul- und Pansenveränderungen war weniger aufschlussreich, im Vergleich zu Serumantikörpergehalt und Auftreten von Klauenveränderungen.

Wenn grosse Virusmengen in die Zungenschleimhaut injiziert wurden, entwickelte sich immer eine Blase. Wenn geringere Virusdosen verwendet wurden, waren jene Tiere geschützt, die hohe Antikörpertiter aufwiesen. Gelegentlich konnten aber auch bei solchen Tieren lokale Läsionen an der Injektionsstelle gefunden werden.

Gegen eine Tuchinfektion waren fast alle Tiere geschützt, vorausgesetzt, dass sie Titer über 2,5 hatten. Das gleiche gilt ungefähr für 50% der Tiere mit Titern zwischen 1,2 und 2,5.

Die Ergebnisse zeigen deutlich, dass der quantitative Nachweis von Maul- und Klauenseuche-Virusneutralisierenden Antikörpern zum Studium von Vakzinationsproblemen erfolgreich verwendbar ist. Im allgemeinen zeigt der Serumtiter die Resistenz gegenüber der Infektion an.

Die Arbeitstechnik wird ausführlich beschrieben.

RÉSUMÉ

ANTICORPS NEUTRALISANTS EN SÉRUMS DE BOVINS VACCINÉS CONTRE LA FIÈVRE APHTEUSE

Pour apprécier l'état d'immunité anti-aphteuse du cheptel bovin et pour rechercher l'efficacité des vaccins anti-aphteux chez les bovidés, l'emploi des méthodes sérologiques demeurait rare.

Le but de ce travail est la mise au point d'une méthode simple et sensible.

Les recherches concernant la fièvre aphteuse et d'autres maladies à virus montrent qu'en général l'évaluation du taux des anticorps neutralisant dans le sérum est d'une valeur supérieure à la plupart des autres méthodes sérologiques pour juger de l'état d'immunité. C'est pourquoi nous avons utilisé cette méthode dans ce travail.

La technique d'expérimentation décrite en 1953 par BROOKSBY et WARDLE semblait la plus propice pour ces recherches, plusieurs autres techniques ayant des défauts notables dans les circonstances expérimentales. Dans la méthode de BROOKSBY le tissu lingual bovin est employé comme substrat de multiplication du virus. Après la période d'incubation la formation d'antigène est démontrée au moyen de la réaction de déviation du complément. Des résultats utilisables sont obtenus même lorsque l'on utilise du tissu provenant d'animaux immunisés.

Au cours de nos expériences nous avons comparé le titre du virus en présence de sérum dilué au 1/10 avec le titre du virus sans adjonction de sérum. Le titre du virus a été exprimé en doses infectieuses 50%, rapporté à l'échelle logarithmique, le titre neutralisant d'un sérum étant la différence entre les deux titrages.

Diverses circonstances et modifications de la technique employée ont été examinées. L'activité optimale du sérum était observée après incubation au préalable du mélange sérum-virus pendant une heure à 25°C. La dilution de 1/10 du sérum examinée donnait des résultats satisfaisants; des dilutions plus élevées montraient une activité beaucoup plus faible. La courbe indiquant le rapport entre le logarithme de la dilution du sérum et le titre neutralisant était une droite à tangente 1,4.

La suspension de virus employée influençait les résultats obtenus. Il était donc très avantageux d'employer une seule suspension virulente dans chaque série d'expériences. Pour obtenir une stabilité satisfaisante on gardait ce matériel à la température de —30°C.

L'état d'immunisation de l'animal donneur de tissu pouvait influencer les issus. Les résultats obtenus avec plusieurs sérums sont influencés par un échantillon de tissu dans une même direction, mais d'un degré variable. Pour corriger ce facteur un seul sérum immun témoin était employé dans chaque épreuve. En n'employant que du tissu provenant d'animaux susceptibles, le facteur individuel était en grande partie éliminé.

