



**Report of an Expert's Mission
to the Central Veterinary Institute,
Lelystad, the Netherlands,
9-10 August 2011.**

Experts:

**Nigel Ferris, Institute for Animal Health, Ash Road, Pirbright, Surrey,
GU24 0NF, UK**

**Kris De Clercq, Veterinary and Agrochemical Research Center,
Groeselenberg 99, 1180 Ukkel, Belgium**

..... Scientific research at the service of safe food production and animal health

Veterinary and Agrochemical
Research Centre
Groeselenberg 99
B-1180 Ukkel
Belgium

Institute for Animal Health
Ash Road
Pirbright, Surrey
GU24 0NF
UK



The meeting convened on 09 August 2011 at 08:45 a.m.

1. Participants:

- H. van Dongen, Ministry of Economic Affairs, Agriculture and Innovation
- A. Bianchi, J. Bongers, A. Dekker (AD), CVI
- N. Ferris, K. De Clercq, Expert Commission

2. Introduction:

The meeting of the Expert Committee for the technical evaluation of the virus isolation assay performed on a sample from the farm of Teunissen at Kootwijkerbroek in response to a request from the Ministry of Economic Affairs, Agriculture and Innovation was held at the Central Veterinary Institute, Houtribweg 39, 8221 RA Lelystad, The Netherlands.

The meeting was opened by H. van Dongen, Member of the Management team of the Department of Animal Health and Welfare and Consumer Affairs who welcomed the Experts on behalf of C. Bruschke, CVO of the Netherlands, and thanked the Experts for accepting this mission. In his opening remarks he informed the Expert Commission on the background of the Ministry's request and highlighted the objectives.

A. Bianchi, Director CVI, in turn welcomed the Expert Commission and explained the history of the CVI since 2001 and its involvement in the diagnosis of FMD in 2001.

3. Expert's Mission

In the letter from A. Oppers, Director of Food, Animal Health and Welfare and Consumer Affairs, on behalf of the Minister of Agriculture (ref. 223267), the expert commission is required to answer the following question:

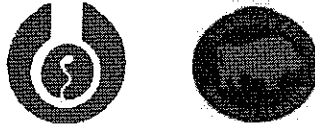
"Regarding the results of the virus culture test and the subsequent IDAS-ELISA, was the sample (no. 26.1.) from the farm of Teunissen in Kootwijkerbroek correctly classified as positive as notified in the fax of 28 March 2001?"

4. Background

During an extensive epidemic of foot-and-mouth disease (FMD) in the United Kingdom, which started in February 2001, FMD spread to the Netherlands in March and subsequently caused a series of (26 confirmed) outbreaks over an approximate 1 month period.

On 20 March, FMD was suspected in the farm of Teunissen in Kootwijkerbroek and 4 sample batch submissions were made from this and (in the case of the 4th submission) an associated premises to the Central Veterinary Institute (CVI) for FMD diagnosis. These submissions comprised (submission number, date received, total number of samples: sample type, respectively):

1. 01.26, 20/21 March, 9: 1 vesicular scrapping, 4 sera and 4 heparinised bloods
2. 01.35, 22 March, 10: 1 scrapping plus 1 head from the same animal, 4 sera and 4 heparinised bloods



3. 01.50, 25 March , 35: 4 heads, 1 leg, 15 sera and 15 heparinised bloods
4. 01.57, 28 March: 67: 1 vesicular material, 50 sera and 16 heparinised bloods

5. Accredited laboratory test procedures

To our understanding, in addition to the clinical evidence derived at the farm, the only test results performed at the CVI which were of legal relevance for declaring a FMD outbreak were those arising from the accredited tests of virus isolation (VI) in cell culture and a FMDV antigen detection ELISA (for detection of FMDV antigen) and a virus neutralisation test (for detection of FMDV antibodies). Additional test procedures were carried out during the course of the investigation, e.g. an animal experiment was performed at the CVI and (at the time, experimental) RT-PCR procedures were undertaken on samples from submission 1 above, and are recorded in the following records which we compiled. These latter test results are not taken into consideration in arriving at our answer to the question posed in section 3.

6. Data Analysis

Based on the evidence presented, we compiled spreadsheets to summarise the laboratory test procedures and results derived from VI and ELISA, which commenced on 21 March up to the 28 March 2001, when a report was faxed to the Ministry detailing FMDV positive results on one heparin sample (no. 26.1.) collected from the farm of Teunissen in Kootwijkerbroek.

