

# Pathogenese van Colibacillose bij vleeskuikens

---

IMMUUNRESPONS NA INOCULATIE MET VERSCHILLENDE ANTIGENEN TOEGEDIEND  
VIA HET RESPIRATIEAPPARAAT



A.G. Smit, BSc.  
Sept – Dec 2011

Supervisie:  
M.G.R. Matthijs, DVM, PhD

Universiteit Utrecht, Faculteit Diergeneeskunde,  
*Departement Gezondheidszorg Landbouwhuisdieren.*

## Inhoudsopgave

1. Samenvatting.....	3
2. Introductie.....	4
<i>Escherichia coli</i> ( <i>E. coli</i> ).....	5
Colibacillose.....	6
Incubatietijd .....	6
Infectieroute.....	6
Klinische symptomen .....	6
3. Proefopzet.....	8
Kuikens en isolatoren .....	8
Licht en temperatuur .....	8
Materiaal en methode .....	8
<i>Antigenen</i> .....	8
Geïnactiveerde NCD (New Castle Disease) vaccivirus clone 30:.....	9
Geïnactiveerde <i>E. coli</i> .....	9
Erythrocyten van schapen (SRBC) .....	9
Human Serum Albumin (HuSA) .....	10
Phosphate buffered Saline (PBS).....	10
<i>Inoculatie protocol</i> .....	10
<i>Bloedafname</i> .....	10
Haemagglutinatie remming test (HAR) .....	11
Humorale immuunrespons tegen HuSA en LPS .....	11
Agglutinatie .....	11
<i>Gewichtstoename</i> .....	12
4. Resultaten .....	13
Postmortaal onderzoek.....	13
Bloed analyses.....	17
Geïnactiveerde NCD (New Castle Disease) vaccivirus Clone 30:.....	17
Geïnactiveerde <i>E. coli</i> .....	19
Erythrocyten van schapen (SRBC) .....	24
Human Serum Albumine (HuSA) .....	27
Gewichten .....	32
5. Conclusie/ Discussie .....	34
Postmortaal onderzoek .....	34
Bepalingen van de hoeveelheid gevormde antilichamen .....	35

Geïnactiveerde NCD vaccin virus.....	35
Geïnactiveerde E. coli.....	35
Erythrocyten van schapen (SRBC) .....	36
Human Serum Albumine (HuSA) .....	36
6. Acknowledgements .....	37
7. Referenties .....	38
8. Bijlagen .....	40
Bijlage I: Globale groepsindeling .....	40
Bijlage II, Inoculatie volumes.....	41
Bijlage III, Welzijnslogboek.....	42
Bijlage IV: Postmortaal onderzoek: .....	44
Bijlage V, Gewichten (gram).....	48

## 1. Samenvatting

Dit onderzoek is een onderdeel van een groter overkoepelend project, dat als doel heeft om meer inzicht te krijgen in de pathogenese van colibacillose bij vleeskuikens. In dit project is de belangrijkste onderzoeksvraag: wordt de verhoogde gevoeligheid voor colibacillose na een virale infectie veroorzaakt door vermeerdering van het virus in de luchtwegen of door een immuunrespons opgewekt door aanwezigheid van een antigeen in de luchtwegen?

Om dit te kunnen beantwoorden is in dit pilot experiment eerst vastgesteld of, en in welke mate verschillende dode antigenen een immuunrespons teweeg brengen. Hiervoor zijn 124 vleeskuikens gewogen, geselecteerd en verdeeld in 10 proefgroepen. In elke proefgroep zijn er 10 kuikens geplaatst die of geïnactiveerde New Castle Disease (NCD) vaccivirus, Human Serum Albumine (HuSA), erythrocyten van schapen (SRBC) of geïnactiveerde *Escherichia coli* (*E. coli*) kregen toegediend en 3 kuikens die zijn geïnoculeerd met PBS. In de controle groepen E1 en E2 zijn ieder 10 dieren aanwezig die tevens werden geïnoculeerd met PBS. Er is gebruik gemaakt van 2 verschillende inoculatie protocollen. De groepen A1, B1, C1, D1 en E1 zijn gedurende 7 opeenvolgende dagen geïnoculeerd en de groepen A2, B2, C2, D2 en E2 gedurende 4 opeenvolgende dagen.

Op 3 verschillende momenten is bij alle kuikens bloed afgenomen. Voor aanvang van de proef werden ook van de Surplus kuikens bloed verzameld. In dit serum werden de hoeveelheid antilichamen bepaald tegen de toegediende antigenen. Men kan hier uit concluderen dat er specifieke antilichamen tegen het geïnactiveerde NCD vaccivirus, IgM antilichamen tegen *E. coli* en IgG antilichamen tegen HuSA op te wekken zijn na intratracheale en nasale inoculatie van de verschillende antigenen. Na inoculatie met SRBC zijn er bij de geïnoculeerde kuikens ook antilichamen tegen SRBC gevonden. Het verschil tussen de test en controle dieren is aanwezig, echter dit verschil hangt af van het moment van bloedafname waardoor de resultaten lastiger te beoordelen zijn.

## 2. Introductie

Colibacillose is een veel voorkomende bacteriële infectie, veroorzaakt door de bacterie *Escherichia coli* (*E. coli*), en is een van de meest belangrijke oorzaken van economische verliezen in de intensieve vleeskuikenhouderij [1] [2]. Ernstig zieke dieren, een sterk gedaalde groei, verhoogde voederconversie, een groot verlies aan uniformiteit in de koppel, verhoogde sterfte, sterk verhoogd antibioticum gebruik en afkeuringen in het slachthuis zijn onder andere de oorzaak van deze economische verliezen [2] [3]. Terwijl aërogeen besmetting bij vleeskuikens met *E. coli* voornamelijk luchtzakontstekingen veroorzaken, welke binnen enkele dagen te overwinnen is, treedt er een ernstiger ziektebeeld (colibacillose) op wanneer het dier voorafgaand besmet is met een virale infectie, bijvoorbeeld het Infectieuze bronchitis virus (IBV) [4].

Voor de verhoogde gevoeligheid voor bacteriële infecties na een virale infectie zijn 2 hypothesen beschreven [4]. De eerste hypothese voor het ontstaan van deze verhoogde gevoeligheid is dat het immuunapparaat bezig is om het virus te bestrijden waardoor de bacterie makkelijker kan aanslaan [5] [6]. De 2<sup>e</sup> hypothese is dat deze verhoogde gevoeligheid komt door weefselbeschadiging, veroorzaakt door de virale infectie waardoor bacteriën makkelijker kunnen binnen dringen [7] [8].

Door de pathogenese te bestuderen van colibacillose bij vleeskuikens kan er meer gericht naar een therapie/behandeling/oplossing worden gezocht. Dit leidt mogelijk tot een vermindering in het gebruik van antibiotica, wat een positieve bijdrage kan leveren aan de reductie van de humane en veterinaire antibioticaresistentie problematiek, en kan mogelijk welzijnsproblemen en economische schade in de vleeskuikenhouderij als gevolg van colibacillose beperken.

Dit onderzoek is een onderdeel van een groter overkoepelend project, dat als doel heeft om meer inzicht te krijgen in de pathogenese van colibacillose bij vleeskuikens. In dit project is de belangrijkste onderzoeksvraag: wordt de verhoogde gevoeligheid voor colibacillose na een virale infectie veroorzaakt door vermeerdering van het virus in de luchtwegen of door een immuunrespons opgewekt door aanwezigheid van een antigeen in de luchtwegen?

Om dit te kunnen beantwoorden zal er allereerst moeten worden vastgesteld of, en in welke mate, applicatie van verschillende typen antigenen inderdaad een immuunrespons teweeg brengen en welk inoculatieprotocol het meest geschikt is om een meetbaar immuunrespons te genereren.

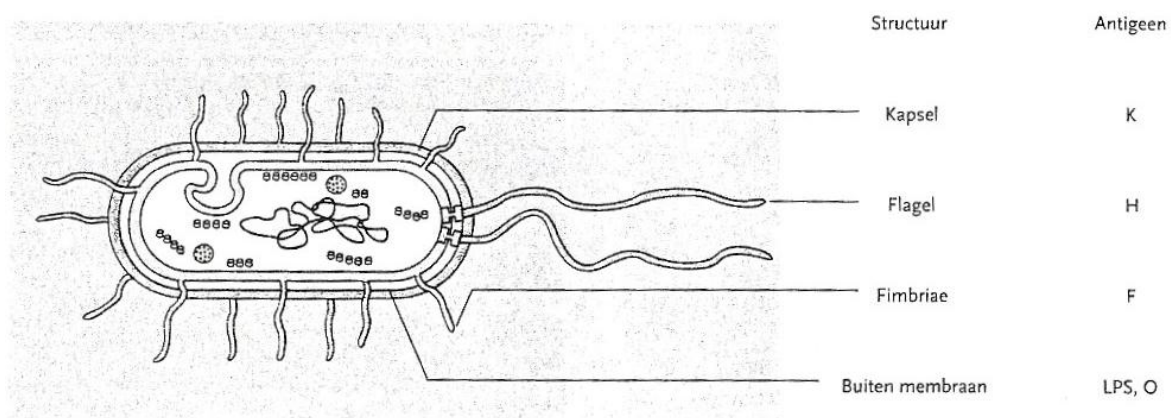
In dit pilotexperiment wordt er daarom bepaald welk inoculatieprotocol het meest geschikt is voor het induceren en kunnen meten van een immuunrespons na inoculatie met een geïnactiveerd New Castle Disease (NCD) vaccinvirus, een afgedode *E. coli* stam, schapenerythrocyten (SRBC) en Human Serum Albumin (HuSA). Voor deze groepen is nog onbekend bij welk inoculatieprotocol een dusdanig immuunrespons wordt opgewekt na toediening van de verschillende antigenen. Dit is nodig om in toekomstig onderzoek bovengenoemde onderzoeksvraag te antwoorden.

## *Escherichia coli* (*E. coli*)

Colibacillose wordt geheel of gedeeltelijk veroorzaakt door verschillende *E. coli* stammen, deze worden ook wel aangeduid als aviaire pathogene *E. coli* (APEC) [9]. *Escherichia coli* behoort tot de familie van de Enterobacteriaceae, welke is samengesteld uit organismen die zowel aëroob als anaëroob kunnen groeien. Om te kunnen groeien, maakt de *E. coli* gebruik van eenvoudige koolstof en stikstofbronnen [2] [10].

*E. coli* is een gramnegatieve, staaf vormige, niet zuurvaste en een niet sporen vormende bacterie, welke meestal 2-3 x 0.6 µm groot is. De meeste bacteriën zijn beweeglijk en hebben flagellen. *E. coli* groeit zowel aëroob als anaëroob wanneer de temperatuur tussen de 18°C en 44°C ligt. De generatietijd is afhankelijk van de temperatuur. Daarnaast kan deze bacterie lang overleven, voornamelijk onder droge omstandigheden [2].

Op basis van antigene structuren worden de *E. coli* bacteriën in verschillende serotypes ingedeeld. De belangrijkste antigene structuren betrokken bij deze serotypering zijn: O-antigeen (somatisch antigeen), K-antigeen (kapsel/oppervlakte-antigeen), H-antigeen (flagellair antigeen) en F-antigeen (geassocieerd aan fimbriae/pili) (Zie figuur 1) [11].



**Figuur 1: Lokalisatie van de belangrijkste antigenestructuren betrokken bij de serotypering van *E. coli*. [11]**

*E. coli* is een veel voorkomende darmbewoner bij pluimvee, meestal bevat 1 gram darminhoud tussen de  $10^4$  en  $10^7$  kolonie vormende units (CFU) *E. coli* [9]. Deze intestinale *E. coli* kunnen als reservoir dienen voor de virulente (ziekmakende) serotypen. Niet alleen in de darmen maar ook in de omgeving komt de bacterie voor. Het stof in pluimveestallen kunnen  $10^5$ -  $10^6$  *E. coli*/ gram bevatten. Voedsel, water en ongedierte kunnen een bron zijn van nieuw geïntroduceerde serotypen in de stal [2] [12].

## Colibacillose

Kippen van elke leeftijd zijn gevoelig voor colibacillosis, maar het komt voornamelijk voor bij jonge dieren. Bij kuikens zien we ook dat de ernst van de aandoening groter is [2] [13] [14]. Vleeskuikens van 4 à 6 weken oud zijn na een primaire virale infectie gevoelig voor *E. coli*. Vooral gedurende het najaar en de winterperiode worden vaak uitbraken van colibacillose in vleeskuikenstallen waargenomen [3] [4].

Vergeleken met de bacteriële virulentie factoren, spelen gevoeligheid en resistentie factoren van de gastheer waarschijnlijk een gelijke of grotere rol in het voorkomen van colibacillose [2]. (Zie tabel 18.4 in het boek 'Disease of poultry' [2] bladzijde 701, voor de verschillende factoren waarvan vermoed wordt dat deze een rol spelen in de toename van gevoeligheid voor colibacillose).

De symptomen van colibacillose worden waarschijnlijk alleen gezien wanneer er andere predisponerende factoren aanwezig zijn [9]. Gezonde volwassen dieren met een intact immuunsysteem zijn goed bestand tegen de normaal voorkomende *E. coli* blootstelling, inclusief de virulente stammen [2].

## Incubatietijd

De incubatietijd is meestal kort, maar varieert per ziektebeeld en met de mate van virulentie van de *E. coli*. Bij experimentele studies ligt de incubatietijd meestal tussen de 1-3 dagen wanneer dieren bloot worden gesteld aan een groot aantal virulente *E. coli*, in het veld duurt het iets langer en ligt de incubatietijd tussen de 5-7 dagen wanneer er predisponerende factoren mee spelen, zoals Infectieuze Bronchitis Virus (IBV) [2].

## Infectieroute

De infectieroute is aërogeen (per inhalatie), colibacillose is uitsluitend onder extreme omstandigheden oraal te induceren [3].

## Klinische symptomen

APEC is verantwoordelijk voor een groot aantal verschillende ziektes op verschillende leeftijden. De klinische symptomen variëren van totale ongevoeligheid, subklinische symptomen tot sterfte [2]. In het veld is colibacillosis gekarakteriseerd door een matige mortaliteit, een lage tot matige incidentie van septische laesies en een hoog percentage van kippen met airsacculitis [4] [15].

Vleeskuikens lijdend aan colibacillose zijn ziek, vertoont ademnood en groeiachterstand. Mortaliteit blijft meestal onder de 5%, maar de morbiditeit is vaak meer dan 50% [4] [9]. Verschillende pathologische verschijnselen worden gezien bij pluimvee: coli-septicemie, coli-granulomatose, luchtzakontsteking, cellulitis, swollen head syndrome, peritonitis, salpingitis, enteritis, osteomyelitis, arthritis, panophthalmie en dooierrest-ontsteking [4] [3].

Een koppel die aan coli-septicemie lijdt, vertonen passief gedrag, waarbij er een slechte voer/wateropname wordt gezien. Met als gevolg een vertraagde groei en uitdroging van de dieren. Ernstig zieke individuele dieren reageren matig op prikkels en zijn gemakkelijk te vangen. Ze zitten met hun ogen dicht in een gebogen positie met afhangende kop, nek en vleugels. De snavel leunt op de grond om de kop te ondersteunen, waarna deze dieren vaak sterven. Dieren lijdend aan coli-septicemie zijn meestal kleiner in vergelijking met de rest van de koppel en worden meestal gevonden langs de muren van de schuur of onder de drinknippels en voerbakken [2]. Dieren die de septicemie overleven kunnen later andere pathologische bevindingen krijgen. *E. coli* kan tijdens de

septicemie verspreiden door het gehele lichaam en op verschillende plaatsen voor problemen gaan zorgen zoals coli-granulomatose, luchtzakontsteking, cellulitis, swollen head syndrome, peritonitis, salpingitis, enteritis, osteomyelitis, arthritis, panophthalmie en dooierrest-ontsteking [4] [3].

Wanneer gewrichten of botten van één van de poten zijn aangetast, lopen de kippen met een karakteristieke 'hinkelpas' om zo de aangetaste poot te ontlasten. Kippen waarbij beide poten zijn aangetast verplaatsen zich niet of nauwelijks en hebben zichtbaar grote moeite met staan en lopen. Wanneer de thoracolumbale wervelkolom aangetast is, hebben de kippen een gebogen rug, zitten op hun hakken en verdragen maar weinig tot geen gewicht op hun poten. Dieren met chronische kreupelheid hebben smerige veren, voornamelijk de buik en de achter kant zitten onder de uitwerpselen. De ontlasting is groen met witte tot gele uraten als gevolg van anorexia en dehydratie [2].

Necrotische dermatitis, ook wel bekend als cellulitis, wordt gekenmerkt door een chronische ontsteking van de subcutis op de buik en dijen [2]. De getroffen dieren vertonen meestal geen klinische symptomen en de letsels worden soms op het moment van het slachten pas ontdekt [16].

Swollen head syndrome (SHS) wordt veelal gezien bij vleeskuikens, het veroorzaakt oedemen in de craniale en periorbitale huid en bij leghennen kan het een reductie van de eiproductie geven (2 tot 3 % daling). Wanneer deze symptomen gezien worden ligt de mortaliteit op ongeveer 3 tot 4% [9].