La plupart des expériences étaient faites avec du virus du type O. Le sérum des animaux non-vaccinés, sensibles à l'infection, ne montrait que rarement des titres plus élevés que 0,5. Chez les animaux adultes on pouvait en général déceler les anticorps une semaine après la primo-vaccination, faite avec la dose habituelle de 15 ml de vaccin monovalent. Les titres maximums, qui atteignaient 2,0 à 5,0, se trouvaient entre deux et cinq semaines après la vaccination. Quatre mois après l'inoculation les titres variaient de 0,8 jusqu'à 3,2. Dans toutes les expériences il y avait de grandes différences entre les animaux individuels traités de façon identique. Ces différences se montraient tant dans la vitesse de la disparition des anticorps de la circulation sanguine, que dans les titres maximums. L'influence prépondérante de l'individu dans la réponse à la vaccination laisse prévoir que les résultats, obtenus avec un petit nombre de bovidés, seront toujours de valeur très limitée.

Chaque animal d'un groupe de quatre boeufs était vacciné avec 60 ml de vaccin du type O. Dans le groupe de contrôle la dose normale de 15 ml était employée. Le titre maximum moyen du prémier groupe était plus élevé que celui du deuxième. Cependant, en poursuivant l'expérience, cette différence disparut.

La révaccination était suivi d'une réaction accélérée typique. Les titres sériques s'accroissaient rapidement. Après une semaine les valeurs dépassaient déjà les taux maximums observés après la primovaccination. Les anticorps neutralisants persistaient plus longtemps qu'après la primovaccination.

Pour étudier l'effet d'une même dose d'antigène, lié à des quantités différentes de hydroxyde d'alumine, nous avons préparé deux vaccins. L'un était normal, l'autre contenait pour la même dose d'antigène une quantité moindre de hydroxyde d'alumine. Nous injections douze animaux avec le vaccin normal et douze autres avec une dose du vaccin concentré, contenant la même quantité de virus inactivé. Le vaccin normal donnait des titres maximums plus élevés que le vaccin concentré. Pendant les quatre mois, qu'a duré l'expérience, le groupe normal restait le meilleur.

Des anticorps anti-aphteux sériques n'étaient pas décelables à la naissance de veaux, nés de vaches immunisées. Dans des conditions normales on pouvait assez tôt trouver des anticorps chez ces veaux, l'immunité passive étant transmise par le colostrum. Les titres maximums étaient en rapport étroit avec les taux dans le sang maternel. Avec la méthode de neutralisation nous avons réussi à les démontrer encore dans le sérum de veaux âgés de deux à six mois. Quand il n'y avait que des traces de ces anticorps passifs et même quelquefois quand ils ne se montraient plus dosables, le pouvoir stimulant du vaccin à la formation des anticorps était encore supprimé. Les veaux nés de mères sensibles à l'infection réagissaient à l'âge de 6 à 10 semaines à la vaccination en produisant des anticorps neutralisants de titre élevé. Après révaccination ces animaux montraient toujours une réaction accélérée. Ces données ont justifié la conclusion que les directives de vaccination, actuellement en vigueur en Hollande, vaccination annuelle de tous les animaux âgés

de plus de deux mois, ne peuvent pas donner de résultats optimaux. Une amélioration des résultats sera peut-être réalisable en vaccinant les veaux pour la première fois à l'âge de plus de six mois. De cette façon on n'obtiendra pas seulement une protection plus effective pendant la seconde moitié du premier an, mais on pourra également attendre un résultat meilleur de la révaccination au printemps suivant.

Quelque deux cents échantillons de sérum, provenant de bovidés hollandais adultes de maintes régions du pays et collectionnés à des intervalles variables après la vaccination pendant les années 1955 et 1956, ont été titrés. Il en résultait qu'un pourcentage élevé des bovidés disposait d'une quantité considérable d'anticorps anti-O longtemps après la vaccination. Douze animaux ont été examinés au point de vue des anticorps anti-A en anti-C. Ils en possédaient également à un titre élevé. Au cours de ces deux années étudiées il n'y a eu qu'un nombre très restreint d'infections au type O. La probabilité qu'un nombre aussi élevé d'animaux pu s'immuniser grace à une infection inapparente était donc à peu près négligeable. Des animaux vaccinés contre un seul type de la fièvre aphteuse, aussi bien que les animaux immunisés contre les trois types, ne montraient pas toujours une augmentation du taux des anticorps spécifiques après une injection virulente intradermolinguale.

