



onder laboratorium omstandigheden

Pieter Roskam

Animal Sciences Group (ASG) Lelystad
pieter.roskam@wur.nl

Afbeelding 1
Punctie van de vena jugularis

Naar aanleiding van het uitroeiprogramma van Bovine herpesvirus (BHV) bij runderen is door het ministerie van Landbouw, Natuur en Voedselveiligheid (LNV) aan de Divisie Infectieziekten van de Animal Sciences

Group (ASG) gevraagd om te onderzoeken of een edelhertenpopulatie een reservoir kan zijn voor BHV.

BHV-infecties veroorzaken bij runderen ernstige levensbedreigende luchtwegaandoeningen en bij drachtige runderen abortus. Herpesvirussen zijn soortgebonden en edelherten hebben het CeHV (Cervus elaphus herpesvirus). Door het aanleggen van ecologische corridors wordt het mogelijk dat edelherten kunnen migreren tussen de Veluwe, de Oostvaardersplassen en eventueel richting Duitsland. Hierbij dient voorkomen te worden dat edelherten op hun doortocht lokale runderpopulaties kunnen besmetten met BHV. Via een vaccinatieprogramma wil men BHV bij runderen uitroeien opdat men op den duur kan stoppen met het vaccineren. Dan is het ongewenst dat er in het wild edelherten rondlopen die als reservoir voor BHV kunnen dienen.

Uit bloedmonsters van Heckrunderen uit de Oostvaardersplassen bleek dat het grootste deel van de populatie serologisch positief reageerde op BHV-antigeen en dus op enig moment geïnfecteerd is geweest. Ook edelherten bleken serologisch positief. De ELISA-test van de Gezondheidsdienst voor Dieren kan echter geen onderscheid maken tussen infecties met BHV en CeHV.

Er werd onderzoek gestart met twee vraagstellingen:

- 1 kunnen edelherten geïnfecteerd raken met BHV (pilotexperiment) en zo ja,
- 2 kan BHV zich dan verspreiden binnen een groep edelherten (transmissie)?

Een maat voor het al dan niet verspreiden is het gemiddelde aantal edelherten dat kan worden besmet door een infectieus edelhert (de reproductieratio Ro).

Om deze vragen te kunnen beantwoorden kwamen de onderzoekers bij de Divisie Dierverzorging en Biotechniek van de ASG terecht voor de uitvoering van

het biotechnische gedeelte van de experimenten. Omdat over het houden van edelherten onder laboratoriumomstandigheden weinig tot niets bekend is, werd het door de biotechnici als een grote uitdaging gezien om de experimenten te doen slagen.

En daar stonden we dan: hoe ga je dit aanpakken? Er kwamen gelijk allerlei vragen naar boven, zoals hoe kom je aan edelherten, hoe moet je ze huisvesten, wat eten deze dieren, hoe moeten ze worden gefixeerd bij biotechnische handelingen zoals temperaturen, bloedtappen, neusswabs nemen en het intranasaal (i.n.) infecteren, hoe wild zijn ze in gevangenschap in een infectiestal? Het zijn immers vluchtdieren en de stal is niet zo groot als de ruimte die ze gewend zijn. Uit stand kunnen deze dieren gemakkelijk over je heen springen.

Over deze vragen wil ik graag onze ervaringen met collega biotechnici delen.

Pilotstudy

Opzet

Acclimatisatieperiode (duur twee weken)

Op dag -14 werden vier dieren van een commerciële hertenhouder naar de ASG getransporteerd. Voor dat de dieren werden opgeladen voor transport werden neusswabs voor virusisolatie en bloedmonsters voor bepaling van antilichaamtiter tegen BHV afgenomen. Ook werd de rectaal temperatuur gemeten en werden de herten gewogen. De dieren werden bij aankomst in twee groepen van twee dieren in de infectiestallen gehuisvest.

Twee weken acclimatiseren was voldoende om de dieren te laten wennen aan de biotechnici en de nieuwe huisvesting.