These spreadsheets were extended to capture the results that were achieved on dates post 28 March 2001 for completeness and are presented in 4 separate ways:

Table 1: summarises the procedures undertaken and results achieved with respect to timeline

Table 2: summarises the procedures undertaken and results achieved with respect to submission batch

Table 3: summarises the procedures undertaken and results achieved with timeline to include the results from the animal experiment and PCR

Table 4: summarises the procedures undertaken and results achieved with respect to timeline up to and including 28 March, which are relevant to the question that this committee was posed

7. Brief description of some salient information provided by AD

At the beginning of the outbreak, diagnostic samples were inoculated onto cell cultures of pig kidney (PK) cells for VI procedures at the CVI.

However, suspicions arose as to the suitability of using PK cells for the present situation (in terms of their sensitivity for virus detection and growth) as the outbreak causative virus appeared to be poorly adapted for growth in the cell type. Consequently, lamb kidney (LK)



cells were introduced for use in VI test procedures as there was evidence that the causative FMD virus strain would grow more readily in this particular cell type. AD described that LK cell suspensions were available from CVI liquid nitrogen storage to seed cell cultures but as glass tubes (which would normally be used) were present in insufficient numbers to meet test demand, cell growth of the LK cells was attempted in plastic tubes. However, these LK cells adhered poorly to the plastic and so it was decided to seek an alternative source of LK cells and a lamb, obtained from an FMD-free area of the country, was brought to the Institute as a solution. The new LK cells, which were successfully derived in plastic dishes, were eventually available for diagnostic use on 27 March and so some of the previously undertaken VI test procedures relating to this and other cases were either repeated or continued with these new LK cells. Additionally, AD described that the maintenance medium used for inoculated cell cultures was revised (called 'overlay' in accompanying Tables) to include methyl cellulose (to counter the negative influence of cell cytokines on virus replication during cell culture passage, but which was not always consistently used, subsequently).

The consequent outcome was that the stage was reached (on 27 March) where supernatants from PK1 and the material from the original samples from submission 1 could be passaged onto both LK and PK cells (i.e. PK1LK1, PK2 and LK1 passages; VI P30, 31).

The following day (28 March), a cytopathic effect (CPE) was evident in PK1LK1 cell cultures and (less evidently) PK2 cell cultures relating to the sample hep 1. An aliquot of the cell culture supernatant fluid from PK1LK1 was tested by ELISA and yielded positive results against FMDV type O (average corrected optical density value [OD] of 0.34 with undiluted fluid and 0.1 with a 1:5 dilution).

Test results were faxed to the Ministry on 28 March and an outbreak of FMD was declared at the farm of Teunissen in Kootwijkerbroek on this basis.

In an isolation unit at the CVI, a bovine animal was inoculated on 26 March (late pm) at several sites on the tongue with various samples from the submissions of the farm in question. By 28 March, clear vesicular lesions had been produced in the animal, material from which tested positive for FMDV type O in the ELISA (P01.29).

A series of FMDV RT-PCR procedures (which was under experimental development at the time) were performed on the samples but which gave conflicting results – i.e. inconsistent positive/negative results on different samples.

DNA analysis (partial sequence analysis?) was performed at a later date by an independent laboratory to support the provenance of sample origin.

8. Remarks

8.1 Ideally in the framework of quality control and GLP it is recommended that the source of animals for obtaining glands for producing primary cell culture systems be first checked for freedom from FMDV and FMDV antibodies. Practically this ideal is not followed because (quite reasonably) it is assumed that such material is indeed free from FMDV infection when glands are obtained from animals originating from FMDV free areas. Cell cultures are



visually checked simply by microscopic examination (freedom from CPE) before use in virus isolation. During the outbreak, circumstantial evidence from their subsequent diagnostic use provided further evidence that the cells were not inherently positive for FMDV infection, as not all samples became positive following sample inoculation.

8.2 With regard to inoculating cell cultures, there were occasions when prepared samples originating from different premises were added to the same cell culture plate at the same time, which opens the possibility for sample cross contamination to occur. On 27/03/2001 in VI Protocol P30 a sample from farm 2001/04 was added to plates 1 and 3 in well C1. These same plates also contained samples from Submission 01.26. The sample from farm 2001/04 gave a positive CPE after 24h leading to the possibility that this sample may have contaminated the samples from Submission 01.26. However, the sequence order of addition of samples to the plates and the fact that exactly the same results were obtained on plate 1 and plate 3 (3 and 4 being mirror images of 1 and 2 but using different cell types for VI) makes the possibility that cross contamination of samples occurred highly unlikely.