Pour étudier le rapport entre la résistance à l'infection et le taux des anticorps sériques 270 animaux, dont la plupart étaient vaccinés, ont été examinés. Le taux d'anticorps nécessaire pour la protection contre la maladie différait selon le mode d'infection. Une partie des animaux était éprouvée en frottant la muqueuse buccale avec un linge trempé dans une suspension virulente. Les 28 animaux avec des titres inférieurs à 1,2 étaient susceptibles. De 94 animaux avec des titres variant de 1,2 jusqu'à 4,2, deux seulement, chacun avec un titre de 1,5, ont développé des lésions de généralisation aux ongles. Des lésions locales étaient à peu près absentes chez les animaux à titre neutralisant égal ou supérieur à 2,5. Cinquante pour cent environ des animaux à titre compris entre 1,2 et 2,5 ont présenté des lésions locales. Le rapport entre le titre neutralisant du sérum et la réponse à une injection virulente intradermolinguale était moins net. En utilisant des quantités indéterminées de virus, nous avons observé une grande différence entre les résultats dans différents groupes. En utilisant 10 000 ou 1000 doses infectantes 50% il y avait aussi quelques animaux avec généralisation aux ongles, malgré un titre du sérum assez élevé. Le rapport entre l'étendue des lésions de la muqueuse buccale et le titre neutralisant du sérum était encore moins net. En injectant de grandes quantités de virus dans la muqueuse linguale nous avons observé chez tous les animaux un aphte local à l'endroit de l'injection. En employant des doses plus petites il n'y avait généralement pas de lésion locale, surtout chez les animaux à titre sérique neutralisant élevé. Mais nous avons observé dans ce même groupe également assez fréquemment des lésions orales d'étendue restreinte.

Les résultats ont démontré qu'on a pu employer avec succès le dosage des anticorps anti-aphteux neutralisants, présents dans le sérum des bovidés, pour l'étude des problèmes posés par la vaccination. Les titres sériques évoluaient en général en parallèle avec la résistance à l'infection. La technique employée pour le dosage des anticorps a été décrite minutieusement.

LITERATUUR

ANDREWES C. H. and W. J. ELFORD	1933	*Brit. J. exp. Path. 14*, 367.
— and —	1937	*Brit. J. exp. Path. 18*, 43.
ANDREWS, W. H. c.s.	1931	Fourth Progress Report of the Foot-and-Mouth Disease Research Committee, p. 33. His Majesty's Stationery Office, London.
BACHRACH, H. L., W. R. HESS and J. J. CALLIS	1955	*Science 122*, 1269.
BATSON, R., A. CHRISTIE and B. MAZUR	1957	*A. M. A. J. of Diseases of Children 94*, 404.
BECK, W. und TH. ZIMMERMANN	1954	*Berl. u. Münch. tierärztl. Wochenschr. 67*, 101 en 122.
BEDSON, S. P., H. W. MAITLAND and Y. M. BURBURY	1927	Second Progress Report of the Foot-and-Mouth Disease Research Committee, p. 69. His Majesty's Stationery Office, London.
—, — and —	1927	*J. comp. Path. and Ther. 40*, 79.
BEREZNAY, T., J. RICHTER und M. SZENT-IVANYI	1957	*Acta Vet. Hung. 7*, 391.
BESREDKA, A. L.	1937	Les immunités locales. Masson, Paris.
BESWICK, F. S. L.	1955	*J. Hygiene 53*, 339.
BEVERIDGE, W. I. B. and F. M. BURNET	1946	Med. Res. Council, Spec. Report Series no. 256. His Majesty's Stationery Office, London.
—	1952	*Lancet, 229.*
BLACK, F. L. and D. H. CLARKE	1955	*J. Immunology 74*, 411.
— and J. L. MELNICK	1955	*J. Immunology 74*, 236.
BLISS, C. I.	1935	*Ann. appl. Biol. 22*, 134 en 307.
BRADISH, C. J., W. M. HENDERSON and J. B. BROOKSBY	1954	*Bioch. J. 56*, 329.
BROOKSBY, J. B., I. A. GALLOWAY and W. M. HENDERSON	1948	*Proc. Soc. exp. Biol. Med. 69*, 74.
—	1949	The antibodies in foot-and-mouth disease. Agric. Res. Council Rep. Series no. 9. Her Majesty's Stationery Office, London.
—	1952	The technique of complement-fixation in foot-and-mouth disease research. Agric. Res. Council Rep. Series no. 12. Her Majesty's Stationery Office, London.
— and E. WARDLE	1954	*J. Hygiene 52*, 87.
BROWN, R. D.	1956	*Vet. Record 68*, 653.
BURNET, F. M., E. V. KEOGH and D. LUSH	1937	*Austr. J. exp. Biol. Med. Sci. 15*, 226.
—, D. LUSH and A. V. JACKSON	1939	*Brit. J. exp. Path. 20*, 377.
—	1943	*Austr. J. exp. Biol. Med. Sci. 21*, 231.
CANN, J. R. and E. W. CLARK	1955	*Bioch. biophys. Acta 18*, 429.
CARTWRIGHT, S. F., T. W. F. PAY and W. M. HENDERSON	1957	*J. gen. Microbiol. 16*, 730.