Dag 0
Voor de infectie werden neusswabs en bloedmonsters van alle edelherten genomen. Ook werd de rectaaltemperatuur gemeten en werden de herten klinisch gescoord op vochtuitscheiding via de neus en ogen, neuslaesies, eetlust, gedrag en eventueel andere bijzonderheden. Hierna werden twee dieren intranasaal geïnoculeerd met BHV en twee dieren met CeHV.

Na dag 0

Gedurende veertien dagen na infectie werden van alle edelherten neusswabs ge-

nommen, daarna nog een keer per week. Gedurende zes weken werden eens per week bloedmonsters genomen van alle dieren. Ook werd elke dag de rectaaltemperatuur gemeten en de aan infectie gerelateerde gezondheidsstatus van de dieren gemonitord.

Dag 43 (eind)

Alle edelherten werden geëuthanaseerd door i.v.-toediening van 10 ml T61 per dier (dosering 5 ml per 50 kg).

Resultaten

Bij de BHV-groep raakten beide dieren serologisch positief voor BHV: één op twee weken na inoculatie en het andere dier een week later. Bij de CeHV-groep waren beide dieren één week na inoculatie in de ELISA-test positief.

Transmissie-experiment

Opzet

Er werden twee experimenten gedaan, elk met tien dieren. Van deze tien dieren werden vijf geïnfecteerd en vijf dienden als contactdieren. In de eerste twee weken was de uitvoering gelijk aan de pilotstudy.

Dag 0

Nu werden vijf van de tien dieren geïnoculeerd met BHV en daarna gedurende 24 uur gescheiden van de vijf niet-besmette dieren door een dicht schot middenin de box. Het ventilatievoud werd tijdelijk lager gezet. Na 24 uur werden de dieren weer bij elkaar geplaatst om na te gaan of ze elkaar zouden besmetten.

De eerste twee weken werden elke dag neusswabs genomen van de geïnoculeerde dieren, en daarna een keer per week. Gedurende vier weken werden elke dag neusswabs genomen van de contactdieren en een keer per week bloedmonsters van alle dieren. De geïnoculeerde dieren werden gedurende twee weken rectaal getemperatuur en de contactdieren drie weken.

Dag 29

Alle dieren werden geëuthanaseerd met T61. Om dit veiliger en rustiger te laten verlopen werden de dieren eerst gesedeerd (zie alinea Sedatie).

Resultaten

In beide transmissie-experimenten raakten drie van de vijf geïnoculeerde dieren geïnfecteerd, maar geen van de contactdieren. De reproductieratio was zo klein dat geen gevaar lijkt te bestaan voor transmissie van BHV door edelherten.

Huisvesting en animal handling

Dieren

De herten waren circa eenjarige hinds, afkomstig van een commerciële hertenhouder. De dieren waren genetisch verwant met de edelherten uit de Oostvaardersplassen. De hertenhouder heeft bij het ontstaan van dit natuurgebied geholpen met het bevolken met edelherten. In het voortraject van de experimenten werden de edelherten een paar keer gescreend op de aanwezigheid van antilichamen tegen BHV.

Voor het transmissie-experiment werden 25 hinds uit het koppel gehaald en apart gehuisvest en gescreend. Voor de diverse monsternames kon gebruik worden gemaakt van een 'crush', een hydraulisch bedienbaar 'tosti-ijzer' waarin de de edelherten zodanig worden gefixeerd (geïmmobiliseerd) dat alles zonder gevaar voor de uitvoerenden verliep. Twee van de 25 dieren waren positief in de ELISA en deze werden verwijderd, bij verdere screening waren alle dieren negatief. Uiteindelijk zijn 20 hinds gebruikt voor het transmissie-experiment.