8.3 We do not understand why the CPE positive cell culture supernatant from Heparine 1 sample from Submission 01.26 that was put on PK cells for virus isolation on 25/03/2001 in VI Protocol P24 and passaged after 48h on PK cells in VI Protocol P30 on the 27/03/2001 was not tested by ELISA. Most probably this sample would have given a positive signal in the ELISA and would have provided further support to the conclusion made and reported on 28/03/2001.

8.4 There are other examples post-28/03/2001 of samples giving a CPE positive result that are subsequently not tested in the ELISA such as samples from VI Protocol P30 and P34. Although this has no influence on the final conclusion on submitted samples, we do not understand this inconsistency of approach.

8.5 Only reagents to one FMDV serotype (type O) were included in the ELISA performed on 28 March and the evidence of any possible cross reactions could only be based against SVDV as reagents to this virus were the only additional system included in the assay. There was no evidence of cross reaction with SVDV, which does provide support to the interpretation of the test result. On the occasions when ELISA cross reactions occur then they are more likely to occur against reagents of more than one FMDV serotype and so even if there had been the possibility that the virus had been mis-serotyped, the deduction that the agent was indeed FMDV still holds. Ideally reagents to all 7 FMDV serotypes (or else more than one FMDV serotype) should be included in the ELISA but the fact that this was not done doesn't negate the conclusion made.

8.6. We noted an inconsistent approach to testing supernatants from cell cultures that were evidently CPE negative.

8.7 We could not trace-back the entire reasons why post 28/03/2011 some submitted samples were not processed? It is likely due to a combination of reasons: a) some of the samples were not suitable for test examination, b) the lab personnel were exceptionally busy with dealing with other sample submissions and c) the farm had been declared positive for FMDV rendering further testing unnecessary.



8.8 Related to ELISA Protocol 01.36 on 01/04/2011:

- Sample Hep1 from 01.26 and sample 35-3247 from 01.35 were CPE positive in VI Protocol 37 (passage 2) while negative in ELISA Protocol 01.36
- Two samples (derived from another farm) from VI Protocol 42 being CPE positive were positive in ELISA Protocol 01.36

This led to the conclusion that the set of samples had been inadvertently switched.

This conclusion is not necessarily supported by the data because samples 1 and 13 in the same ELISA were also CPE positive and ELISA negative.

The ELISA negative results for samples from 01.26 and 01.35 are probably valid but a repeat ELISA was not performed following doubts raised on their accuracy.

8.9 Although all samples, tests and results are traceable, this took a lot of time as the Reference Number system used in 2001 for the samples and tests was confusing. We understand that a revision of the Sample Management System has been made post-2001.

8.10 The PCR and Animal experimental results achieved to 28 March undoubtedly influenced the decision to report positive findings in the fax to the Ministry of 28 March 2001.

8.11 The reliability of conclusions made from PCR analyses was fraught because there were inconsistent results achieved in the 5 sequential PCR assays. However, the PCR tests were not taken into account in the conclusion of our evaluation.

9. Expert's Conclusion and Answer to the Question from the Ministry

The faxed report of the 28 March 2001 only mentioned one of the then three accredited test procedures upon which a decision on FMD status could be formulated, that being virus isolation in cell culture. Recognition of positive CPE in cell culture is not in itself sufficient to confirm that the causative agent of the positive CPE was FMDV, it required a positive outcome from the ELISA to do that. The necessity to confirm the agent by ELISA is stated in the CVI SOP LVZ AV02: Isolation of foot-and-mouth disease virus on secondary lamb kidney cells. It would thus appear that it was either remiss to exclude reference to the positive result for FMDV type O which had been achieved by ELISA on 28 March or else the fax was sent prematurely before conclusion of the ELISA. However, the Ministry of Economic Affairs, Agriculture and Innovation confirmed in writing that 'the Ministry always presented the ELISA test as an integral part of the virus isolation test'.

Therefore, the conclusion that FMDV of type O was present in the sample No. 26.1 is vindicated:

- a) On the basis that the ELISA performed on 28/03/2001 (ELISA Protocol P01.29) was validated by the successful performance of the positive control inactivated antigens, yielded low background colour development and without evidence of cross-reactions with SVDV, then the derived average corrected OD value for the undiluted Hep1 sample against FMDV serotype O of 0.34 is a positive result for the presence of FMDV type O [Hep1 being the Heparine 1 sample from Submission 01.26 that was



put on PK cells for virus isolation on 25/03/2001 in VI Protocol P24 and passaged after 48h on LK cells in VI Protocol P30 on the 27/03/2001].