CIUCA, A.	1929	*J. Hygiene 28*, 235.
CRAIGIE, J.	1939	Die Antigenfunktionen und die serologischen Reaktionen der Virusarten in vitro, in: "Handb. d. Virusforschung", Band II, p. 1106. Herausgegeben von R. DOERR und C. HALLAUER. Springer Verlag, Wien.
DELBRÜCK, M.	1945	*J. Bact. 50*, 137.
DINTER, Z. und T. WESSLÉN	1958	*Zentralbl. f. Bakt. I. Orig. 171*, 157.
DIXON, F. J. c.s.	1952	*J. exp. Med. 96*, 313.
—	1953	in "The nature and significance of the antibody response". Symp. ed. by A. M. PAPPENHEIMER JR., N.Y. Acad. of Med., Columbia University Press. New York.
DOUGHERTY, T. F. and A. WHITE	1947	*J. Lab. Clin. Med. 32*, 584.
DULBECCO, R.	1952	*Proc. Nat. Acad. Sci. 38*, 747.
— and M. VOGT	1954	*J. exp. Med. 99*, 167.
—, M. VOGT and A. G. R. STRICKLAND	1956	*Virology 2*, 162.
—	1956	in "Host-parasite relationships in living cells". Symp. James W. Mc. Laughlin Fellowship Program. Univ. of Texas Med. Branch. Springfield. Illinois.
EDSALL, G.	1953	in "The nature and significance of the antibody response". Symp. ed. by A. M. PAPPENHEIMER JR., N.Y. Acad. of Med., Columbia University Press. New York.
ERNST, W.	1921	*Münch. tierärztl. Wochenschr. 72*, 355 en 777.
FAZEKAS DE ST. GROTH , S., G. S. WATSON and A. F. REID	1958	*J. Immunology 80*, 215.
— and A. F. REID	1958	*J. Immunology 80*, 225.
FIEGE, H.	1953	*Vet-Med. Nachr.*, 205.
FOGEDBY, E. G. c,s.	1952	*Nord. Vet. Med. 4*, 745.
FRANCIS, TH.	1947	*Bact. Rev. 11*, 147.
FREDERIKS, H. H. J.	1949	*Tijdschr. v. Diergeneesk. 74*, 779 en 839.
FRENKEL, H. S.	1947	*Bull. Off. int. Epiz. 28*, 155.
—	1949	*Am. J. Vet. Res. 10*, 142.
—	1950	*Am. J. Vet. Res. 11*, 371.
—	1951	*Am. J. Vet. Res. 12*, 187.
— and H. W. DUNNE	1952	*Am. J. Vet. Res. 13*, 21.
—	1953	*Bull. Off. int. Epiz. 39*, 131.
—	1955	in: "Methods of typing and cultivation of foot-and-mouth disease viruses". Seminar. The European Productivity Agency of the Organisation for European Economic Co-operation, Amsterdam.
— and W. E. RIBELIN	1956	*Am. J. Vet. Res. 17*, 40.
FREUND, J.	1930	*J. Immunology 18*, 315.
FULTON, F. and P. ARMITAGE	1951	*J. Hygiene 49*, 247.
GADDUM, J. H.	1933	Med. Res. Council Spec. Report Series no. 183. His Majesty's Stationery Office, London.
GARA, P. VON und K. TRAUTWEIN	1930	*Zeitschr. Immunitätsf. 67*, 102.
GARCIA MATA, E., L. PIZZI y H. ARAMBURU	1952	*Gac. Vet. 14.*