Huisvesting

Voor de pilotstudy werden de edelherten gehuisvest in twee groepjes van twee dieren, elk in een multipurpose infectiestal met een vloeroppervlakte van 15 m². In de stal werd een stempel geplaatst met een draaibaar schot om de dieren achter te fixeren voor de biotechnische handelingen. Op de vloer werd een laagje zaagsel aangebracht. Het eten werd in voerbakken en ruiven aangeboden, drinkwater werd verstrekt via een vlotterwaterbak. Verder was er een normaal dag- en nachtritme in de stal. De temperatuur was

ongeveer 20°C en de relatieve luchtvochtigheid varieerde tussen 55 en 70%.

Voor het transmissie-experiment werden de edelherten per groep van tien gehuisvest in een infectiestal met een vloeroppervlakte van 30 m². Midden in de stal werd een dichte afscheidingswand met een grote deur geplaatst om de dieren na inoculatie 24 uur van elkaar te kunnen scheiden. Verder was de stal qua inrichting gelijk als tijdens de pilotstudy.

Om problemen met de afvoer van besmette mest te voorkomen werd vanaf het begin van het transmissie-experiment grasbrok verstrekt in plaats van hooi. Gedurende de acclimatisatieperiode werden de edelherten door de biotechnici gelokt met wortels. Dit was een leuk spel tussen biotechnicus en edelhert om aan elkaar te wennen.

Handling

De acclimatisatie- en gewenningsperiode was twee weken. Dat was voldoende om de dieren aan de nieuwe omgeving te wennen, hoewel het daar in het begin niet naar uitzag. Op de dag na aankomst ging een groep van de pilotstudy in de stal zo tekeer dat we de hertenhouder gebeld hebben met de vraag of dit hem bekend voor kwam als edelherten verplaatst werden. Hij zei dat we niet te snel in paniek moesten raken en het nog even moesten afwachten. De dag daarop werden de dieren al rustiger en konden we ze weer voorzichtig benaderen. Na twee weken konden we de dieren goed benaderen en aanraken. Dit was van belang voor de biotechnische handelingen die moesten worden uitgevoerd. Aan het eind van de pilotstudy aten de dieren brok uit onze handen.

Bij de pilotstudy werden de dieren bij de biotechnische handelingen door een biotechnicus gefixeerd. Het andere dier was dan in de buurt waardoor het gefixeerde dier rustig bleef.

De acclimatisatieperiode voor het transmissie-experiment verliep anders dan bij de pilotstudy. De dieren waren schuwer en reageerden heftiger. Dit kwam mede doordat de groep groter was. Daarom moest het fixatieschot gebruikt worden voor de biotechnische handelingen. Zonder fixatieschot lukte het niet: als één dier werd gefixeerd, gedroeg de groep zich onrustig en het gefixeerde dier wilde dan ook naar de groep en was niet meer te fixeren.

Temperaturen

Bij het temperatuur experiment werden vijf dieren gefixeerd achter het scharnierbare schot. De dieren stonden dan dichtbij elkaar achter het schot waardoor ze zich op hun gemak voelden en rustig waren. Dit kwam mede door in de acclimatisatieperiode regelmatig te oefenen met het fixeren/groeperen van

Afbeelding 3
Rectaal temperatuur meten

Voeding

Tijdens de pilotstudy werd hooi en rundveebrok aangeboden. Op dat voer deden de edelherten het goed. Voor het afvoeren van de mest werd gebruik gemaakt van een vacuüm-afzuigstelsel. Omdat hooiresten kunnen leiden tot verstoppingen in het afzuigstelsel, zijn we over gegaan op het voeren van grasbrok en rundveebrok. De edelherten namen de grasbrokken goed op.



Neusswabben

Het fixeren bij het nemen van neusswabs ging net zo als bij het temperatuur. Het ging boven verwachting gemakkelijk want de dieren werkten goed mee. In ieder koppel waren wel een paar dieren die het swabben na enkele dagen niet meer zo leuk vonden maar het was met wat geduld heel goed te doen.