Het belangrijkste symptoom van een colibacillose uitbraak in een koppel is toch wel verhoogde sterfte. En omdat colibacillose vaak wordt gezien na een virale infectie kunnen klinische verschijnselen van de virale infectie gezien worden naast verschijnselen van colibacillose zelf [2].



### 3. Proefopzet

#### Kuikens en isolatoren

18-daagse bebroede specific pathogen free (SPF) eieren, afkomstig van GD Deventer, worden uitgebroed in de proefdierfaciliteit van de faculteit Diergeneeskunde, Universiteit Utrecht. Bij uitkomst zijn de 124 vleeskuikens gewogen, geselecteerd en verdeeld in proefgroepen. In elke isolator zijn er 10 kuikens geplaatst die of geïnactiveerde New Castle Disease (NCD) vaccivirus, Human Serum Albumine (HuSA), erythrocyten van schapen (SRBC) of geïnactiveerde *Escherichia coli* (*E. coli*) krijgen toegediend en 3 contactdieren die zijn geïnoculeerd met PBS. In de controle groepen E1 en E2 zijn ieder 10 dieren aanwezig die tevens worden geïnoculeerd met PBS.

De isolatoren met een afmeting van 160 cm x 57 cm x 67cm (lxbxh) zijn van te voren gedesinfecteerd met van Formaline gas.

De kuikens zijn *ad libitum* gevoerd met volledig diervoeder voor opfokleghennen Besterfood® (OPFME F1, registratienummer: AlphaNL 01140).

Daarnaast hadden de kuikens *ad libitum* toegang tot vers drinkwater.

De waterleidingen werden voor aanvang van het experiment gedesinfecteerd met Clidox®.

#### Licht en temperatuur

Zie voor de temperatuur en het licht regime tabel 1.

Leeftijd in dagen	Temperatuur (°C)	Licht (uren)
1	38	23 wit
2	36	
3	34	
4	33	23 rood
5	31	
6	30	16 rood
7	29	
8	28	
9	27	
13	26	
15	25	
21	24	
23	23	

Tabel 1: Temperatuur en lichtregime, aangepast aan de hand van de leeftijd in dagen.

#### Materiaal en methode

##### *Antigenen*

Om te kunnen vaststellen of en in welke mate verschillende typen antigenen een immuunrespons teweeg brengen, is er in dit experiment gebruik gemaakt van verschillende antigenen waar de kuikens aan blootgesteld werden doormiddels van intratracheale, oculaire en intranasale inoculatie. De typen antigenen waar gebruik van zijn gemaakt in dit experiment zijn: geïnactiveerde NCD

vaccinivirus Clone 30, geïnactiveerde *E. coli* 506 (078 : K80), erythrocyten van schapen (SRBC) en Human Serum Albumin (HuSA). De controle dieren zijn geïnoculeerd met phosphate-buffered saline (PBS).

### **Geïnactiveerde NCD (New Castle Disease) vaccinivirus clone 30:**

Het NCD vaccinivirus 5050007 (Batch: W 260711) afkomstig van GD Deventer, werd geïnactiveerd doormiddel van formalhyde, zoals beschreven is door J.H.H. van Eck [17].

SPF eieren (10 dagen oud) zijn geënt met ieder 0.2 ml 1:400 verdund NCD vaccinivirus clone 30, daarna zijn de eieren afgedicht met paraffine. De allantoisvloeistof, welke werd afgenomen 4 dagen na enting, bevatte een virus titer van  $10 \pm 10,5$  EID<sub>50</sub>/ml en 5020 haemagglutinatie units (HAU)/0,025ml. De inactivatie werd uitgevoerd met formaldehyde bij een temperatuur van 4 tot 6°C gedurende 3 weken: aan elke liter allantois vocht werd 7,5 ml 10% formaldehydeoplossing toegevoegd. De virusinactivatie worden gecontroleerd door twee maal achtereenvolgend te enten met het afgedode virus in eieren waarbij wordt gecontroleerd of het virus zich vermeerderd. Na inactivatie bevatte het allantoisvloeistof 1024 HUA/ 0,025 ml, 17 mg droge stof/ml en 70.7 mg eiwit/100 mg droge stof. De eiwitbepaling werd uitgevoerd volgens de methode van Lowry *et al.* [18].

Deze methode van Lowry *et al.* is de meest gebruikte methode om de hoeveelheid eiwit te bepalen in een monster. In het kort een beschrijving van deze methode: het Folin-fenolreagens, dit is een mengsel van natriumtungstaat, natriumfosfaat, natriummolybdaat en natriumtartraat, wordt gemengd met kopersulfaat in aanwezigheid van de eiwitoplossing (allantoisvloeistof). Hierdoor ontstaat er een blauwe tot paarse kleur, welke kan worden gekwantificeerd door licht absorptie bij 750nm. Deze lichtabsorptie is een maat voor de concentratie van de gereduceerde componenten, deze concentratie is gerelateerd aan de eiwitconcentratie [18].

De geïnactiveerde NCD vaccinivirus werd steriel in porties van 20ml verpakt en opgeslagen in -70°C. Voor inoculatie werd de benodigde hoeveelheid (1 portie) langzaam ontdooid tot kamertemperatuur.

### **Geïnactiveerde *E. coli***

De *E. coli* (078 : K80) is gemaakt door GD Deventer, Omdat het exacte protocol niet verstrekt mocht worden hierbij de globale werkwijze om *E. coli* te inactiveren: *E. coli* is gekweekt gedurende 24 uur op een bloedagarplaat. Eén van de gevormde *E. coli* kolonies werd gesuspenderd in een fysiologisch zout oplossing met formaline (deze suspensie bevatte hierna ongeveer  $10 \pm 8$  *E. coli*). Deze oplossing wordt vervolgens gedurende 1 nacht in een stoof met een temperatuur van 37°C gezet om de *E. coli* af te doden. Hierna is er een steriliteitscontrole ingezet (gedurende 5 dagen in een stoof op een temperatuur 37°C), hiervan is een afent gemaakt. Indien er geen bacterie groei was in deze controle, is de inactivatie succesvol uitgevoerd.

### **Erythrocyten van schapen (SRBC)**

De SRBC zijn afkomstig van Oxoid B.V. (Sheep Blood in Alsevers Solution, code: SR0053). Voor inoculatie is er gebruik gemaakt van een 1% oplossing SRBC.

De rode bloedcellen zijn gewassen in PBS. Daarna werden ze gecentrifugeerd op 1300 rpm gedurende 5 min, met een acceleratie snelheid van 8 m/s en een lage afremming. Uiteindelijk na 2 x wassen werden de SRBC verdund met PBS tot een 1% oplossing (1 ml Packed cells in 99 ml PBS).

### **Human Serum Albumin (HuSA)**

De HuSA (A8763) is afkomstig van Sigma-Aldrich Inc (St. Louis, MO). Deze is opgelost in PBS tot 1mg/ml oplossing.

### **Phosphate buffered Saline (PBS)**

De controle dieren zijn intra-tracheaal en oculonasaal geïnoculeerd met PBS (Cat N°: BE17-512, Lot N°: 1MB160).

### ***Inoculatie protocol***

Op de dag van uitkomst (dag 0) zijn de kuikens verdeeld in 10 groepen: A1, A2, B1, B2, C1, C2, D1 en D2 met ieder 13 dieren en de 2 controle groepen E1 en E2 met ieder 10 dieren. De kuikens zijn op basis van gewicht over de groepen verdeeld, zodat de uniformiteit over de groepen zo hoog mogelijk was (gemiddelde uniformiteit was 92%). In de groepen A1, A2, B1, B2, C1, C2, D1 en D2 zaten 11 kuikens met een gewicht van tussen de 40-50 gram en 2 kuikens met een gewicht van tussen de 30-40 gram. De controle groepen E1 en E2 bevatten ieder 9 kuikens met een gewicht van tussen de 40-50 gram en 1 kuiken met een gewicht van 30-40 gram. Hierdoor ligt het gemiddelde gewicht per groep op ongeveer 42 gram.

Vanaf 1 dag leeftijd zijn de kuikens intra-tracheaal/ oculonasaal geïnoculeerd met, groep A) geïnactiveerde NCD vaccinvirus clone 30; B) afgedood *E. coli*; C) SRBC; D) HuSA; E) PBS (controle groep). Tevens bevat elke groep, met uitzondering van de groepen E1 en E2, 3 contactdieren welke met PBS geïnoculeerd zijn (zie bijlage I). Ieder dier kreeg 0,3 ml opgelost antigeen toegediend verdeeld over de 3 inoculatie plaatsen: 0,1 ml intra-tracheaal, 0,05 ml intra-nasaal en 0,05 ml intra-oculair (zie Bijlage II, Inoculatie volumes).

De intratracheale inoculatie werd uitgevoerd met een kleine anaalcanule van 1,5 x 45mm (AUV coöperatie dierenartsen, artikelnummer 14186) en een 1ml spuit. De anaalcanules werden tussen elke groep gedesinfecteerd met alcohol en nagespoeld met Aquadest. Per groep werd elke dag een nieuwe 1ml spuit gebruikt voor inoculatie van de dieren. Het intra-oculaire en intra-nasale inoculaat werd toegediend met een druppelflesje, per antigeen werd per dag een nieuw flesje gebruikt.

Er is gebruik gemaakt van 2 verschillende inoculatie protocollen. Bij de groepen A1, B1, C1, D1 en controle groep E1 werd het protocol gebruikt waarbij de vleeskuikens 7 dagen na elkaar geïnoculeerd zijn, terwijl de groepen A2, B2, C2, D2 en controle groep E2, gedurende 4 dagen zijn geïnoculeerd (zie bijlage I).

### ***Bloedafname***

Om de immuunrespons na inoculatie te meten en te vergelijken is er op 3 verschillende momenten (dag 14, 21 en 28) bloed afgenomen van alle kuikens. Voor aanvang van de proef is tevens bloed afgenomen bij de Surplus dieren (dag 0).

Nadat het bloed was afgenomen werd het in de koelkast (4°C) bewaard, waarna het serum 2 dagen later werd overgegoten in Micronic® buisjes (Micronic Europe B.V., artikelnummer: MP32022). De Micronicbuisjes werden bewaard bij een temperatuur van -17°C.

In het serum, verkregen uit de verschillende groepen, werden de hoeveelheid antilichamen bepaald. In de groepen A1 en A2 zijn de antilichamen gericht tegen de geïnactiveerde NCD vaccinvirus bepaald doormiddel van een heamatoglutinatieremmingstest. In de groepen B1 en B2 zijn de hoeveelheid

antilichamen gericht tegen de geïnactiveerde *E. coli* doormiddel van ELISA bepaald. De groepen C1 en C2 zijn de hoeveelheid antilichamen gericht tegen SRBC bepaald doormiddel van agglutinatie. In de groepen D1 en D2 zijn de hoeveelheid antilichamen gericht tegen HuSA bepaald doormiddel van ELISA. In de controle groep E werd de hoeveelheid antilichamen bepaald van alle antigenen waarmee gewerkt was, geïnactiveerde NCD vaccinvirus, geïnactiveerde *E. coli*, SRBC en HuSA.

De contact dieren binnen elke groep zijn random verdeeld en de analisten wisten niet welke dieren de contact dieren waren. Het bloed van deze controle dieren werden net als de gehele groep waarin zij zitten getest op het type antigeen welke is toegediend aan die groep.

### **Haemagglutinatie remming test (HAR)**

De antilichaamtiter tegen het geïnactiveerde NCD vaccinvirus werd bepaald door middel van de Haemagglutinatie remmings test, uitgevoerd door GD Deventer.

Beschrijving in het kort van de Haemagglutinatie remmings (HI) test: In elke well wordt 0.025ml tweevoudige verdund serum (in PBS) en 0.025ml 4 haemagglutinatie antigeen units bij elkaar gevoegd. Na 15-30 minuten wordt 0.025 ml 1% oplossing rode bloedcellen van kippen toegevoegd, waarna deze voorzichtig gedurende 45 minuten worden gemengd. Daarna wordt de HI titer bepaald, de hoogste HI titer is de hoogste verdunning van het serum welke een complete remming van de haemagglutinatie units veroorzaakt. Dit wordt gecontroleerd door de platen te kantelen, de wellen welke met dezelfde snelheid als de controle wellen uitvloeien worden geregistreerd als geremd.

### **Humorale immuunrespons tegen HuSA en LPS**

De totale hoeveelheid antilichamen tegen HuSA en LPS (*E. coli*) in het plasma van de groepen B1 en B2(LPS), D1 en D2 (HuSA) zijn bepaald doormiddel van ELISA zoals beschreven door H.K. Parmentier *et al.* [19].

In het kort de ELISA beschreven: 95-well plaat gecoat met 100µl per well, die of 4µg/ml HuSA of 4µg/ml LPS bevatte. Na het spoelen van de plaat met 0.05% Tween bevattende PBS, werden de platen geïncubeerd met “serial four step double dilution” van plasma in PBS, welke 1% paardenserum en 0.05% Tween bevatte. Binding van kip-antilichamen tegen HuSA of LPS werd gedetecteerd na 1 uur incubatie op kamer temperatuur met konijn anti-kip IgG<sub>H+L</sub> gekoppeld aan peroxidase. De konijn anti- kip antilichamen zijn 1:20.000 verdund in PBS (afkomstig van Nordic, Tilburg). Daarnaast werden IgM en IgG- antilichaam bindingen aan HuSA of LPS bepaald. Na incubatie met “serial four step double dilution” van plasma in PBS en na het spoelen, worden aan HuSA of LPS gebonden isotype-specifieke antilichamen gedetecteerd door middel van 1:20.000 verdunde geiten anti-kip IgM gekoppeld aan PO (GACH/IgM/PO), 1:20.000 verdunde GACH/IgA/PO of 1:20.000 verdunde geiten anti-kip IgG<sub>Fc</sub>gekoppeld aan PO. Na spoelen werd tetramethylbenzidine en 0.05 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> toegevoegd en 10min geïncubeerd op kamer temperatuur. De reactie werd gestopt met 50µl 2.5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. De uitslag werd gemeten met een Multiscan (labsysteem, Heslinki, Finland) op een golflengte van 450nm [19].

### **Agglutinatie**

De totale hoeveelheid antilichamen tegen SRBC werden vastgesteld doormiddel van agglutinatie zoals beschreven door Van der Zijpp en Leenstra [20] [21].

De totale hoeveelheid antilichamen worden bepaald met een oplossing van 50 µl plasma en 50 µl PBS. De plasmamonsters worden individueel getitreerd (microtiter system Dynatech). Packed SRBC

worden tot een 2% oplossing opgelost in PBS. De hoeveelheid antilichamen worden bepaald door bij deze 2% packed SRBC oplossing een plasma oplossing toe te voegen tot er een volledige agglutinatie ontstaat. Deze titers worden uitgedrukt in log 2 als de reciproke waarde van die verdunning die nog volledig agglutineerd [20].

### ***Gewichtstoename***

Het gewicht van de vleeskuikens werd op verschillende momenten, dag 0, 7, 14, 21 en 28 gemeten. De gewichten van de dieren geïnoculeerd met een antigeen worden vergeleken met de gewichten van de kuikens die geïnoculeerd zijn met PBS. Bijkomend kan het niet groeien van de kuikens een indicatie zijn dat het inoculeren van antigenen eventuele invloed heeft op het gewicht van de kuikens.

## 4. Resultaten

Tijdens inoculatie viel het op dat de kuikens die werden geïnoculeerd met *E. coli* of NCD meer reageerden op de inoculatie en langer de tijd nodig om hadden hier van te herstellen dan bij de andere antigenen. Voornamelijk de dieren die geïnoculeerd werden met *E. coli* hadden op het oog meer tijd nodig om te herstellen, dit is niet gekwantificeerd.

Zie bijlage III voor verdere bijzonderheden gedurende de proef betreft het welzijn van de kuikens.

### Postmortaal onderzoek

Aan het einde van de proef, dag 28, werden de dieren geëuthanaseerd door elektrocutie en verbloeding. Daarna werd er postmortaal onderzoek bij deze dieren gedaan. Zie tabel 2, 3 en bijlage IV voor de gevonden afwijkingen bij sectie. De 8 dieren die zijn gestorven tijdens het experiment werden ingevroren en op het einde van het experiment werd ook op deze dieren sectie gedaan.

#### Orgaan afwijkingen

Bij in totaal 24 dieren in de proef, werd er femurkop- of femurhalsnecrose één- of beiderzijds gediagnostiseerd. Hiervan hadden 7 dieren dit in combinatie met andere afwijkingen welke van aard verschillend waren; gezwollen nieren (3 kuikens), donker rode nieren (1 kuiken), hydropericard (2 kuikens), hartenzakje vol met bloed (1 kuiken), rode lever (2 kuikens), te bleke lever (2 kuikens), brosse lever (1 kuiken), gezwollen lever (1 kuiken), ascites (1 kuiken).

Er zijn bij 13 dieren dooierrestanten gevonden, welke bij 2 dieren tot een peritonitis heeft geleid.