- b) The instances of positive FMDV type O results achieved post-28 March from samples submitted, retrospectively lends weight to the accuracy of the decision that was made to declare an outbreak in Kootwijkerbroek on the date concerned.

10. Final meeting

The preliminary remarks and conclusion were presented on 10 August 2011 at 11:30 at CVI in the presence of following persons:

- K. Kardinal and H. Maurice representing the Ministry of Economic Affairs, Agriculture and Innovation
- A. Bianchi, J. Bongers, A. Dekker, CVI
- N. Ferris, K. De Clercq, Expert Commission

The final remarks and conclusion are presented in this report.



Annex 1. Spreadsheets to summarise the laboratory tests and results from virus isolation (VI) and antigen IDAS-ELISA.
Table 1. Summary of the procedures undertaken and results achieved with respect to timeline

Submission	Date	Protocol Cells	Sample	Result	Stage	Date	Protocol Sample	Result	Remarks
1	20010321	PK1	Vesicle	Bact		20010321	vesicle	US all	
1			Hep 1-3						VNT: 4 sera Neg
1			Hep 4	Bact					No ELISA PK except vesicle
1	20010322	PK2	Filtrate Ves	Bact		20010323	Filtrate Ves		
1			Filtrate Hep 4	Bact			Filtrate Hep 4		
2	20010322	PK1	Scraping in	Bact					
2			Lesion head 3247	Bact					4 sera, 4 Heps NOT tested
3	20010322	PK2	Yeastle	*		No ELISA P16	Lesion head 3247 OM		
1	20010323		Hep 1-2 pool	*		20010322 P10L20			
1			Hep 3-4 pool	*		No ELISA P21			
2	20010323	PK2	Scraping in	*		No ELISA P21			
2			Lesion head 3247	*					
2	20010325	PK1 overlay	Lesion head 3247 OM	*					
1	20010325	PK4	Hep 1-4	*	24h	20010327	Hep 1-4	0.01	Report to Ministry
1	20010327	PK1 overlay	Hep 1	*	48h	20010329 P10L20	Hep 1	0.01	
1			Hep 1	*		20010329 P10L31	Hep 1	2.3	
1			Hep 1	*			Hep 1	0.1	
1			Hep 2-4 pool	*		No ELISA P20 PK2			
1	20010327	PK2 overlay	Hep 1	*	24h		Hep 1	0.0	
1			Hep 2-4 pool	*		20010329 P10L31	Hep 2-4	0.2	
1	20010327	LK1	Hep 1	*					
1			Hep 2-4	*					
2	20010327	PK2/LK1	Scraping in	*					
2			Lesion head 3247	*					
2	20010329	LK1	Lesion head 3247 OM	*		20010329 P10L31	Lesion head 3247 OM	1.0	Report to Ministry 20010401
2			Scraping in	*					
2			Lesion head 3247	*					
3	20010329	LK1 overlay	Lesion head 3247 OM	*		No ELISA P14 LK3			
4	20010329	LK1 overlay	15 Heps	*		20010329 P10L33	15 Heps		Report 20010410 conclusion: all Heps / Ab tests = Neg
1	20010329	PK2 overlay	Scraping in/Heps/Vesicles	*					
1			Hep 1	*		20010401 P10L36	Hep 1		
2	20010329	PK2/LK2	Hep 2-4 pool	*					
2			Scraping in	*					
2			Lesion head 3247	*					
2	20010330	LK2	Lesion head 3247 OM	*		20010401 P10L36	Lesion head 3247 OM		
2			Scraping in	*					
2			Lesion head 3247	*					
2	20010330	LK2	Lesion head 3247 OM	*		20010401 P10L36	Lesion head 3247 OM	2.7	T1
2			15 Heps	*		No ELISA			
1	Submission 01.26	3	Submission 01.30	PK1					first passage in pig kidney cells
2	Submission 01.35	4	Submission 01.37	LK1					first passage in lamb kidney cells



Table 2. Summary of the procedures undertaken and results achieved with respect to submission batch