GIBBS, Y. M.	1931	Fourth Progress Report of the Foot-and-Mouth Disease Research Committee, p. 159. His Majesty's Stationery Office, London.
GILLESPIE, J. H.	1955	*Cornell Vet. 45*, 160 en 170.
— and H. S. FRENKEL	1955	*Am. J. Vet. Res. 16*, 505.
— c.s.	1958	*Cornell Vet. 48*, 103.
GINS, H. A. und J. H. FORTNER	1925	*Zentralbl. f. Bakt. I. Ref. 78*, 576.
GOTLIEB, T. c.s.	1953	*J. Immunology 71*, 66.
HALLAUER, C.	1939	Die erworbene Immunität gegen Virusinfektionen, in: "Handbuch der Virusforschung", Band II, p. 1147. Herausgeg. von R. DOERR und C. HALLAUER. Springer Verlag, Wien.
HAMMON, C. W. and M. NOVAK	1950	*Proc. Soc. exp. Biol. Med. 74*, 155.
HECKE, F.	1955	*Wiener tierärztl. Monatsschr. 42*, 606.
HEGEDÜS, A. und H. GREINER	1938	*Zeitschr. f. Immunitätsf. 92*, 1.
HENDERSON, W. M.	1949	The quantitative study of foot-and-mouth disease virus. Agric. Res. Council Rep. Series no. 8. His Majesty's Stationery Office. London.
—	1953	Proc. XVth Vet. Congress. Stockholm.
HOERLEIN, A. B.	1957	*J. Immunology 78*, 112.
HORSFALL, F. L.	1939	*J. exp. Med. 70*, 209.
HULTIN, J. V. and A. P. MCKEE	1952	*J. Bact. 63*, 437.
JANSSEN, L. W.	1951	*Verh. v. d. Kon. Acad. v. Wetensch., Afd. Natuurk. 2e sectie. Deel 47, no. 3.* North Holland Publishing Cy, Amsterdam.
JAWETZ, E. and V. R. COLEMAN	1952	*J. Immunology 68*, 645.
JERNE, N. K.	1951	*Acta Path. Microb. Scand., Suppl. no. 87.*
— and P. AVEGNO	1956	*J. Immunology* 76, 200.
KALMANSON, G. M., A. D. HERSHEY and J. BRONFENBRENNER	1942	*J. Immunology 45*, 1.
KAPSENBERG, J. G.	1956	Acad. Proefschr. Amsterdam.
KERR, W. R.	1956	*Vet. Record 68*, 476.
KODRNJA, E.	1952	*Bull. Off. int. Epiz. 38*, 117.
KORN, G.	1957	*Arch. f. exp. Vet.-Med. 11*, 637.
KRAUS, J.	1925	*Deutsche tierärztl. Wochenschr. 33*, 668.
KRECH, U.	1955	*J. exp. Med. 101*, 331.
LEYMASTER G. R. and T. G. WARD	1949	*J. Immunology 61*, 95.
LITTLE, R. B. und M. L. ORCUTT	1922	*J. exp. Med. 35*, 161.
LOEFFLER, F. und P. FROSCH	1898	*Zentralbl. f. Bakt. I. Orig. 28*, 371.
— und P. UHLENHUTH	1900	*Berl. tierärztl. Wochenschr. 52.*
MACKOWIAK, C., H. GIRARD et R. LANG	1954	*Ann. Inst. Pasteur* 87, 465.
— c.s.	1955	*Rev. d'Immunologie 19*, 426.
— et R. LANG	1958	*Bull. Off. int. Epiz. 49*, 99.
MAITLAND, H. B. and Y. M. BURBURY	1928	Third Progress Report of the Foot-and-Mouth Disease Research Committee p. 52. His Majesty's Stationery Office, London.