Bij de 4 dagen met antigenen geïnoculeerde dieren werden tijdens het postmortaal onderzoek 9 kuikens met ernstigere afwijkingen gevonden (meerdere afwijkingen kunnen tezamen in 1 dier voorkomen); hydropericard (2 kuikens), hartafwijkingen (2 kuikens), nierafwijkingen (4 kuikens), leverafwijkingen (4 kuikens), ascites (1 kuiken), dooierrestant peritonitis (1 kuiken). Twee kuikens waren, zonder enige op sectie gevonden afwijkingen, achter in de ontwikkeling. Van deze 4 dagen geïnoculeerde dieren waren er 7 controle dieren die eveneens afwijkingen vertoonden tijdens het postmortaal onderzoek. De afwijkingen die bij deze dieren werden gezien waren; hydropericard (4 kuikens), hartafwijking (1 kuiken), nierafwijkingen (2 kuikens), leverafwijkingen (3 kuikens) en dooierrestant peritonitis (1 kuiken).

Bij de 7 dagen geïnoculeerde dieren waren er 6 kuikens die afwijkingen vertoonden, buiten femurkop/hals necrose of dooierrestant (meerdere afwijkingen kunnen tezamen in 1 dier voorkomen); hydropericard (1 kuiken), gezwollen nieren (1 kuiken), leverafwijkingen (1 kuiken), ascites (1 kuiken), borstblaar (2 kuikens) en een afwijkende gal kleur (1 kuiken). Van de 7 dagen geïnoculeerde dieren waren er 5 controle kuikens die eveneens afwijkingen vertoonden tijdens het postmortaal onderzoek; hydropericard (2 kuikens), afwijkende nieren (1 kuiken), afwijkende lever (1 kuiken).

Als we deze gegevens uitsplitsen naar de verschillende groepen, zien we dat de meeste afwijkingen worden gezien in de groepen B1 en B2, de kuikens uit deze groepen waren met *E. coli* geïnoculeerd. Groep B1 had 4 kuikens met een afwijkend sectiebeeld: 1 kuiken met hydropericard, 1 kuiken met gezwollen nieren + gyritekening, 1 kuiken had een afwijkende galkleur, en de laatste had een ernstige vorm van ascitis en werd daarom voor het einde van het experiment geëuthanaseerd. Groep B2 had 3 kuikens met een afwijkend sectie beeld, 1 kuiken had donker rode nieren en een donker rood hart, dit kuiken is gestorven voor het einde van het experiment, 2 kuikens met een hydropericard in

combinatie met gezwollen nieren, één hiervan had ook ascites, leverafwijkingen en een vergroot hart.

***Tijdens het experiment gestorven dieren:***

Uit groep B1, welke *E. coli* gedurende 7 dagen toegediend kregen, is kuiken nummer 27<sub>G</sub> geëuthanaseerd op dag 26 omdat het humane eindpunt werd bereikt (zie het welzijnsprotocol). Deze redenen waren: sloomheid en het niet meer zelfstandig kunnen eten/drinken. Bij postmortaal onderzoek is er beiderzijdse femurkopnecrose en ernstige vorm van ascites geconstateerd.

Uit groep C1 is er een controle dier, kuiken nummer 39<sub>R</sub>, tijdens inoculatie gestorven. Postmortaal onderzoek wees uit dat bij het dier voer in de trachea terecht is gekomen waardoor het dier waarschijnlijk is gestikt.

Uit groep A2 is op de leeftijd van 17 dagen, een controle dier (kuiken nummer 11<sub>G</sub>) gestorven, bij postmortaal onderzoek is er beiderzijdse femurkopnecrose, te rode gezwollen nieren en een te rode lever gevonden.

In groep B2, welke *E. coli* gedurende 4 dagen toegediend kregen, zijn er 2 dieren gestorven. Op de leeftijd van 3 dagen is kuiken nummer 17<sub>G</sub> gestorven, bij postmortaal onderzoek werden er te rode nieren en een donker rood verkleurd hart gezien. Kuiken nummer 23<sub>G</sub> is geëuthanaseerd omdat het humane eindpunt werd bereikt (zie het welzijnsprotocol). Bij het kuiken op sectie werd een hydropericard, vergroot hart, gezwollen nieren met uraat neerslag een gezwollen lever en ascites gevonden.

In groep C2, welke SRBC gedurende 4 dagen toegediend kregen, is kuiken nummer 38<sub>G</sub> gestorven op 22 dagen leeftijd. Tijdens postmortaal onderzoek zijn er gezwollen nieren gevonden.

En tot slot in de controle groep E2, welke gedurende 4 dagen geïnoculeerd zijn met PBS, zijn er 2 dieren gestorven. Kuiken nummer 14<sub>O</sub> op 3 dagen leeftijd, hierbij werd een hartzakje gevuld met bloed en een gezwollen/ te rode lever gevonden bij sectie. Kuiken nummer 12<sub>O</sub>, gestorven op 17 dagen leeftijd, had dooierperitonitis.

Groep:	Kip nr:	Femurkopnecrose (Eenzijdig)	Femurkopnecrose (Beiderzijds)	Femurhalsnecrose (Eenzijdig)	Femurhalsnecrose (Beiderzijds)	Dooierrestant	Dooierrestant peritonitis	Hydropericard	Hartzakje vol bloed	Vergroot hart	Te rood hart	Gezwellen nieren	Nier te rood	Gyri tekening	Uraat neerslag	Bleke lever	Gezwellen lever	Lever te rood	Brosse lever	Vervette lever	Gestuwde lever	Ascites	Voer in trachea	Achter in ontwikkeling	Borstblaar	Afwijkende galkleur	Tijdens experiment gestorven
<b>A1</b>	2 <sub>R</sub> (PBS)	X																									
	3 <sub>R</sub>		X																								
	5 <sub>R</sub>	X																									
	12 <sub>R</sub>	X																									
<b>B1</b>	17 <sub>R</sub> (PBS)					X																					
	18 <sub>R</sub> (PBS)										X																
	19 <sub>R</sub>							X																			
	23 <sub>R</sub>																									X	
	24 <sub>R</sub>					X																					
	25 <sub>R</sub>										X	X															
	27 <sub>R</sub>		X																			X				X	
	28 <sub>R</sub> (PBS)	X														X											
<b>C1</b>	35 <sub>R</sub>					X																					
	39 <sub>R</sub> (PBS)																						X			X	
	41 <sub>R</sub> (PBS)	X																									
<b>D1</b>	48 <sub>R</sub>																			X							
	49 <sub>R</sub>	X																									
	50 <sub>R</sub>	X																									
	51 <sub>R</sub> (PBS)	X				X																					
	52 <sub>R</sub>																								X		
	55 <sub>R</sub>	X																									
<b>E1(PBS)</b>	2 <sub>O</sub>	X																									
	6 <sub>O</sub>							X																			
	7 <sub>O</sub>							X																			
	10 <sub>O</sub>	X																									

Tabel 2: Gevonden afwijkingen bij postmortaal onderzoek (7 dagen inoculatie).



Groep:	Kip nr:	Femurkopnecrose (Eenzijdig)	Femurkopnecrose (Beiderzijds)	Femurhalsnecrose (Eenzijdig)	Femurhalsnecrose (Beiderzijds)	Dooierrestant	Dooierrestant peritonitis	Hydropericard	Hartzakje vol bloed	Vergroot hart	Te rood hart	Gezwellen nieren	Nier te rood	Gyri tekening	Uraat neerslag	Bleke lever	Gezwellen lever	Lever te rood	Brosse lever	Vervette lever	Gestuwde lever	Ascites	Voer in trachea	Achter in ontwikkeling	Borstblaar	Afwijkende galkleur	Tijdens experiment gestorven
A2	1 <sub>G</sub>	X																									
	4 <sub>G</sub>		X																								
	10 <sub>G</sub>					X																					
	11 <sub>G</sub> (PBS)		X									X	X					X									X
B2	17 <sub>G</sub>										X	X															X
	18 <sub>G</sub>	X						X				X															
	19 <sub>G</sub> (PBS)	X						X								X			X								
	20 <sub>G</sub>	X																									
	21 <sub>G</sub> (PBS)							X																			
	23 <sub>G</sub>							X	X		X			X		X						X					X
	24 <sub>G</sub>	X																									
	25 <sub>G</sub>					X																					
C2	33 <sub>G</sub>																				X						
	34 <sub>G</sub>					X																					
	35 <sub>G</sub>																									X	
	36 <sub>G</sub>																									X	
	38 <sub>G</sub>	X				X						X															X
	39 <sub>G</sub>					X																X					
	40 <sub>G</sub>																					X					
D2	47 <sub>G</sub>	X																									
	48 <sub>G</sub>						X																				
	56 <sub>G</sub> (PBS)	X																									
E2 (PBS)	12 <sub>O</sub>						X																				X
	14 <sub>O</sub>				X				X								X	X									X
	15 <sub>O</sub>					X																					
	17 <sub>O</sub>					X		X																			
	20 <sub>O</sub>							X																			

Tabel 3: Gevonden afwijkingen bij postmortaal onderzoek (4 dagen inoculatie).

## Bloed analyses

Er is op 3 verschillende momenten (op 14, 21 en 28 dagen leeftijd) bloed afgenomen van alle kuikens. Bij de controle groepen E1 en E2 is het bloed alleen van dag 28 geanalyseerd. Voor aanvang van de proef is tevens bloed afgenomen bij de Surplus dieren, het bloed van deze dieren wordt gebruikt als referentiewaarde. Dit zijn de beginwaarden waarmee we de sera, afgenomen gedurende het experiment, vergelijken.

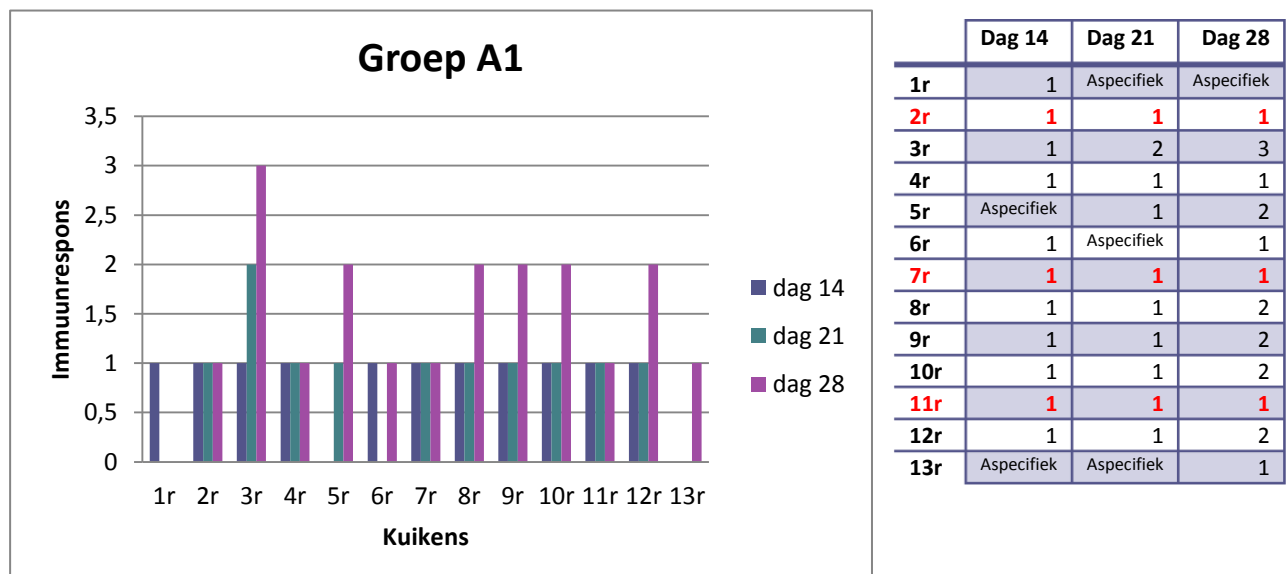
### Geïnactiveerde NCD (New Castle Disease) vaccivirus Clone 30:

Bij zowel de Surplus dieren als de controle dieren (28 dagen leeftijd) zien we een HAR titer van 1, dit staat gelijk aan geen aantoonbare antilichamen tegen het NCD vaccivirus (zie tabel 4). De antilichaamtiter van de testdieren worden daarom als positief gezien wanneer deze groter zijn dan 1.

Surplus dieren:		Groep E1:		Groep E2:	
Kuikennr:	Respons	Kuikennr:	Respons	Kuikennr:	Respons
1s	1	1o	1	11o	1
2s	1	2o	1	12o	Dood
3s	1	3o	1	13o	1
4s	1	4o	1	14o	Dood
5s	1	5o	Aspecifiek	15o	Aspecifiek
6s	1	6o	1	16o	1
7s	1	7o	1	17o	1
8s	1	8o	1	18o	1
9s	1	9o	1	19o	1
10s	1	10o	1	20o	1

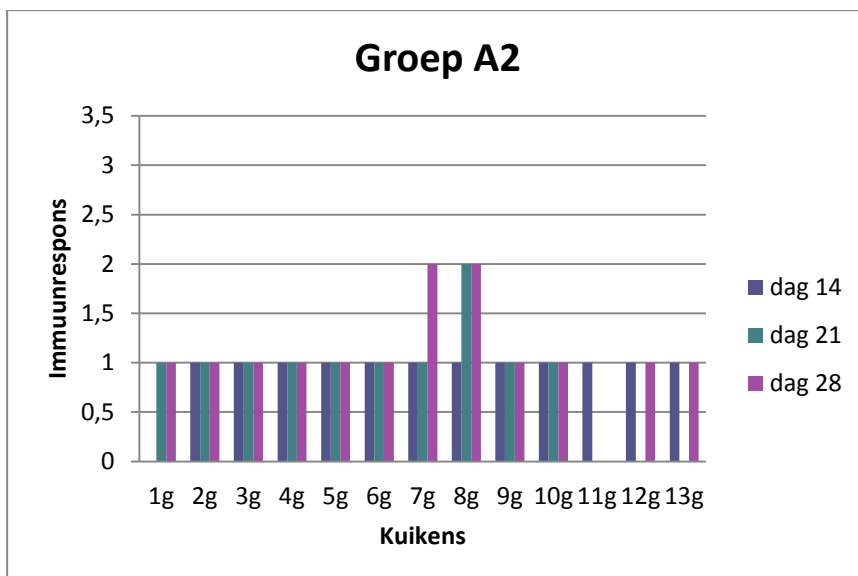
Tabel 4: Antilichamen tegen geïnactiveerde NCD vaccivirus, Surplus dieren & controle dieren (geïnoculeerd met PBS), groepen E1 en E2 (28 dagen leeftijd).

De kuikens die geïnoculeerd zijn met het geïnactiveerde NCD vaccivirus clone 30 vertonen antilichamen tegen het geïnactiveerde NCD vaccivirus. Als we de immuunrespons van de kuikens van groep A1 vergelijken met die van A2, zien we een verschil in de hoeveelheid antilichamen. De groep die 7 dagen geïnoculeerd is (groep A1), vormen meer antilichamen dan de dieren die 4 dagen geïnoculeerd zijn (groep A2) (zie grafiek 1 en 2, en de daarbij behorende tabellen).



Grafiek 1: Antilichamen tegen geïnactiveerde NCD vaccivirus, groep A1 (7 dagen geïnoculeerd met geïnactiveerde NCD vaccivirus).

\* De contactdieren zijn in de tabel in het rood aangegeven.



	Dag 14	Dag 21	Dag 28
<b>1g</b>	Aspecifiek	1	1
<b>2g</b>	1	1	1
<b>3g</b>	1	1	1
<b>4g</b>	1	1	1
<b>5g</b>	1	1	1
<b>6g</b>	1	1	1
<b>7g</b>	1	1	2
<b>8g</b>	1	2	2
<b>9g</b>	1	1	1
<b>10g</b>	1	1	1
<b>11g</b>	1	Dood	Dood
<b>12g</b>	1	Aspecifiek	1
<b>13g</b>	1	1	1

Grafiek 2: Antilichamen tegen geïnactiveerde NCD vaccivirus, groep A2 (4 dagen geïnoculeerd met geïnactiveerde NCD vaccivirus).

\* De contactdieren zijn in de tabel in het rood aangegeven.

Dit verschil is duidelijk te zien wanneer we het gemiddelde en de standaarddeviatie uitrekenen van de hoeveelheid in het bloed aanwezige antilichamen (zie tabel 5).