Bloedafname

Voor het nemen van bloedmonsters werd het schot richting de scheidingswand gedraaid, het bovenste deel werd weer op het schot geplaatst en er werden donkere zeilen overheen gehangen. De stempel waar het schot aan scharniert, stond iets van de scheidingswand zo werd er een opening gecreëerd waar de kop van het edelhert door heen kon. Hierna probeerden wij met twee biotechnici een edelhert via de muren richting het schot te drijven. Het schot draaiden we iets open zodat het edelhert er gemakkelijker in liep. Zodra het edelhert achter het schot was stak het dier zijn kop door de opening omdat daar nog licht vandaan kwam. Op dat moment greep de derde biotechnicus de kop en draaide deze om de stempel. Op deze wijze kwam de halsvene vrij om bloed af te nemen en stond de biotechnicus zelf buiten het bereik van het edelhert als dit begon te trappen met haar voor- of achterpoten.

Intranasaal infecteren

Om de edelherten i.n. te infecteren werd dezelfde fixatiemethode gebruikt als bij het bloedtappen. Bij het infecteren werd met behulp van een injectiespuit en verstuiver per neusgat een bepaalde hoeveelheid virus toegediend, door te sprayen bij het inademen.

Sedatie

Omdat het fixeren van de edelherten voor het nemen van bloedmonsters wel eens te gevaarlijk zou kunnen zijn voor mens en dier, is nagedacht hoe we dan bloedmonsters moesten gaan nemen. Dit was een moeilijke afweging want: wanneer is het te gevaarlijk en wanneer krijgen de edelherten te veel stress?

Besloten werd om met de dieren uit de pilotstudy na afloop een sedatiemodel te ontwikkelen. Randvoorwaarden hierbij waren dat sedatie snel toe te dienen moest zijn met zo min mogelijk stress en dat de dieren moesten recoveren (reversibel).

Uiteindelijk bleek een mix van 25 mg/ml xylazine (rompun®) en 15 mg/ml ketamine te voldoen. Deze kon i.m. toegediend worden in een klein volume. Om dit toe te dienen werd de groep van vijf edelherten in de box door de scheidingswand verdeeld. Daarna werden de

dieren dicht bij elkaar achter het schot gehouden. Per dier werd 2 ml mix toegediend met een 5 ml-spuit en een 21G-injectienaald. De mix werd i.m. geïnjecteerd in de achterhand (broekspieren). Omdat de dieren er aan gewend waren dat ze regelmatig aangeraakt werden kon de mix bij de meeste dieren vrij gemakkelijk toegediend worden. Omdat er maar een kleine hoeveelheid in een grote spuit zat kon het snel toegediend worden en hadden de dieren niet veel tijd om hier op te reageren. Om de edelherten te laten recoveren werd 1,5 ml antisedan (0,15 mg per kg) i.m. gespoten met een 5 ml-spuit voorzien van een 21G-injectienaald. In de literatuur kwamen we ook de optie tegen om de helft van de antisedan i.v. en de andere helft i.m. te spuiten. Dit was geen succes want de dieren kwamen veel te snel bij. Voor dat alle dieren gespoten waren liepen de eerste dieren al weer door de box.

Euthanaseren

Normaal worden de dieren geëuthanaseerd in de sectiezaal. Om stress en risico van het ontsnappen van de dieren te voorkomen werden de dieren in de stal geëuthanaseerd. Vóóraf werden de dieren gesedeerd om ze rustig en veilig voor mens en dier te kunnen euthanaseren. Nadat de dieren voldoende gesedeerd waren werden ze geëuthanaseerd door het toedienen van T61.

Literatuur

- Mollema L, Rijsewijk FAM, Nodelijk G, De Jong MCM (2005) *Quantification of the transmission of bovine herpesvirus 1 among red deer (Cervus elaphus) under experimental conditions* Veterinary Microbiology 111: 25-34.



Afbeelding 5
Groep edelherten in het transmissie experiment