MAITLAND, M. C.	1928	Third Progress Report of the Foot-and-Mouth Disease Research Committee p. 96. His Majesty's Stationery Office, London.
MARUCCI, A. A.	1957	*Am. J. Vet. Res. 18*, 785.
MASON, J. H., T. DALLING and W. S. GORDON	1930	*J. Path. Bact. 33*, 783.
MAZZARACCHIO, V. c.s.	1957	*Zooprofilassi 12*, 539.
McDIARMID, A.	1946	*Vet. Record 58*, 146.
McLEAN, I. W. c.s.	1945	*J. Immunology 51*, 60.
McMEEKIN, T. L. and B. D. POLIS	1949	*Advances in protein chemistry* 5,201. Ed. by M. L. ARISON and J. T. EDSALL. Acad. Press. New York.
MELNICK, J. L. and E. M. OPTON	1956	*Bull. W.H.O. 14*, 129.
MERETTIG, K.	1957	Acad. Proefschrift. Hannover.
MERRILL, M. H.	1936	*J. Immunology 30*, 169 en 185.
MINETT, F. C.	1927	Second Progress Report of the Foot-and-Mouth Disease Research Committee p. 27. His Majesty's Stationery Office, London.
—	1927	*J. comp. Path. Ther. 40*, 173.
MOLL, L.	1908	*Jahrb. f. Kinderkrankh. 68*, 1.
MORGAN, I. M.	1945	*J. Immunology 50*, 359.
NAGANO, Y. et M. MUTAI	1954	*C. R. Soc. Biol. 148*, 766.
NAGEL, H. C.	1952	*Zentralbl. f. Bakt. I. Orig. 159*, 40.
NARDELLI, L. e E. PERINI	1956	*Vet. Ital. 7*, 321.
NORDBERG, B. and K. SCHJERNING THIESEN	1953	*Nord. Vet. Med. 5*, 289.
— and —	1956	*J. inf. Dis. 98*, 260.
OLITSKY, P. K. c.s.	1928	Rep. Foot-and-Mouth Disease Commission of the U.S. Department of Agriculture p. 12 en 86.
OPTON, E. c.s.	1955	*J. Immunology 75*, 178.
ORCUTT, M. L. and P. E. HOWE	1922	*J. exp. Med. 36*, 291.
PARKER, R. C.	1938	Methods of tissue culture. Hoeber, New York.
PFAB, A.	1927	Acad. Proefschr. Hannover.
REED, L. J. and H. MUENCH	1938	*Am. J. Hygiene 27*, 493.
REID, D. B. W., J. F. CRAWLEY and A. J. RHODES	1949	*J. Immunology 63*, 165.
RENNER, F.	1925	*Münch. tierärztl. Wochenschr. 77*, 474.
RICE, C. E. and P. BOULANGER	1953	Proc. A.V.M.A., Toronto. p. 169.
— and J. B. BROOKSBY	1953	*J. Immunology 71*, 300.
RÖHRER, H. und G. PYL	1958	in: "Handbuch d. Virusforschung". Band IV. Herausgeg. von C. HALLAUER u. K. F. MEYER. Springer Verlag, Wien.
RUBIN, H. and F. M. FRANKLIN	1957	*Virology 3*, 84.
—	1957	*Virology* 4, 533.
SCHLESINGER, R. W.	1949	*J. exp. Med. 89*, 491.
SCHMIDT, S. et P. HOLM	1949	*Rev. d'Immunologie 13*, 72.
SCHNEIDER, B.	1953	*Monatsh. f. prakt. Tierheilk. 5*, 333.
—	1955	*Monatsh. f. prakt. Tierheilk. 7*, 137.
SCHOENHEIMER, R. c.s.	1942	*J. Biol. Chem. 144*, 545.
SELLERS, R. F.	1955	*Nature 176*, 547.
SERRA, A. e G. GUARINI	1951	*Clin. Vet. Milano 84*, 321.