	Dag 14	Dag 21	Dag 28
<b>7 dagen geïnoculeerd</b>	1.0 ± 0.0	1.1 ± 0.4	1.8 ± 0.4
<b>4 dagen geïnoculeerd</b>	1.0 ± 0.0	1.1 ± 0.4	1.2 ± 0.7
<b>Surplus dieren</b>	1.0 ± 0.0		
<b>Controle groep E1</b>	1.0 ± 0.0		
<b>Controle groep E2</b>	1.0 ± 0.0		

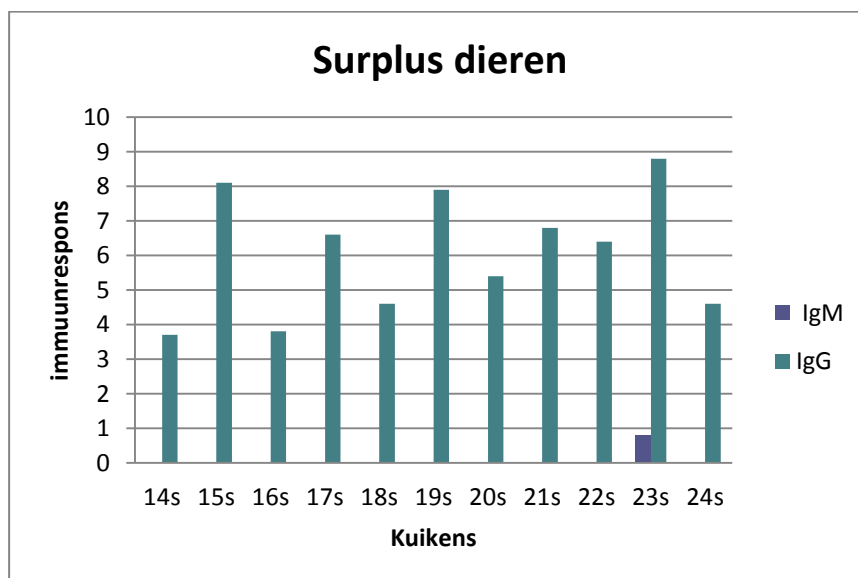
Tabel 5: Gemiddelde ± Standaarddeviatie, van de hoeveelheid antilichamen tegen geïnactiveerde NCD vaccivirus.

### Geïnactiveerde *E. coli*

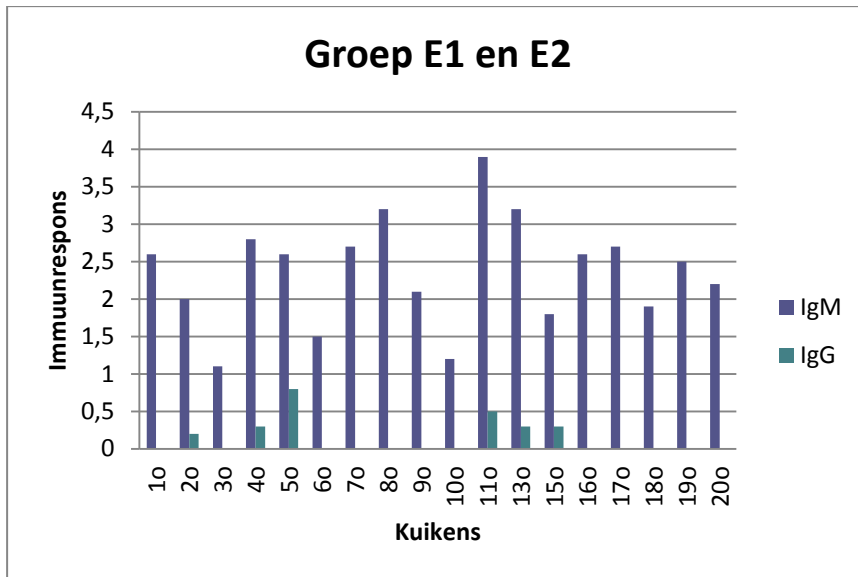
Bij de Surplus dieren werden geen IgM antilichamen tegen *E. coli* in het bloed gedetecteerd maar wel IgG antilichamen tegen *E. coli* (zie tabel 6 en grafiek 3). De hoeveelheid IgG antilichamen ligt tussen de 3,7 en de 8,8. Daarnaast is er ook bij de controle groepen E1 en E2 bloed afgenomen op 28 dagen leeftijd (zie tabel 6 en grafiek 4). Hierbij zien we een groot verschil met de Surplus dieren. Ondanks dat deze dieren alleen zijn geïnoculeerd met PBS zien we dat alle kuikens in deze 2 controle groepen wel IgM antilichamen tegen LPS vormen (zie tabel 7 voor het gemiddelde en standaarddeviatie). De hoeveelheid IgG antilichamen gevormd tegen LPS liggen bij de controle dieren lager dan bij de Surplus dieren. De Surplus dieren hebben een gemiddelde IgG titer van 6,1 terwijl de controle groepen E1 en E2 een gemiddelde IgG titer hebben van 0,1 (zie tabel 7).

Surplus dieren:			Groep E1:			Groep E2:		
Kuikennr:	IgM	IgG	Kuikennr:	IgM	IgG	Kuikennr:	IgM	IgG
14s	0	3,7	1o	2,6	0	11o	3,9	0,5
15s	0	8,1	2o	2	0,2	12o	Dood	Dood
16s	0	3,8	3o	1,1	0	13o	3,2	0,3
17s	0	6,6	4o	2,8	0,3	14o	Dood	Dood
18s	0	4,6	5o	2,6	0,8	15o	1,8	0,3
19s	0	7,9	6o	1,5	0	16o	2,6	0
20s	0	5,4	7o	2,7	0	17o	2,7	0
21s	0	6,8	8o	3,2	0	18o	1,9	0
22s	0	6,4	9o	2,1	0	19o	2,5	0
23s	0,8	8,8	10o	1,2	0	20o	2,2	0
24s	0	4,6						

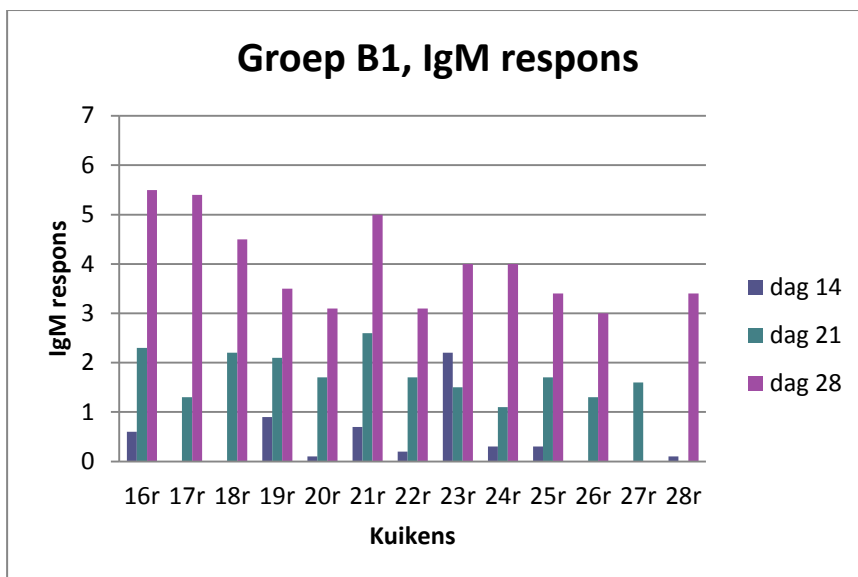
Tabel 6: Antilichamen tegen geïnactiveerde *E. coli* (IgM en IgG), Surplus dieren & controle groepen E1 en E2 (28 dagen leeftijd).



Grafiek 3: Antilichamen tegen geïnactiveerde *E. coli* (IgM en IgG), Surplus dieren.



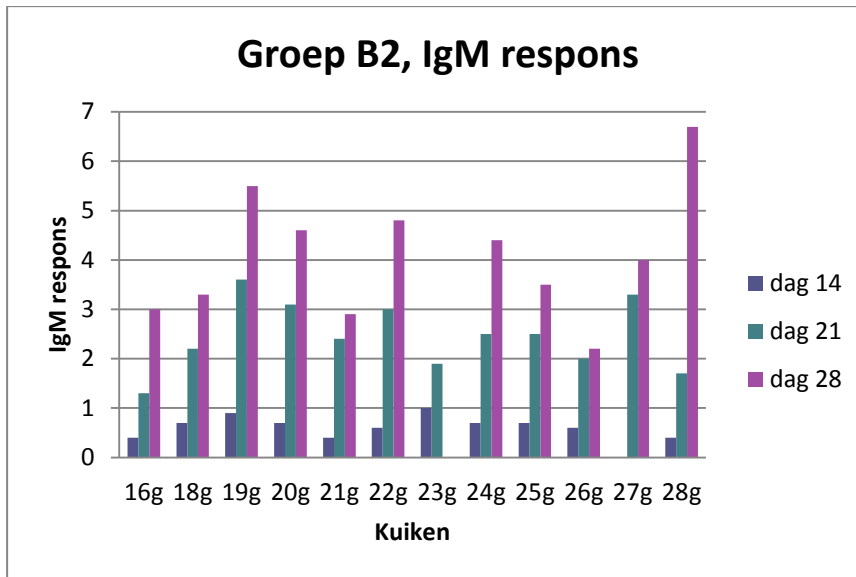
Grafiek 4: Antilichamen tegen geïnactiveerde *E. coli* (IgM en IgG), controle groepen E1 en E2 (28 dagen leeftijd).



	Dag 14	Dag 21	Dag 28
16r	0,6	2,3	5,5
17r	0	1,3	5,4
18r	0	2,2	4,5
19r	0,9	2,1	3,5
20r	0,1	1,7	3,1
21r	0,7	2,6	5
22r	0,2	1,7	3,1
23r	2,2	1,5	4
24r	0,3	1,1	4
25r	0,3	1,7	3,4
26r	0	1,3	3
27r	0	1,6	Dood
28r	0,1	0	3,4

Grafiek 5: Antilichamen tegen geïnactiveerde *E. coli* (IgM), groep B1 (7 dagen geïnoculeerd met geïnactiveerde *E. coli*).

\* De contactdieren zijn in de tabel in het rood aangegeven.



	Dag 14	Dag 21	Dag 28
16g	0,4	1,3	3
17g	Dood	Dood	Dood
18g	0,7	2,2	3,3
19g	0,9	3,6	5,5
20g	0,7	3,1	4,6
21g	0,4	2,4	2,9
22g	0,6	3	4,8
23g	1	1,9*	dood
24g	0,7	2,5	4,4
25g	0,7	2,5	3,5
26g	0,6	2	2,2
27g	0	3,3	4
28g	0,4	1,7	6,7

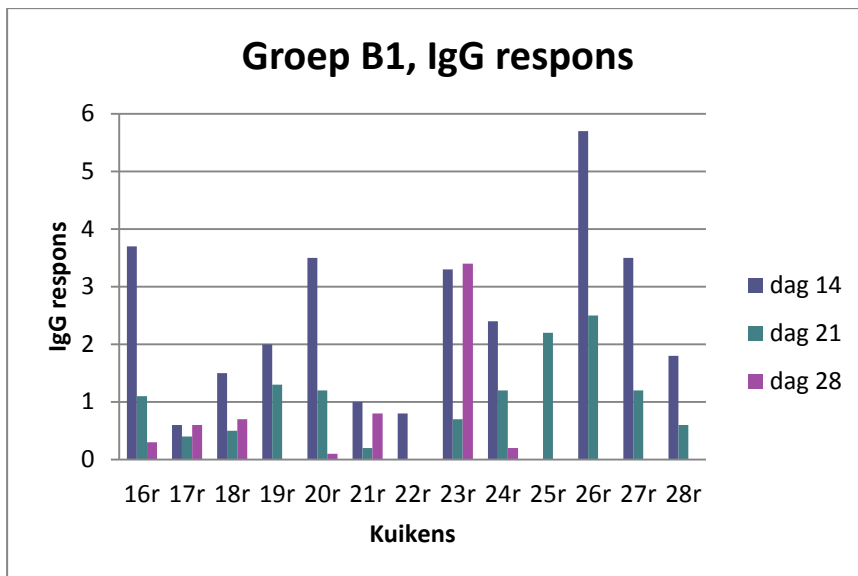
\*kwaliteit monster onzeker

Grafiek 6: Antilichamen tegen geïnactiveerde *E. coli* (IgM), B2 (4 dagen geïnoculeerd met geïnactiveerde *E. coli*).  
 \* De contactdieren zijn in de tabel in het rood aangegeven.

Zowel bij de dieren die gedurende 4 dagen zijn geïnoculeerd (grafiek 6) als bij de dieren die gedurende 7 dagen zijn geïnoculeerd (grafiek 5) werd een stijging in het aantal IgM antilichamen waargenomen. Ook de 6 dieren die zijn geïnoculeerd met PBS laten een stijging. Er is een verschil tussen het gemiddelde aantal gevonden IgM antistoffen in de controle groepen, de surplus kuikens en de geïnoculeerde groepen (zie tabel 7).

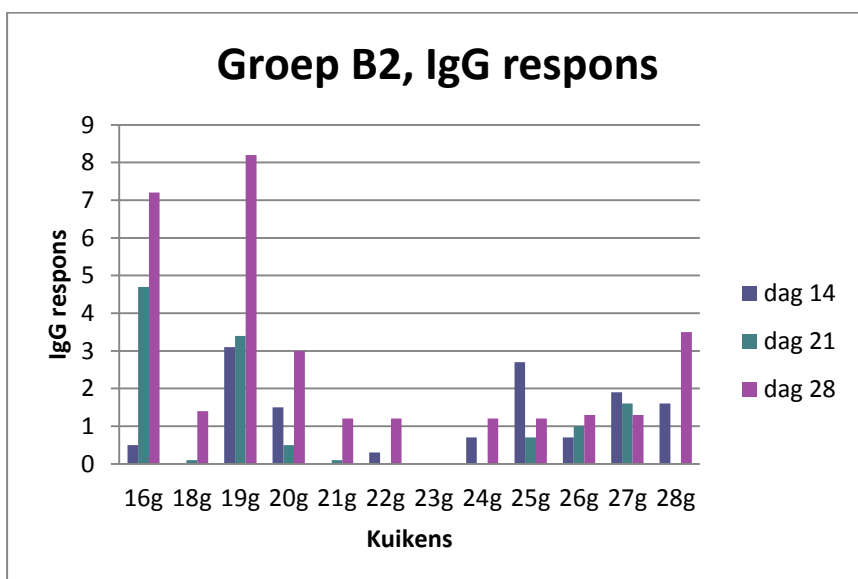
IgM:	Dag 14	Dag 21	Dag 28
7 dagen geïnoculeerd	0.5 ± 0.7	1.8 ± 0.5	3.8 ± 0.9
4 dagen geïnoculeerd	0.6 ± 0.3	2.3 ± 0.6	4.0 ± 1.4
Surplus dieren	0.1 ± 0.2		
Controle groep E1	2.2 ± 0.7		
Controle groep E2	2.6 ± 0.7		

Tabel 7: Gemiddelde ± standaarddeviatie, van het aantal IgM antilichamen tegen *E. coli*.



	Dag 14	Dag 21	Dag 28
16r	3,7	1,1	0,3
17r	0,6	0,4	0,6
18r	1,5	0,5	0,7
19r	2	1,3	0
20r	3,5	1,2	0,1
21r	1	0,2	0,8
22r	0,8	0	0
23r	3,3	0,7	3,4
24r	2,4	1,2	0,2
25r	0	2,2	0
26r	5,7	2,5	0
27r	3,5	1,2	Dood
28r	1,8	0,6	0

Grafiek 7: Antilichamen tegen geïnactiveerde *E. coli* (IgG), groep B1 (7 dagen geïnoculeerd met geïnactiveerde *E. coli*).  
 \* De contactdieren zijn in de tabel in het rood aangegeven.



	Dag 14	Dag 21	Dag 28
16g	0,5	4,7	7,2
17g	Dood	Dood	Dood
18g	0	0,1	1,4
19g	3,1	3,4	8,2
20g	1,5	0,5	3
21g	0	0,1	1,2
22g	0,3	0	1,2
23g	0	0*	Dood
24g	0,7	0	1,2
25g	2,7	0,7	1,2
26g	0,7	1	1,3
27g	1,9	1,6	1,3
28g	1,6	0	3,5

\*kwaliteit monster onzeker

Grafiek 8: Antilichamen tegen geïnactiveerde *E. coli* (IgG), groep B2 (4 dagen geïnoculeerd met geïnactiveerde *E. coli*).  
 \* De contactdieren zijn in de tabel in het rood aangegeven.

De hoeveelheid IgG antilichamen gericht tegen de geïnactiveerde *E. coli* is lager dan de hoeveelheid IgM antilichamen. Gemiddeld daalt het IgG respons in groep B1 (tabel 8), terwijl er in groep B2 een stijging te zien is (zie tabel 8).

<b>IgG:</b>	<b>Dag 14</b>	<b>Dag 21</b>	<b>Dag 28</b>
<b>7 dagen geïnoculeerd</b>	2.6 ± 1.7	1.2 ± 0.8	0.5 ± 1.1
<b>4 dagen geïnoculeerd</b>	1.1 ± 0.9	1.0 ± 1.5	2.5 ± 2.1
<b>Surplus dieren</b>	6.1 ± 1.8		
<b>Controle groep E1</b>	0.1 ± 0.3		
<b>Controle groep E2</b>	0.1 ± 0.2		

Tabel 8: Gemiddelde ± standaarddeviatie, van het aantal IgG antilichamen tegen *E. coli*.