SKINNER, H. H.	1951	*Proc. Roy. Soc. Med. 44*, 1041.
—, W. M. HENDERSON and J. B. BROOKSBY	1952	*Nature 169*, 794.
—	1953	Proc. XVth. Vet. Congress, Stockholm.
SMORODINTSEV, A. A.	1957	*Virology 3*, 299.
SNEDECOR, G. W.	1946	Statistical Methods. Iowa State College Press, Ames, Iowa.
SORENSEN, D. K. c.s.	1958	*Am. J. Vet. Res. 19*, 74.
STEPHENSON, H. C.	1953	3rd Gaines Veterinary Symposium. Kankakee, Illinois.
STERNBERG, G.	1892	Trans. Assoc. Am. Physicians, 98.
STEVENSE, K. M.	1956	*J. Immunology 76*, 187.
STOCKMANN, L. and F. C. MINETT	1927	Second Progress Report of the Foot-and-Mouth Disease Res. Comm. His Majesty's Stationery Office, London.
TRAUB, E.	1936	*J. exp. Med. 63*, 847.
—	1938	*J. exp. Med. 68*, 229.
— und H. MÖHLMANN	1943	*Zentralbl. f. Bakt. I. Orig. 150*, 289 en 300.
TYRRELL, D. A. J. and F. L. HORSFALL	1953	*J. exp. Med. 97*, 845.
—	1953	*J. exp. Med. 97*, 863.
UBERTINI, B. c.s.	1953	*Arch. Vet. Ital. 4*, 1.
—	1956	*Zentralbl. f. Vet. Med. 3*, 419 en 767.
VARENNE, H. et L. DECHAMBRE	1957	*Rec. Med. Vet. 133*, 309.
WALDMANN, O. und J. PAPE	1920	*Berl. tierärztl. Wochenschr. 36*, 519.
— und —	1921	*Berl. tierärztl. Wochenschr. 37*, 349, en 449.
— und K. TRAUTWEIN	1921	*Berl. tierärztl. Wochenschr. 38*, 35.
— und —	1928	*Berl. tierärztl. Wochenschr. 44*, 205.
— und H. C. NAGEL	1939	in: "Handbuch der Viruskrankheiten", Band I. Herausgeg. von E. GILDEMEISTER, E. HAAGEN und O. WALDMANN. Fischer, Jena.
WALKER, D. L. and F. L. HORSFALL	1950	*J. exp. Med. 91*, 65.
WEDGWOOD, R. J. c.s.	1956	*J. exp. Med. 104*, 707.
WESSLÉN, T. and Z. DINTER	1956	*Nord. Vet. Med. 8*, 795.
WIGMORE, J. O. and W. M. HENDERSON	1955	*Nature 176*, 516.
WILLEMS, R.	1953	*Bull. Off. int. Epiz. 40*, 487.
— et L. LEUNEN	1955	*Bull. Off. int. Epiz. 43*, 671.
— e.a.	1958	*Bull. Off. int. Epiz. 49*, 182.
WILSON, G. S. and A. A. MILES	1955	in: "Topley and Wilson's Principles of Bacteriology and Immunology". 4th ed. The Williams and Wilkins Company, Baltimore.
ZAHRAN, G. E.	1956	Acad. Proefschr. Utrecht.
ZWOL, H. van	1949	Acad. Proefschr. Utrecht.

ERRATA

Blz. 4, 4e alinea
staat: Deze mening werd *die* niet door PFAB (1927) gedeeld.
Hierin moet het woordje *die* vervallen.

Blz. 22, noot
staat: *encephalitus-serum:*
dit moet zijn: *encephalitis-serum:*

Blz. 27, 3e alinea, 1e zin
staat: *chlorioallantoismembraan;*
dit moet zijn: *chorioallantoismembraan.*

Blz. 114, tabel 40
staat achter rund no. 436 in de kolom enting een *1;*
dit moet zijn *2.*

Blz. 114, tabel 40
staat achter rund no. 438 in dezelfde kolom een *2;*
dit moet zijn *1.*

Behoort bij Verslagen van Landbouwkundige Onderzoekingen Nr 65.8 „Neutraliserende antistoffen in sera van tegen mond- en klauwzeer geënte runderen".