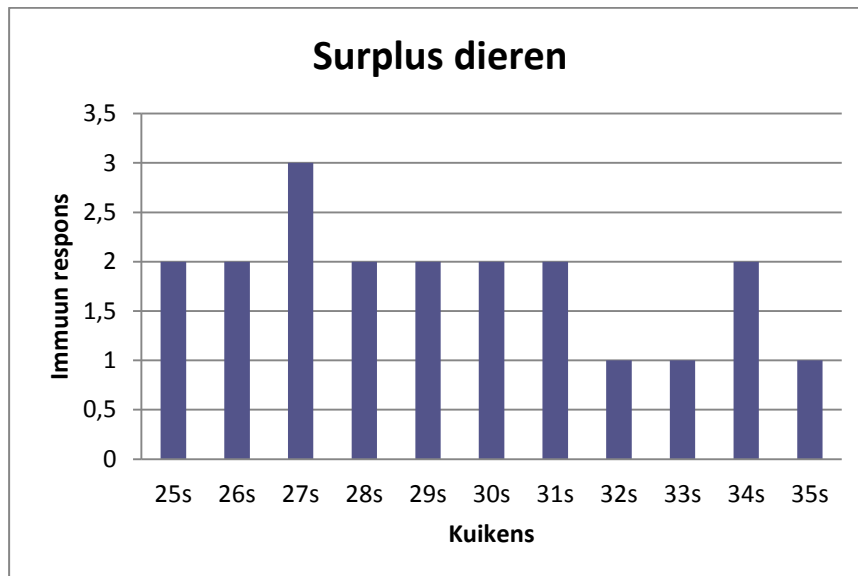


### Erythrocyten van schapen (SRBC)

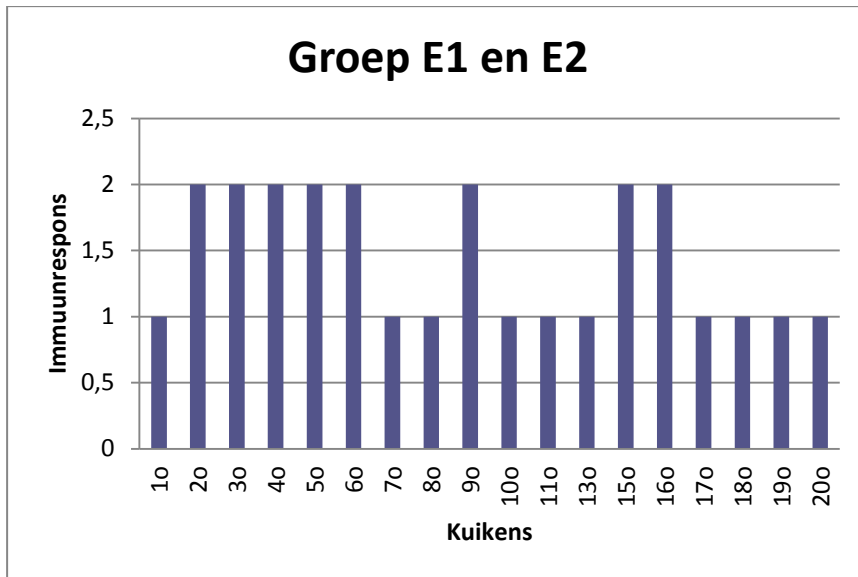
De surplus dieren welke zijn getest op het hebben van antilichamen tegen SRBC hebben een gemiddeld titer van 1,8. Dit ligt gemiddeld iets hoger dan die van de 2 controle groepen E1 en E2, die een gemiddelde antilichaam titer van 1,4 hebben (zie tabel 9 en de grafieken 9 en 10).

Surplus dieren:		Groep E1:		Groep E2:	
Kuikennr:	Respons	Kuikennr:	Respons	Kuikennr:	Respons
25s	2	1o	1	11o	1
26s	2	2o	2	12o	Dood
27s	3	3o	2	13o	1
28s	2	4o	2	14o	Dood
29s	2	5o	2	15o	2
30s	2	6o	2	16o	2
31s	2	7o	1	17o	1
32s	1	8o	1	18o	1
33s	1	9o	2	19o	1
34s	2	10o	1	20o	1

Tabel 9: Antilichamen tegen SRBC, Surplus dieren & controle groepen E1 en E2 (28 dagen leeftijd).

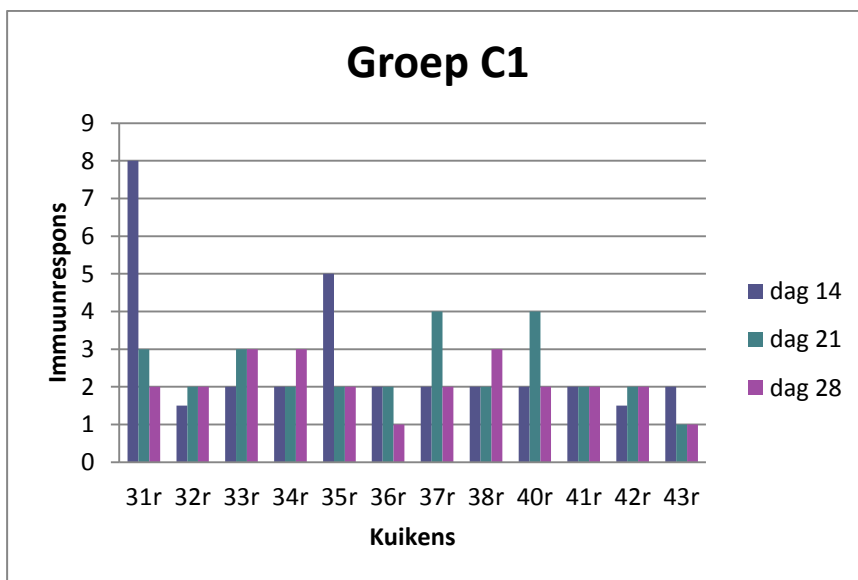


Grafiek 9: Antilichamen tegen SRBC, Surplus dieren.



Grafiek 10: Antilichamen tegen SRBC, groep E1 en E2 (28 dagen leeftijd).

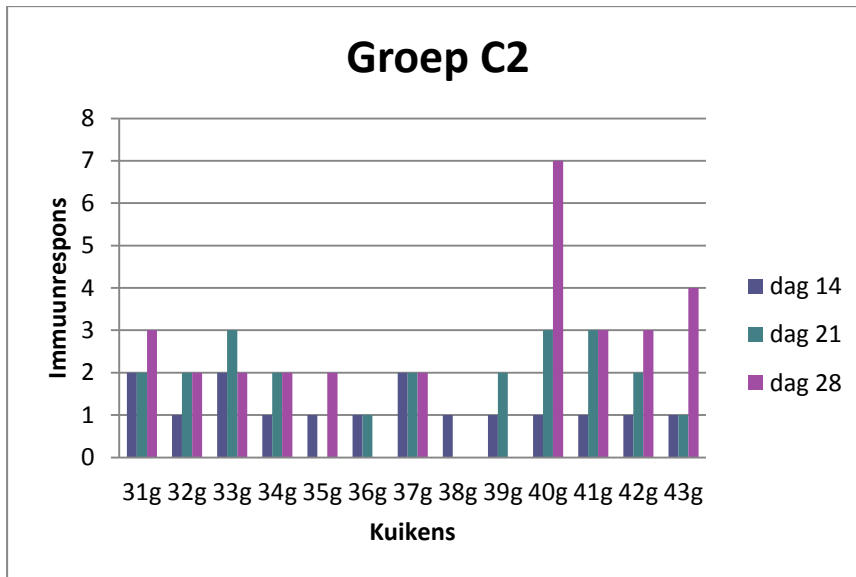
Bij de geïnoculeerde dieren zien we op dag 28 een verschil tussen de 7 dagen geïnoculeerde dieren en de 4 dagen geïnoculeerde dieren (zie grafiek 11 en 12 en de daarbij behorende tabellen en tabel 10 ). Bij de dieren welke 7 dagen geïnoculeerd zijn zien we een daling van het gemiddelde aantal antilichamen, terwijl er bij de 4 dagen geïnoculeerde dieren een stijging in het aantal antilichamen is te zien (zie tabel 10).



	Dag 14	Dag 21	Dag 28
31r	8	3	2
32r	1,5	2	2
33r	2	3	3
34r	2	2	3
35r	5	2	2
36r	2	2	1
37r	2	4	2
38r	2	2	3
39r	Dood	Dood	Dood
40r	2	4	2
41r	2	2	2
42r	1,5	2	2
43r	2	1	1

Grafiek 11: Antilichamen tegen SRBC, groep C1 (7 dagen geïnoculeerd).

\* De contactdieren zijn in de tabel in het rood aangegeven.



	dag 14	dag 21	dag 28
<b>31g</b>	2	2	3
32g	1	2	2
33g	2	3	2
34g	1	2	2
35g	1	0	2
36g	1	1	0
<b>37g</b>	2	2	2
38g	1	0 dood	
39g	1	2	0
40g	1	3	7
41g	1	3	3
42g	1	2	3
<b>43g</b>	1	1	4

Grafiek 12: Antilichamen tegen SRBC, groep C2 (4 dagen geïnoculeerd).  
 \* De contactdieren zijn in de tabel in het rood aangegeven.

	Dag 14	Dag 21	Dag 28
<b>7 dagen geïnoculeerd</b>	2.8 ± 2.1	2.5 ± 1.0	2.0 ± 0.7
<b>4 dagen geïnoculeerd</b>	1.1 ± 0.3	1.8 ± 1.1	2.3 ± 2.1
<b>Surplus dieren</b>	1.8 ± 0.6		
<b>Controle groep E1</b>	1.6 ± 0.5		
<b>Controle groep E2</b>	1.3 ± 0.5		

Tabel 10: Gemiddelde ± standaarddeviatie, van het aantal antilichamen tegen SRBC.

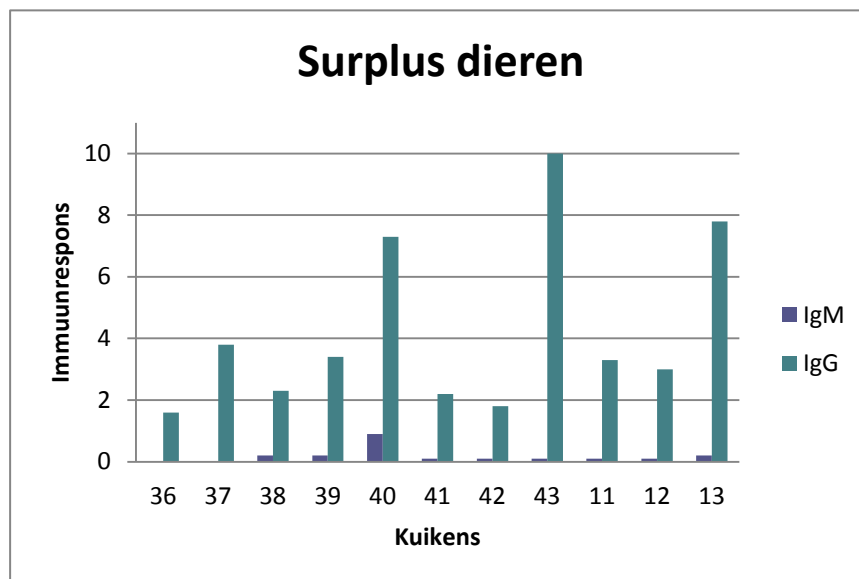
## Human Serum Albumine (HuSA)

De surplus dieren hadden veel IgG antilichamen en minder IgM antilichamen. Bij de controle dieren (groepen E1 en E2) die 28 dagen oud zijn zien we hier juist het tegenovergestelde, er worden meer IgM antilichamen gemeten dan IgG antilichamen (zie tabel 11 en de daarbij behorende grafieken 13 en 14).

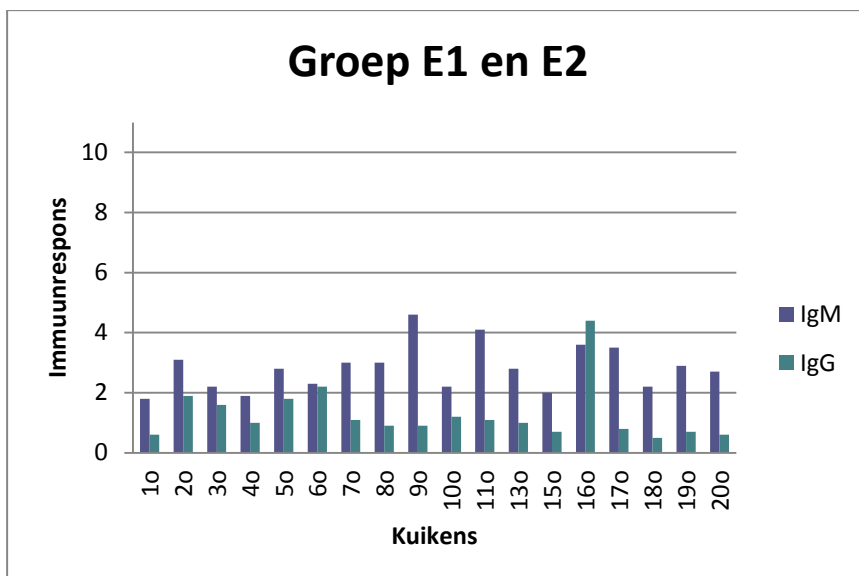
Surplus dieren:		
Kuikennr:	IgM	IgG
36s	0	1,6
37s	0	3,8
38s	0,2	2,3
39s	0,2	3,4
40s	0,9	7,3
41s	0,1	2,2
42s	0,1	1,8
43s	0,1	10
11s	0,1	3,3
12s	0,1	3
13s	0,2	7,8

Groep E1:			Groep E2:		
Kuikennr:	IgM	IgG	Kuikennr:	IgM	IgG
1o	1,8	0,6	11o	4,1	1,1
2o	3,1	1,9	12o	Dood	Dood
3o	2,2	1,6	13o	2,8	1
4o	1,9	1	14o	Dood	Dood
5o	2,8	1,8	15o	2	0,7
6o	2,3	2,2	16o	3,6	4,4
7o	3	1,1	17o	3,5	0,8
8o	3	0,9	18o	2,2	0,5
9o	4,6	0,9	19o	2,9	0,7
10o	2,2	1,2	20o	2,7	0,6

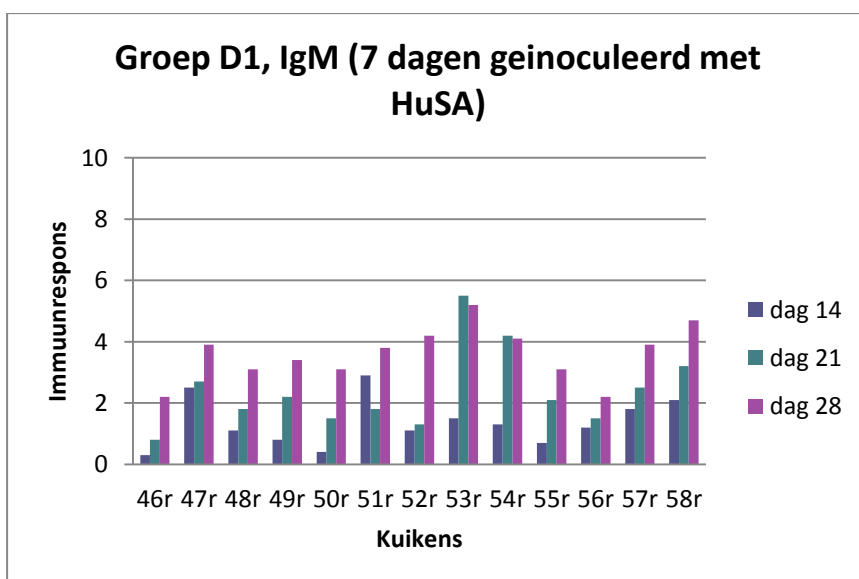
Tabel 11: Antilichamen tegen HuSA, Surplus dieren & controle groepen E1 en E2 (28 dagen leeftijd).



Grafiek 13: Antilichamen tegen HuSA (IgM en IgG), Surplus dieren.

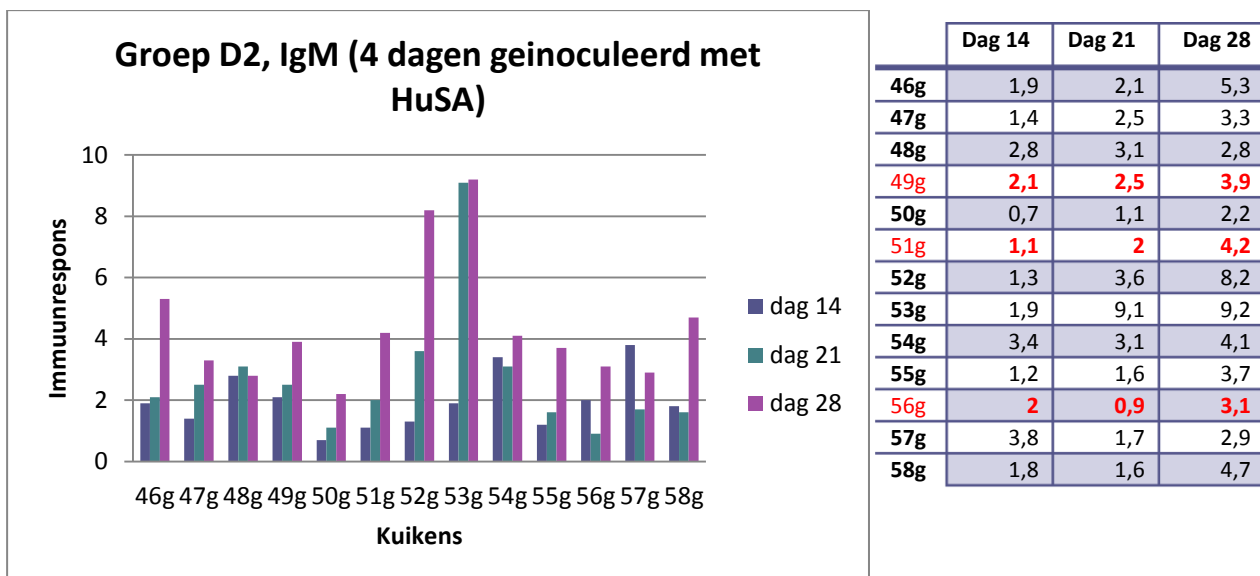


Grafiek 14: Antilichamen tegen HuSA (IgM en IgG) , controle groepen E1 en E2 (28 dagen leeftijd).



	Dag 14	Dag 21	Dag 28
46r	0,3	0,8	2,2
47r	2,5	2,7	3,9
48r	1,1	1,8	3,1
49r	0,8	2,2	3,4
50r	0,4	1,5	3,1
51r	2,9	1,8	3,8
52r	1,1	1,3	4,2
53r	1,5	5,5	5,2
54r	1,3	4,2	4,1
55r	0,7	2,1	3,1
56r	1,2	1,5	2,2
57r	1,8	2,5	3,9
58r	2,1	3,2	4,7

Grafiek 15: Antilichamen tegen HuSA (IgM), groep D1 (7 dagen geïnoculeerd)  
*\*De contactdieren zijn in de tabel in het rood aangegeven.*

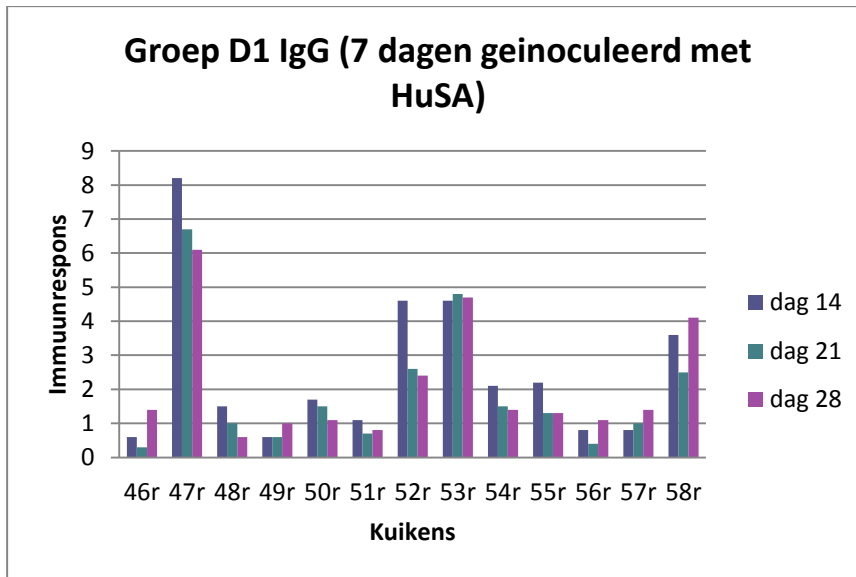


Grafiek 16: Antilichamen tegen HuSA (IgM), groep D2 (4 dagen geïnculeerd)  
*\*De contactdieren zijn in de tabel in het rood aangegeven.*

Bij beide groepen (D1 en D2) wordt er een stijging gezien in het aantal IgM antilichamen (zie tabel 12). Het verschil in de gemiddelde hoeveelheid IgM antilichamen gemeten in de geïnculeerde dieren en de contactdieren is nauwelijks aanwezig. In groep D1 is de gemiddelde hoeveelheid zelfs groter in de contactdieren dan in de met HuSA geïnculeerde dieren.

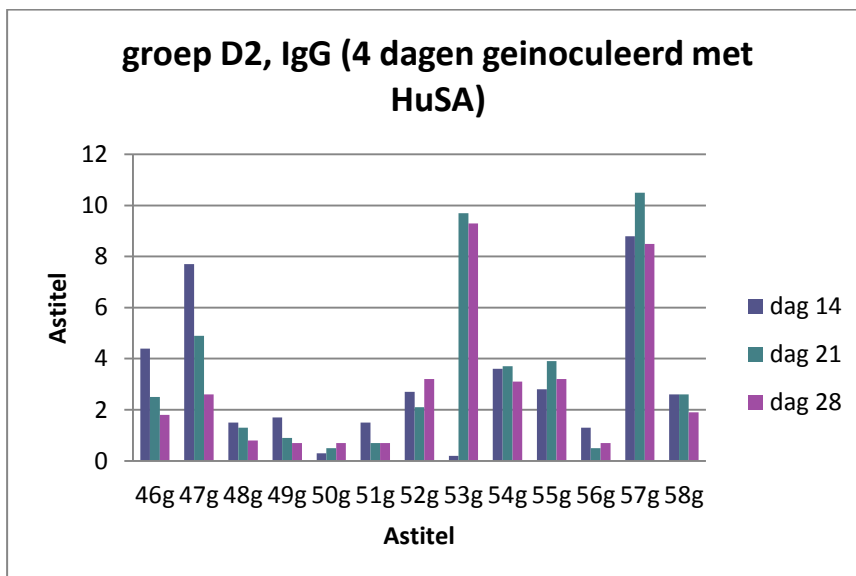
IgM:	Dag 14	Dag 21	Dag 28
<b>7 dagen geïnculeerd</b>	1.2 ± 0.7	2.3 ± 1.3	3.5 ± 1.0
<b>4 dagen geïnculeerd</b>	2.0 ± 1.0	3.0 ± 2.3	4.6 ± 2.3
<b>Surplus dieren</b>	0.2 ± 0.2		
<b>Controle groep E1</b>	2.7 ± 0.8		
<b>Controle groep E2</b>	3.0 ± 0.7		

Tabel 12: Gemiddelde ± standaarddeviatie, van het aantal IgM antilichamen tegen HuSA.



	Dag 14	Dag 21	Dag 28
46r	0,6	0,3	1,4
47r	8,2	6,7	6,1
48r	1,5	1	0,6
49r	0,6	0,6	1
50r	1,7	1,5	1,1
51r	1,1	0,7	0,8
52r	4,6	2,6	2,4
53r	4,6	4,8	4,7
54r	2,1	1,5	1,4
55r	2,2	1,3	1,3
56r	0,8	0,4	1,1
57r	0,8	1	1,4
58r	3,6	2,5	4,1

Grafiek 17: Antilichamen tegen HuSA (IgG), groep D1 (7 dagen geïnculeerd).  
*\*De contactdieren zijn in de tabel in het rood aangegeven.*



	Dag 14	Dag 21	Dag 28
46g	4,4	2,5	1,8
47g	7,7	4,9	2,6
48g	1,5	1,3	0,8
49g	1,7	0,9	0,7
50g	0,3	0,5	0,7
51g	1,5	0,7	0,7
52g	2,7	2,1	3,2
53g	0,2	9,7	9,3
54g	3,6	3,7	3,1
55g	2,8	3,9	3,2
56g	1,3	0,5	0,7
57g	8,8	10,5	8,5
58g	2,6	2,6	1,9

Grafiek 18: Antilichamen tegen HuSA (IgG), groep D2 (4 dagen geïnculeerd).  
*\*De contactdieren zijn in de tabel in het rood aangegeven.*

De aantallen IgG antilichamen in de beide groepen (D1 en D2) zijn zeer wisselend. Bij een deel van de kuikens wordt er een stijging waargenomen van het aantal antilichamen en bij een aantal een daling. In tabel 13 is te zien dat het gemiddelde aantal antilichamen bij de 7 dagen geïnculeerde dieren lager is op dag 21 dan op dag 28. Terwijl de 4 dagen geïnculeerde testdieren eerst een stijging laten zien en daarna een daling in het aantal antilichamen.

<b>IgG:</b>	<b>Dag 14</b>	<b>Dag 21</b>	<b>Dag 28</b>
<b>7 dagen geïnoculeerd</b>	2.8 ± 2.4	2.2 ± 2.1	2.4 ± 1.9
<b>4 dagen geïnoculeerd</b>	3.5 ± 2.9	4.2 ± 3.4	3.5 ± 3.0
<b>Surplus dieren</b>	4.2 ± 2.8		
<b>Controle groep E1</b>	1.3 ± 0.5		
<b>Controle groep E2</b>	1.2 ± 1.3		

Tabel 13: Gemiddelde ± standaarddeviatie, van het aantal IgG antilichamen tegen HuSA.



## Gewichten

De gewichten van de kuikens werden op verschillende momenten, dag 0, 7, 14, 21 en 28 bepaald bij alle vleeskuikens (zie bijlage V). Binnen de groepen waren grote verschillen te zien in gewicht. Dit komt waarschijnlijk omdat er zowel hennen als hanen in de groepen zaten. Zie tabel 14 voor het gemiddelde gewicht binnen elke groep, en tabel 15 en 16 voor het gemiddelde gewicht per groep uitgesplitst in mannelijke en vrouwelijke dieren. Tabel 17 geeft de standaarddeviatie aan per groep op de verschillende dagen.

	A1	B1	C1	D1	A2	B2	C2	D2	E1	E2
Dag 0	42	42	43	42	43	42	42	41	41	42
Dag 7	119	114	117	114	114	118	106	110	105	115
Dag 14	304	286	282	293	276	302	254	268	273	278
Dag 21	541	518	491	544	489	555	446	491	521	492
Dag 28	863	834	779	864	787	903	726	792	830	762

Tabel 14: Gemiddelde gewicht (g) per groep op dag 0, 7, 14, 21 en 28.

	A1	B1	C1	D1	A2	B2	C2	D2	E1	E2
Dag 0	42	41	44	43	43	43	42	42	42	40
Dag 7	123	114	111	116	124	129	107	103	112	119
Dag 14	316	291	267	295	305	342	265	260	299	310
Dag 21	569	524	475	557	548	641	482	497	568	569
Dag 28	907	861	773	892	884	1001	831	822	905	891

Tabel 15: Gemiddelde gewicht (g), per groep (mannelijke dieren) op dag 0, 7, 14, 21 en 28.

	A1	B1	C1	D1	A2	B2	C2	D2	E1	E2
Dag 0	42	43	42	40	43	40	41	40	40	44
Dag 7	112	114	120	111	108	110	104	116	100	107
Dag 14	276	281	290	288	258	273	242	275	256	213
Dag 21	480	511	499	516	446	493	405	485	490	365
Dag 28	764	806	783	802	718	821	621	766	779	548

Tabel 16: Gemiddelde gewicht (g), per groep (vrouwelijke dieren) op dag 0, 7, 14, 21 en 28.

	A1	B1	C1	D1	A2	B2	C2	D2	E1	E2
Dag 0	2	3	3	2	3	2	2	3	2	4
Dag 7	13	11	20	13	14	12	18	27	16	15
Dag 14	31	41	56	38	42	44	52	66	40	67
Dag 21	58	72	93	72	97	95	112	98	74	138
Dag 28	91	104	118	98	146	112	180	97	109	228

Tabel 17: Standaarddeviatie, per groep op dag 0, 7, 14, 21 en 28.

De uniformiteit wordt bepaald door het percentage kippen welke binnen de range valt van het gemiddelde gewicht + 10% en -10% (zie tabel 18 t/m 20).

	A1	B1	C1	D1	A2	B2	C2	D2	E1	E2
Dag 0	92	85	92	100	92	100	100	77	100	80
Dag 7	69	77	25	69	69	58	54	23	50	78
Dag 14	69	69	25	62	54	58	15	46	50	33
Dag 21	85	77	25	62	42	58	8	46	30	25
Dag 28	69	67	42	69	42	45	25	62	50	25

Tabel 18: % uniformiteit, alle dieren.

	A1	B1	C1	D1	A2	B2	C2	D2	E1	E2
Dag 0	89	100	100	100	100	100	100	83	100	67
Dag 7	44	86	50	67	60	100	43	33	100	50
Dag 14	89	57	0	44	20	100	29	50	75	50
Dag 21	100	43	0	78	40	80	29	50	50	80
Dag 28	100	50	25	78	20	80	83	67	50	100

Tabel 19: % uniformiteit, mannelijke dieren.

	A1	B1	C1	D1	A2	B2	C2	D2	E1	E2
Dag 0	100	83	88	100	88	100	100	100	100	100
Dag 7	75	83	25	100	88	100	50	43	50	100
Dag 14	50	67	50	100	63	57	17	29	50	67
Dag 21	50	67	38	75	43	71	17	43	33	33
Dag 28	50	67	63	50	43	67	0	57	67	33

Tabel 20: % uniformiteit, vrouwelijke dieren.

## 5. Conclusie/ Discussie

### Postmortaal onderzoek

Bij het postmortaal onderzoek werd er bij 19.4% van de kuikens femurkop- of femurhalsnecrose één- of beiderzijds gediagnostiseerd. In de literatuur wordt een bacteriële infectie als grootste veroorzaker hiervan genoemd [22] [23] [24]. Daarnaast kan ook voeding een rol spelen [24]. Gedurende deze proef werden de kuikens met een volledig diervoeder voor opfokleghennen gevoerd (zie tabel 21) deze verschilt een beetje met de vleeskuikenvoersamenstelling geadviseerd door de National Research Council [25] en met de vleeskuikenvoersamenstelling welke wordt aanbevolen door Cobb- Vantress Inc. [26] voor commerciële Cobb 700 vleeskuikens. Omdat de geadviseerde vleeskuikenvoersamenstelling van de National Research Council uit 1994 komt en de dieren in de afgelopen jaren genetisch zijn veranderd beschouwen we de geadviseerde vleeskuikenvoersamenstelling welke is aanbevolen door Cobb- Vantress Inc. als norm. De voersamenstelling van de National Research Council is wel vermeld omdat deze is samengesteld voor vleeskuikens in het algemeen.

	Gebruikt opfokleghennenvoer	Geadviseerde vleeskuikenvoersamenstelling [25] 0-3 weken leeftijd	Geadviseerde vleeskuikenvoersamenstelling [26]	
			0-10 dagen	11-22 dagen
Ruw eiwit	18.5%		22%	20%
Ruw vet	3.5%			
Fosfor	0.62%	0.45 %	0.48%	0.46%
Natrium	0.14%	0.20 %	0.17%	0.17%
Methionine	0.42%	0.5%	0.52%	0.48%
Lysine	0.97%	1.10%	1,35%	1,20%
Calcium	1.0%	1.0%	1.06%	0.98%
Vitamine A	10010 IU/kg	1500 IU/kg	13000 IU/kg	11000 IU/kg
Vitamine D3	3003 IU/kg	300 ICU	5000 IU/kg	5000 IU/kg
Vitamine E	50 mg/kg	10 IU/kg	80 IU/kg	60 IU/kg
Kopersulfaat, pentahydraat	20 mg/kg	8 mg/kg*	15 mg/kg*	15 mg/kg*
Zinksulfaat, monohydraat	73 mg/kg	40 mg/kg*	100 mg/kg*	100mg/kg*
Mangaan oxide	93 mg/kg	60 mg/kg*	100 mg/kg*	100mg/kg*
Natrium seleniet	0.3 mg/kg			
Cobalt carbonaat, monohydraat	0.3 mg/kg			
Kaliumiodide	1 mg/kg	0,30%		
Ijzersulfaat, monohydraat	53 mg/kg	80 mg/kg*	40 mg/kg*	40 mg/kg*
6-Fytase EC 3.1.3.26	352 FTU/kg			
Endo 1,4 beta Xylanase	1055 EPU/KG			

Tabel 21: Vergelijking voersamenstelling: gebruikte opfokleghennenvoer versus geadviseerde vleeskuikenvoersamenstelling

IU = Internationale eenheden, KIU = Duizend internationale eenheden, mg = milligram, g= gram, kg= kilogram.

\* Deze waarden zijn van de pure sporen elementen (Koper, Zink, Mangaan, Kalium en IJzer) in plaats van de gecombineerde elementen.

Er zijn geen grote verschillen te zien maar de belangrijkste verschil zit in het vitamine D gehalte welke te laag is in het door ons gebruikte voer. Vitamine D speelt een belangrijke rol in de calcium huishouding, wanneer er stoornissen zijn in de voorziening van vitamine D, calcium of fosfor zal er sprake zijn van een verhoogde afbraak van botten. Dit is eerst te zien in het borstbeen. Aangetaste dieren lopen en staan moeilijk en zitten veel, na enige tijd ontwikkelen de kuikens parese. Bij pathologisch onderzoek vinden we dan een gemakkelijk buigbare kam van het borstbeen en zwakke breekbare beenderen [27].

Omdat deze afwijkingen niet zijn gevonden bij het postmortaal onderzoek en de voeding weinig verschilt van wat geadviseerd wordt, is het minder waarschijnlijk dat de femurkop/hals necrose verklaard kan worden door het lagere vitamine D gehalte in het voer.

## Bepalingen van de hoeveelheid gevormde antilichamen

### Geïnactiveerde NCD vaccin virus

Bij de kuikens die zijn geïnoculeerd met het geïnactiveerde NCD vaccin virus werd een duidelijke stijging van het aantal antilichamen in het bloed waargenomen (zie tabel 5). De dieren die 7 dagen zijn geïnoculeerd vormen meer antilichamen dan de dieren die 4 dagen geïnoculeerd zijn. Op 28 dagen leeftijd zie je in groep A1 (7 dagen inoculatie) een gemiddeld antilichaamtiter van 1.8 en bij groep A2 welke 4 dagen zijn geïnoculeerd een gemiddelde van 1.2. Hieruit kunnen we concluderen dat er specifieke antilichamen tegen geïnactiveerde NCD vaccivirus Clone 30 op te wekken zijn via intratracheale en nasale inoculatie.

### Geïnactiveerde *E. coli*

De bepalingen van het aantal antilichamen tegen LPS gevormd in kuikens die zijn geïnoculeerd met geïnactiveerde *E. coli* gaf minder duidelijke resultaten dan bij de geïnactiveerde NCD virusvaccin. Bij de Surplus dieren zijn er geen IgM antilichamen maar wel een IgG antilichamen te vinden. Waarschijnlijk krijgen de kuikens maternale immuniteit tegen *E. coli* mee. Bij de controle dieren, zowel de controle groepen E1 en E2 als bij de contactdieren binnen de groepen B1 en B2, werden veel IgM antilichamen gevonden en weinig IgG antilichamen. Er is een vermoeden dat het drinkwater niet vrij is van LPS en dit mogelijk de reden is dat de kuikens in de controle groepen toch IgM antilichamen vormen tegen LPS. De 6 contactdieren die geïnoculeerd zijn met PBS kunnen ook vlak na inoculatie met *E. coli* van de geïnoculeerde dieren in contact komen. Dit is mogelijk de verklaring waarom in de contactdieren dezelfde hoeveelheid antilichamen worden gevormd als in de geïnoculeerde dieren. Het verschil in het gemiddelde aantal gevonden antilichamen in de geïnoculeerde groepen en de controle groepen is dusdanig dat er gezegd kan worden dat er LPS IgM antilichamen zijn gevormd na intratracheale en nasale inoculatie van geïnactiveerde *E. coli*.

Het aantal IgG antilichamen gevormd tegen de geïnactiveerde *E. coli* geeft een minder duidelijk beeld dan het aantal IgM antilichamen. Bij de Surplus dieren is er een hoog aantal IgG antilichamen te zien welke mogelijk komt door maternale immuniteit. Omdat bij de Surplus dieren het aantal IgG antilichamen hoog is verwacht je ook bij de testdieren een hoger aantal IgG antilichamen te zien op dag 14. Dit is wel het geval bij groep B1, hierbij ziet men een duidelijke daling van de hoeveelheid antilichamen in de tijd. Bij groep B2 wordt het tegenovergestelde gezien hierbij werden er op 14 dagen leeftijd weinig IgG antilichamen gedetecteerd naar verloop van tijd (dag 28) werd er wel een

stijging gezien. Hierdoor is niet op te maken of het aantal IgG antilichamen van de moederdieren afkomstig zijn of door de inoculatie. Daarom is het belangrijk om op verschillende momenten bloed af te nemen en te analyseren, wanneer er een stijging in aantal antilichamen wordt gezien kan er met zekerheid worden gezegd dat het aantal IgG antilichamen zijn gestegen als reactie op de inoculatie met *E. coli*.

### **Erythrocyten van schapen (SRBC)**

De gevonden aantallen antilichamen tegen erythrocyten van schapen is moeilijk te interpreteren. De Surplus dieren hebben volgens deze analyse een gemiddeld antilichaamtiter van 1,8, wat moeilijk kan verklaard worden door de aanwezigheid van maternale antilichamen tegen SRBC. De SPF-moederdieren zijn waarschijnlijk nooit in contact gekomen met erythrocyten van schapen. Er kan mogelijk sprake zijn van kruisimmunitet, waarbij de moederdieren antilichamen maken tegen een ander antigeen welke dusdanig lijkt op erythrocyten van schapen, waardoor de kuikens toch maternale antilichamen hebben die kruis reageren met SRBC.

Bij de controle groepen E1 en E2 worden er geen antilichamen verwacht dag 28 tegen SRBC omdat dan maternale immuniteit al sterk gedaald of verdwenen moet zijn. Er is een mogelijkheid dat de dieren toch in de omgeving iets anders opnemen waardoor er weer een kruisimmunitet ontstaat met SRBC of dat bij de bloedanalyses iets anders interfereert waardoor de test vals positief is.

Ondanks dat er bij de controle groepen ook een immuniteitsreactie te zien is, zit er een verschil tussen de controle dieren en de met SRBC geïnoculeerde dieren. De geïnoculeerde kuikens hebben gemiddeld meer antilichamen dan de controle dieren. Dit verschil hangt echter wel af van het moment van bloedafname en het inoculatie protocol waardoor de resultaten moeilijker te beoordelen zijn.

### **Human Serum Albumine (HuSA)**

De Surplus dieren hebben veel antilichamen tegen HuSA. Het aantal IgM antilichamen is laag maar het aantal IgG antilichamen hoog. De IgG antilichamen zijn waarschijnlijk maternale antilichamen maar het is zeer onwaarschijnlijk dat de moederdieren in contact zijn gekomen met humane albumine. Het is wel een mogelijkheid dat er antilichamen zijn die in het moeder dier aanwezig zijn die een kruisreactie geven met HuSA. Het verschil tussen het gemiddelde aantal antilichamen van de controle groepen E1 en E2 en de geïnoculeerde dieren is dusdanig dat er geconcludeerd mag worden dat er een specifieke IgG reactie ontstaat na inoculatie.

Bij de geïnoculeerde dieren zien we een stijging in het aantal IgM antilichamen tegen HuSA zoals er wordt verwacht na inoculatie met HuSA. De contactdieren binnen de groep hebben echter ook een immunreactie tegen HuSA. Het is een mogelijkheid, dat door het proesten van de geïnoculeerde dieren na inoculatie, de contactdieren toch in aanraking komen met HuSA antigenen. Er zijn bij de controle groepen E1 en E2 ook veel antilichamen gevonden waardoor het verschil tussen controle dieren en de geïnoculeerde dieren te klein wordt om de IgM waardes als diagnostisch onderscheid te kunnen gebruiken.

## 6. Acknowledgements

Aller eerst wil ik natuurlijk graag Mieke Matthijs bedanken voor de mogelijkheid om mijn onderzoeksstage hier in Utrecht te kunnen doen , zodat ik iets wat ervaring heb gekregen met kippen. Bedankt voor de prettige samenwerking, de ondersteuning tijdens het schrijven van het verslag en het geduld bij het verbeteren van al mijn taal en schrijffouten.

Verder wil ik graag Alexandra Bogerman en Francisca Velkers bedanken voor het helpen tijdens de proefopzet, de dierverzorgers welke gedurende de gehele proef de kuikens hebben verzorgd en ook altijd klaar stonden om te helpen, R. Adriaanse van de Universiteit Wageningen en W. Landman van de GD Deventer voor het verstrekken van kennis, materialen en het laboratorium werk.

Jan van Schip en Lianne Ankum bedankt voor het helpen tijdens het labelen en vullen van de Micronicbuisjes, zonder jullie hulp zou ik tot diep in de nacht nog bezig zijn geweest.

En tot slot de heer J. van Eck heel erg bedankt voor het beoordelen van de resultaten en de opheldering hiervan.

## 7. Referenties

- [1] Ask, B., van der Waaij, E., van Eck, J., Arendonk, J., & Stegeman, J. (2006). Defining susceptibility of broiler chicks to colibacillosis. *Avian Pathology* , 35:2, 147-153.
- [2] Barnes, H., Nolan, J., & Vaillancourt, J. (2003). Colibacillosis. In Y. Saif, *Disease of poultry* (11th ed., pp. 691-737). Iowa State Press.
- [3] Goren, E. (1991). Colibacillose bij pluimvee: etiologie pathologie en therapie. *Tijdschrift voor Diergeneeskunde* , 116, 1122-1129.
- [4] Matthijs, M. (2008). The pathogenesis of colibacillosis in broilers infected with virulent or vaccine strains of infectious bronchitis virus. *Thesis, Utrecht University (the Netherlands)* .
- [5] Engelich, G., White, M., & Hartshoorn, K. (2001). Role of respiratory burst in co-operative reduction in neutrophil survival by influenza virus and Escherichia coli. *Journal of leucocyte biology* , 69, 50-56.
- [6] Navarini, A., Recher, M., Lang, K., Georgiev, P., Meury, S., Bergthaler, A., et al. (2006). Type I interferon production enhances susceptibility to Listeria monocytogenes infection. *The Journal of experimental medicine* , 200, 437-445.
- [7] Bakaletz, L. (1995). Viral potentiation of bacterial superinfection of the respiratory tract. *Trends in Microbiology* , 3, 110-114.
- [8] Wilson, R., Dowlin, R., & Jackson, A. (1996). The biology of bacterial colonization and invasion of the respiratory mucosa. *The European respiratory journal* , 9, 1523-1530.
- [9] Vandekerchove, D. (2004). Colibacillosis in battery-caged layer haens: clinical and bacteriological characteristics and risk factor analysis. *Thesis, Ghent University (Belgium)* .
- [10] Bettelheim, K. (1994). Biochemical characteristics of Escherichia coli. In C. Gyles, *Escherichia coli in Domestic Animals and Humans* (pp. 3-30). Wallingford, UK: CAB Int'l.
- [11] Landman, W., & Cornelissen, R. (2006). Virulentiefactoren van Escherichia coli met nadruk op aviair pathogene isolaten. *Tijdschrift voor Diergeneeskunde* , 131, 822-830.
- [12] Davis, M., & Morishita, T. (2005). Relative ammonia concentrations, dust concentrations, and presence of Salmonella species and Escherichia coli inside and outside commercial layer facilities. *Avian Dis* , 49, 30-35.
- [13] Johnson, L., Bilgili, S., Hoerr, F., McMurtrey, B., & Norton, R. (2001). The influence of Escherichia coli strains from different sources and the age of broiler chickens on the development of cellulitis. *Avian Pathology* , 30, 475-479.
- [14] Goren, E. (1978). Observations on experimental infection of chicks with Escherichia coli. *Avian pathology* , 7, 213-224.

- [15] Matthijs, M., Van Eck, J., Landman, W., & Stegeman, J. (2003). Ability of Massachusetts type infectious bronchitis virus to increase colibacillosis susceptibility in commercial broilers: a comparison between vaccine and virulent field virus. *Avian Pathology*, 32, 473-481.
- [16] Gomis, S., Riddel, C., Potter, A., & Allan, B. (2001). Phenotypic and genotypic characterization of virulence factors of *Escherichia coli* isolated from broiler chickens with simultaneous occurrence of cellulitis and other colibacillosis lesions. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 38, 159-162.
- [17] van Eck, J. (1990). Vaccination of fowl with inactivated Newcastle disease vaccine by the respiratory route. *Avian Pathology*, 19:2, 313-330.
- [18] Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A., & Randall, R. (1951). Protein measurement with Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265-271.
- [19] Parmentier, H., Klomopen, A., De Vries Reilingh, G., & Lammers, A. (2008). Effect of concurrent intratracheal lipopolysaccharide and human serum albumin challenge on primary and secondary antibody responses in poultry. *Vaccin*, 26, 5510-5520.
- [20] Van der Zijpp, A., & Leenstra, F. (1980). Genetic analysis of the humoral immune response of White Leghorn chicks. *Poultry Science*, 59, 1363-1369.
- [21] Parmentier, H., Walraven, M., & Nieuwland, M. (1998). Antibody responses and body weights of chicken lines selected for high and low humoral responsiveness to sheep red blood cells. 1. Effect of *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *Poultry Science*, 77, 248-255.
- [22] Dinev, I. (2009). Clinical and morphological investigations on the prevalence of lameness associated with femoral head necrosis in broilers. *British Poultry Science*, 50, 284-290.
- [23] Thorp, B., Whitehead, C., Dick, L., Bradbury, J., Jones, R., & Wood, A. (1993). Proximal femoral degeneration in growing broiler fowl. *Avian Pathology*, 22, 325-342.
- [24] Thorp, B., & Waddington, D. (1997). Relationships between the bone pathologies, ash and mineral content of long bones in 35-day-old broiler chickens. *Research in Veterinary Science*, 62, 67-73.
- [25] Council, N. R. (1994). *Nutrient requirements of poultry*. Washington, DC: National Academy Press.
- [26] Cobb-Vantress Inc. (2008). *Vleeskuiken resultaten & voedings supplement*.
- [27] Universiteit Utrecht, faculteit Diergeneeskunde. (2011-2012). *Syllabus, Locomotie*.
- [28] Abubakar, M., Ibrahim, K., & Muhammad, G. (2007). Dose dependent immune response to formalin inactivated *Escherichia coli* mastitic isolate in rabbits. *Pakistan Veterinary Journal*, 27(3), 134-136.
- [29] Miller, P., Estevez, C., Yu, Q., Suarez, D., & King, D. (2009). Comparison of viral shedding following vaccination with inactivated and live Newcastle Disease vaccines formulated with wild-type and recombinant viruses. *Avian Diseases*, 53, 39-49.



## 8. Bijlagen

### Bijlage I: Globale groepsindeling

Groep	Inoculatie met	Inoculatie dagen (dagen leeftijd)	Aantal te inoculeren	Aantal contactdieren
A1	Geinactiveerd NCD Vaccinivirus Clone 30	1,2,3,4,5,6,7	10	3
B1	Antigeen (afgedood E.coli)	1,2,3,4,5,6,7	10	3
C1	Antigeen (ery's schaap (SRBC))	1,2,3,4,5,6,7	10	3
D1	Antigeen (HuSA: Human Serum Albumin)	1,2,3,4,5,6,7	10	3
E	PBS	1,2,3,4,5,6,7	10	0

A2	Geinactiveerd NCD Vaccinivirus Clone 30	1,2,3,4	10	3
B2	Antigeen (afgedood E.coli)	1,2,3,4	10	3
C2	Antigeen (ery's schaap (SRBC))	1,2,3,4	10	3
D2	Antigeen (HuSA: Human Serum Albumin)	1,2,3,4	10	3
E2	PBS	1,2,3,4	10	0



## Bijlage III, Welzijnslogboek

### Isolator 1: groep A1

Kuikennummer:	Dag:	Bijzonderheden:
9 <sub>R</sub>	5	Met Li poot tussen rooster vast gezeten
5 <sub>R</sub>	6	Met Li poot vastgezeten onder voerbak
10 <sub>R</sub>	14	Met bloedtappen veel bloed verloren

### Isolator 2: groep B1

Kuikennummer:	Dag:	Bijzonderheden:
24 <sub>R</sub>	23	Nummer ontstoken
27 <sub>R</sub>	26	Sloom, voortijdig geëuthanaseerd

### Isolator 3: groep C1

Kuikennummer:	Dag:	Bijzonderheden:
39 <sub>R</sub>	3	Tijdens inoculatie gestorven (gestikt in voer)

### Isolator 4: groep D1

Geen bijzonderheden

### Isolator 5: groep A2

Kuikennummer:	Dag:	Bijzonderheden:
10 <sub>G</sub>	17	Sloom, linkervleugel hangt wat af
11 <sub>G</sub>	17	Dood

### Isolator 6: groep B2

Kuikennummer:	Dag:	Bijzonderheden:
17 <sub>G</sub>	3	Erg benauwd, stuiptrekkingen vlak voor dood
23 <sub>G</sub>	21	Sloom, benauwd
	23	Sloom
	24	Sloom
	25	Sloom, voortijdig geëuthanaseerd

### Isolator 7: groep C2

Kuikennummer:	Dag:	Bijzonderheden:
35 <sub>G</sub>	21	Sloom
	23	Sloom
	24	Sloom
	25	Sloom
	26	Sloom
	27	Sloom
36 <sub>G</sub>	21	Sloom
	27	Sloom
38 <sub>G</sub>	22	Dood

### Isolator 8: groep D2

Kuikennummer: Dag: Bijzonderheden:

Kuikennummer:	Dag:	Bijzonderheden:
50 <sub>G</sub>	Vanaf dag 2 t/m einde proef	Trilt
48 <sub>G</sub>	13	Zit bol

### Isolator 9: groep E1

Geen bijzonderheden

### Isolator 10: groep E2

Kuikennummer: Dag: Bijzonderheden:

Kuikennummer:	Dag:	Bijzonderheden:
14 <sub>o</sub>	4	Dood
17 <sub>o</sub>	17	Dood

## Bijlage IV: Postmortaal onderzoek:

### Isolator 1:

Kuiknummer:	Geslacht:	Bijzonderheden:
1 <sub>R</sub>	M	-
2 <sub>R</sub> (PBS)	M	Femurkop necrose 1x
3 <sub>R</sub>	V	Femurkop necrose 2x
4 <sub>R</sub>	M	
5 <sub>R</sub>	M	Femurkop necrose 1x
6 <sub>R</sub>	M	
7 <sub>R</sub> (PBS)	V	
8 <sub>R</sub>	M	
9 <sub>R</sub>	M	
10 <sub>R</sub>	V	
11 <sub>R</sub> (PBS)	M	
12 <sub>R</sub>	M	Femurkop necrose 1x
13 <sub>R</sub>	V	

### Isolator 2:

Kuiknummer:	Geslacht:	Bijzonderheden:
16 <sub>R</sub>	V	
17 <sub>R</sub> (PBS)	M	Dooierrestant
18 <sub>R</sub> (PBS)	M	Gezwellen nier
19 <sub>R</sub>	M	Hydropericard
20 <sub>R</sub>	V	
21 <sub>R</sub>	M	
22 <sub>R</sub>	V	
23 <sub>R</sub>	V	Afwijkende gal kleur (geel)
24 <sub>R</sub>	V	Extreem grote dooierrestant
25 <sub>R</sub>	M	Gezwellen nieren + gyri tekening
26 <sub>R</sub>	M	
27 <sub>R</sub>	M	(Vroegtijdig geeuthanaseerd) Ascitis, Femurkop necrose 2x
28 <sub>R</sub> (PBS)	V	Femurkop necrose 1x, Bleke lever

### Isolator 3:

Kuiknummer:	Geslacht:	Bijzonderheden:
31 <sub>R</sub>	V	
32 <sub>R</sub>	V	
33 <sub>R</sub>	V	
34 <sub>R</sub> (PBS)	V	
35 <sub>R</sub>	M	Dooierrestant
36 <sub>R</sub>	V	
37 <sub>R</sub>	V	
38 <sub>R</sub>	M	

<b>39<sub>R</sub> (PBS)</b>	M	Vroegtijdig dood: Voer in trachea
<b>40<sub>R</sub></b>	M	
<b>41<sub>R</sub> (PBS)</b>	M	Femurkop necrose 1x
<b>42<sub>R</sub></b>	V	
<b>43<sub>R</sub></b>	V	

#### Isolator 4:

<b>Kuikennummer:</b>	<b>Geslacht:</b>	<b>Bijzonderheden:</b>
<b>46<sub>R</sub></b>	M	
<b>47<sub>R</sub></b>	M	
<b>48<sub>R</sub></b>	M	Vervette lever
<b>49<sub>R</sub></b>	M	Femurkop necrose 1x
<b>50<sub>R</sub></b>	M	Femurkop necrose 1x
<b>51<sub>R</sub> (PBS)</b>	M	Femurkop necrose 1x, Dooierrestant
<b>52<sub>R</sub></b>	M	Borstblaar
<b>53<sub>R</sub></b>	V	
<b>54<sub>R</sub> (PBS)</b>	M	
<b>55<sub>R</sub></b>	M	Femurkop necrose 1x
<b>56<sub>R</sub></b>	V	
<b>57<sub>R</sub> (PBS)</b>	V	
<b>58<sub>R</sub></b>	V	Borstblaar

#### Isolator 5:

<b>Kuikennummer:</b>	<b>Geslacht:</b>	<b>Bijzonderheden:</b>
<b>1<sub>G</sub></b>	V	Femurkop necrose 1x
<b>2<sub>G</sub> (PBS)</b>	V	
<b>3<sub>G</sub></b>	M	
<b>4<sub>G</sub></b>	M	Femurkop necrose 2x
<b>5<sub>G</sub></b>	V	
<b>6<sub>G</sub></b>	V	
<b>7<sub>G</sub></b>	M	
<b>8<sub>G</sub></b>	V	
<b>9<sub>G</sub> (PBS)</b>	M	
<b>10<sub>G</sub></b>	V	Dooierrestant
<b>11<sub>G</sub> (PBS)</b>	V	Vroegtijdig dood: Femurkop necrose 2x Vergrote nieren + te rood Lever te rood
<b>12<sub>G</sub></b>	V	
<b>13<sub>G</sub></b>	M	

**Isolator 6:**

Kuikennummer:	Geslacht:	Bijzonderheden:
16 <sub>G</sub>	V	
17 <sub>G</sub>	M	Vroegtijdig dood: Dehydratie? Bloedrijke nieren + hart
18 <sub>G</sub>	M	Femurkopnecrose 1x, Hydropericard, Nierzwellling
19 <sub>G</sub> (PBS)	M	Femurkop necrose 1x, Hydropericard, Bleke, brosse lever
20 <sub>G</sub>	V	Femurkopnecrose 1x
21 <sub>G</sub> (PBS)	M	Hydropericard
22 <sub>G</sub> (PBS)	M	
23 <sub>G</sub>	V	Vroegtijdig dood: Ascitis, Zeer vergroot hart, Hydropericard, Vergrote lever Nierzwellling + uraat neerslag
24 <sub>G</sub>	V	Femurkopnecrose 1x
25 <sub>G</sub>	M	Grote dooierrestant
26 <sub>G</sub>	V	
27 <sub>G</sub>	V	
28 <sub>G</sub>	V	

**Isolator 7:**

Kuikennummer:	Geslacht:	Bijzonderheden:
31 <sub>G</sub> (PBS)	M	
32 <sub>G</sub>	M	
33 <sub>G</sub>	M	Donker, gestuwde lever
34 <sub>G</sub>	V	Dooierrestant
35 <sub>G</sub>	V	Achter in ontwikkeling → kuikendons nog aanwezig, Verder geen afwijkingen te vinden
36 <sub>G</sub>	V	Achter in ontwikkeling → kuikendons nog aanwezig, Verder geen afwijkingen te vinden
37 <sub>G</sub> (PBS)	M	
38 <sub>G</sub>	M	Vroegtijdig dood: Femurhals necrose 1x, Dooierrest, Nierzwellling
39 <sub>G</sub>	M	Donker, gestuwde lever, Grote dooierrestant
40 <sub>G</sub>	V	Gestuwde lever
41 <sub>G</sub>	V	
42 <sub>G</sub>	M	
43 <sub>G</sub> (PBS)	V	

**Isolator 8:**

<b>Kuikennummer:</b>	<b>Geslacht:</b>	<b>Bijzonderheden:</b>
46 <sub>G</sub>	V	
47 <sub>G</sub>	M	Femurkopnecrose 1x
48 <sub>G</sub>	V	Dooier peritonitis
49 <sub>G</sub> (PBS)	M	
50 <sub>G</sub>	M	
51 <sub>G</sub> (PBS)	M	
52 <sub>G</sub>	V	
53 <sub>G</sub>	M	
54 <sub>G</sub>	V	
55 <sub>G</sub>	V	
56 <sub>G</sub> (PBS)	V	Femurkopnecrose 1x
57 <sub>G</sub>	M	
58 <sub>G</sub>	V	

**Isolator 9:**

<b>Kuikennummer:</b>	<b>Geslacht:</b>	<b>Bijzonderheden:</b>
1 <sub>o</sub>	V	
2 <sub>o</sub>	M	Femurkopnecrose 1x
3 <sub>o</sub>	V	
4 <sub>o</sub>	M	
5 <sub>o</sub>	V	
6 <sub>o</sub>	M	Hydropericard
7 <sub>o</sub>	V	Hydropericard
8 <sub>o</sub>	M	
9 <sub>o</sub>	V	
10 <sub>o</sub>	V	Femurkopnecrose 1x

**Isolator 10:**

<b>Kuikennummer:</b>	<b>Geslacht:</b>	<b>Bijzonderheden:</b>
11 <sub>o</sub>	V	
12 <sub>o</sub>	M	Vroegtijdig dood: Dooierzak ontsteking
13 <sub>o</sub>	M	
14 <sub>o</sub>	V	Vroegtijdig dood: Hartzakje vol bloed, Gezwollen lever (zeer rood) Femurhalsnecrose 2x
15 <sub>o</sub>	V	Vrij grote dooierrestant
16 <sub>o</sub>	M	
17 <sub>o</sub>	M	Hydropericard, Kleine dooierrestant
18 <sub>o</sub>	M	
19 <sub>o</sub>	V	
20 <sub>o</sub>	M	Hydropericard



## Bijlage V, Gewichten (gram)

### Isolator 1, groep A1

	<b>Kuiken nr:</b>	<b>Antigen:</b>	<b>Dag 0</b>	<b>Dag 7</b>	<b>Dag 14</b>	<b>Dag 21</b>	<b>Dag 28</b>
<b>M</b>	1	NCD	44	137	339	594	990
<b>M</b>	2 (PBS)	<b>PBS</b>	42	143	338	591	913
<b>V</b>	3	NCD	43	113	277	486	760
<b>M</b>	4	NCD	46	114	303	573	918
<b>M</b>	5	NCD	41	124	320	585	947
<b>M</b>	6	NCD	42	104	275	513	840
<b>V</b>	7 (PBS)	<b>PBS</b>	44	111	275	490	790
<b>M</b>	8	NCD	41	108	318	586	960
<b>M</b>	9	NCD	44	136	337	567	849
<b>V</b>	10	NCD	42	101	236	393	658
<b>M</b>	11 (PBS)	<b>PBS</b>	43	114	301	547	846
<b>M</b>	12	NCD	37	124	314	561	902
<b>V</b>	13	NCD	39	124	315	550	849

### Isolator 2, groep B1

	<b>Kuiken nr:</b>	<b>Antigen:</b>	<b>Dag 0</b>	<b>Dag 7</b>	<b>Dag 14</b>	<b>Dag 21</b>	<b>Dag 28</b>
<b>V</b>	16	E. coli	46	121	273	475	744
<b>M</b>	17 (PBS)	<b>PBS</b>	42	133	322	591	955
<b>M</b>	18(PBS)	<b>PBS</b>	44	113	307	564	895
<b>M</b>	19	E. coli	41	103	274	499	817
<b>V</b>	20	E. coli	45	123	319	566	891
<b>M</b>	21	E. coli	43	102	206	381	624
<b>V</b>	22	E. coli	45	121	297	511	806
<b>V</b>	23	E. coli	45	114	284	524	818
<b>V</b>	24	E. coli	41	116	295	543	843
<b>M</b>	25	E. coli	41	122	353	656	1020
<b>M</b>	26	E. coli	41	115	307	538	853
<b>M</b>	27	E. coli	37	108	266	439	-
<b>V</b>	28(PBS)	<b>PBS</b>	37	91	216	444	736

### Isolator 3, Groep C1

	<b>Kuiken nr:</b>	<b>Antigen:</b>	<b>Dag 0</b>	<b>Dag 7</b>	<b>Dag 14</b>	<b>Dag 21</b>	<b>Dag 28</b>
V	31	SRBC	44	138	312	554	858
V	32	SRBC	44	115	286	514	814
V	33	SRBC	44	146	361	602	880
V	34(PBS)	<b>PBS</b>	40	97	242	431	678
M	35	SRBC	44	103	201	329	551
V	36	SRBC	46	142	334	551	833
V	37	SRBC	42	124	299	515	815
M	38	SRBC	42	110	330	589	934
M	39(PBS)	<b>PBS</b>	44	-	-	-	-
M	40	SRBC	45	92	200	404	724
M	41(PBS)	<b>PBS</b>	43	137	336	577	882
V	42	SRBC	38	100	225	349	601
V	43	SRBC	37	100	262	473	781

### Isolator 4, Groep D1

	<b>Kuiken nr:</b>	<b>Antigen:</b>	<b>Dag 0</b>	<b>Dag 7</b>	<b>Dag 14</b>	<b>Dag 21</b>	<b>Dag 28</b>
M	46	HuSA	45	126	353	674	1051
M	47	HuSA	45	108	256	504	840
M	48	HuSA	41	99	216	395	694
M	49	HuSA	44	117	325	612	949
M	50	HuSA	45	146	340	593	888
M	51(PBS)	<b>PBS</b>	42	117	299	571	896
M	52	HuSA	41	98	265	518	873
V	53	HuSA	43	113	276	510	799
M	54(PBS)	<b>PBS</b>	43	120	321	607	967
M	55	HuSA	41	109	283	536	871
V	56	HuSA	42	106	287	514	806
V	57(PBS)	<b>PBS</b>	37	120	314	573	891
V	58	HuSA	39	104	276	465	711

### Isolator 5, Groep A2

	<b>Kuiken nr:</b>	<b>Antigen:</b>	<b>Dag 0</b>	<b>Dag 7</b>	<b>Dag 14</b>	<b>Dag 21</b>	<b>Dag 28</b>
V	1	NCD	44	99	237	418	655
V	2(PBS)	<b>PBS</b>	42	112	270	461	757
M	3	NCD	45	104	263	476	775
M	4	NCD	42	147	355	644	1025
V	5	NCD	47	113	245	409	635
V	6	NCD	43	104	264	493	769
M	7	NCD	42	115	257	441	718
V	8	NCD	45	106	286	540	854
M	9(PBS)	<b>PBS</b>	45	122	313	595	1002
V	10	NCD	42	101	195	287	528
V	11(PBS)	<b>PBS</b>	41	120	275	-	-
V	12	NCD	36	109	293	517	827
M	13	NCD	39	134	336	583	902

### Isolator 6, Groep B2

	<b>Kuiken nr:</b>	<b>Antigen:</b>	<b>Dag 0</b>	<b>Dag 7</b>	<b>Dag 14</b>	<b>Dag 21</b>	<b>Dag 28</b>
V	16	E. coli	41	99	228	452	738
M	17	E. coli	44	-	-	-	-
M	18	E. coli	43	140	375	714	1105
M	19 (PBS)	<b>PBS</b>	44	132	330	583	947
V	20	E. coli	41	113	285	533	866
M	21(PBS)	<b>PBS</b>	42	122	319	592	925
M	22(PBS)	<b>PBS</b>	40	131	349	663	1022
V	23	E. coli	42	114	242	379	-
V	24	E. coli	42	120	323	570	905
M	25	E. coli	44	122	336	653	1004
V	26	E. coli	40	110	273	496	795
V	27	E. coli	39	111	281	521	831
V	28	E. coli	38	101	279	503	792

### Isolator 7, Groep C2

	<b>Kuiken nr:</b>	<b>Antigen:</b>	<b>Dag 0</b>	<b>Dag 7</b>	<b>Dag 14</b>	<b>Dag 21</b>	<b>Dag 28</b>
M	31 (PBS)	<b>PBS</b>	45	127	295	511	827
M	32	SRBC	40	115	281	510	836
M	33	SRBC	42	123	321	572	879
V	34	SRBC	41	91	212	322	509
V	35	SRBC	45	119	200	275	391
V	36	SRBC	40	105	207	316	452
M	37 (PBS)	<b>PBS</b>	41	60	184	373	698
M	38	SRBC	42	95	177	305	-
M	39	SRBC	43	113	310	568	848
V	40	SRBC	43	105	273	502	796
V	41	SRBC	40	93	244	445	695
M	42	SRBC	39	114	284	532	895
V	43 (PBS)	<b>PBS</b>	39	112	314	567	884

### Isolator 8, Groep D2

	<b>Kuiken nr:</b>	<b>Antigen:</b>	<b>Dag 0</b>	<b>Dag 7</b>	<b>Dag 14</b>	<b>Dag 21</b>	<b>Dag 28</b>
V	46	HuSA	41	127	317	547	855
M	47	HuSA	46	94	204	355	669
V	48	HuSA	41	132	281	504	761
M	49 (PBS)	<b>PBS</b>	44	75	180	420	821
M	50	HuSA	42	108	272	513	815
M	51 (PBS)	<b>PBS</b>	41	81	246	513	867
V	52	HuSA	41	147	371	612	886
M	53	HuSA	45	167	418	726	1012
V	54	HuSA	41	96	234	458	760
V	55	HuSA	40	95	228	429	729
V	56 (PBS)	<b>PBS</b>	41	107	242	401	672
M	57	HuSA	33	91	241	454	750
V	58	HuSA	36	108	250	446	702

### Isolator 9, Groep E1

	<b>Kuiken nr:</b>	<b>Antigen:</b>	<b>Dag 0</b>	<b>Dag 7</b>	<b>Dag 14</b>	<b>Dag 21</b>	<b>Dag 28</b>
V	1	PBS	40	105	256	467	718
M	2	PBS	41	118	320	592	909
V	3	PBS	40	86	217	433	744
M	4	PBS	46	102	259	467	762
V	5	PBS	42	100	262	490	761
M	6	PBS	42	119	319	630	1023
V	7	PBS	40	75	213	421	696
M	8	PBS	40	108	298	581	926
V	9	PBS	40	105	266	567	912
V	10	PBS	37	128	319	561	844

### Isolator 10, Groep E2

	<b>Kuiken nr:</b>	<b>Antigen:</b>	<b>Dag 0</b>	<b>Dag 7</b>	<b>Dag 14</b>	<b>Dag 21</b>	<b>Dag 28</b>
V	11	PBS	48	107	191	332	495
M	12	PBS	45	116	272	-	-
M	13	PBS	43	117	320	562	907
V	14	PBS	44	-	-	-	-
V	15	PBS	43	98	153	229	316
M	16	PBS	39	150	366	628	904
M	17	PBS	43	106	277	514	821
M	18	PBS	39	106	307	572	930
V	19	PBS	42	115	294	533	834
M	20	PBS	33	116	318	567	892