Submission	Date	Protocol	Cells	Sample	Result	Stage	Date	Protocol	Sample	Result	Remarks
1	20090321	PH	PK1	Vesicle	Bact		20090322		vesicle	Updiff 1:5 all	
1				Hep 1-3							YNJ 4 sera Neg
1				Hep 4	Bact						No ELISA PH except vesicle
1	20090322	P19	PK2	Filtrate Yes	Bact		20090323		Filtrate Yes		
1				Filtrate Hep 4	Bact				Filtrate Hep 6		
1	20090323	P21	PK2	Vesicle			No ELISA P21				
1				Hep 1,2 pool							
1				Hep 2-4 pool							
1	20090325	P24	PK1	Hep 1-4		24h	20090327	P01.29	Hep 1-4		
1				Hep 1-4		48h	20090328	P01.31	Hep 1	P 0.24 T0.1 P 2.3 T1.2	Report to Ministry
1	20090327	P30	PK1/LK1 overlay	Hep 1			No ELISA P30 PK2: WHY?				
1				Hep 2-4 pool							
1				Hep 1							
1				PK2 overlay							
1	20090327	P31	LK1	Hep 1			20090329	P01.31	Hep 1	P 0.9 T0.2	
1				Hep 2-4					Hep 2-4		
1	20090329	P37	LK2 overlay	Hep 1			20090401	P01.36	Hep 1		
1				Hep 2-4 pool							
2	20090322	P18	PK1	Scraping m	Bact						4 sera, 4 heps not tested
2				Lesion head 3247	Bact		No ELISA P18 20090322 P01.20		Lesion head 3247 OM		
2	20090323	P21	PK2	Scraping m			No ELISA P21				
2				Lesion head 3247							
2	20090325	P23	PK1 overlay	Lesion head 3247							
2				Lesion head 3247 OM							
2	20090327	P31	PK2/LK1	Scraping m							
2				Lesion head 3247							
2				Lesion head 3247 OM			20090329 P01.31		Lesion head 3247 OM	P 1.0 T1.2	Report to Ministry 20090401
2	20090328	P34	LK1	Scraping m							
2				Lesion head 3247							
2				Lesion head 3247 OM							
2	20090329	P37	LK1 overlay PK2/LK2	Scraping m			No ELISA P34 LK1: WHY?				
2				Lesion head 3247							
2				Lesion head 3247 OM							
2	20090328	P40	LK2	Scraping m			20090401 P01.35		Lesion head 3247 OM		
2				Lesion head 3247							
2				Lesion head 3247 OM			20090401 P01.36		Lesion head 3247 OM	P 2.1 T1.1	
3	20090329	P33	LK1 overlay	10 Heps			20090330 P01.33		10 Heps		
3	20090330	P40	LK2	10 Heps			No ELISA				
4	20090328			5 sera/18 Heps/Vesicles							Report 20090410 conclusion: all Neg
1	Submission 01.25		3	Submission 01.30	PK1				First passage in pig kidney cells		
2	Submission 01.35		4	Submission 01.37	LK1				first passage in Janso kidney cells		

Table 3. Summary of the procedures undertaken and results achieved with timeline to include the results from the animal experiment and PCR

Submission	Date	Protocol	Cells	VI	Sample	Result	Stage	Date	Protocol	Sample	Result	Unit	Result	Remarks
1	20010321	P18	PK1	Yes/No	Hep 1-3	Bact		20010323		Yes/No	1:5 dil			
1	20010322	P19	PK2	Bact	Hep 4	Bact		20010323		Yes/No	1:5 dil			VAL 4 sera Neg No ELISA PK except vesicle
1	20010322	P18	PK1	Fixate Yes Scrapping in	Fixate Hep 4 Lesion head 3247	Bact		20010323		Fixate Yes Fixate Hep 4				
2	20010322	P19	PK2	Yes/No	Yes/No	Bact		No ELISA PK 20010322 P0120		Lesion head 3247 OM				4 sera. 4 heps not tested
1	20010323	P21	PK2	Yes/No	Yes/No	Bact		No ELISA P21						
1	20010323	P21	PK2	Hep 1-3 pool Hep 3-4 pool Scrapping in	Hep 1-3 Hep 3-4 Scrapping in	Bact		No ELISA P21						
2	20010323	P23	PK2	Lesion head 3247	Lesion head 3247	Bact		No ELISA P23						
1	20010323	P23	PK2	Lesion head 3247 OM Hep 1-3	Lesion head 3247 OM Hep 1-3	Bact		20010327	Hep 1-4					
1	20010323	P24	PK2	Hep 1-3	Hep 1-3	Bact		20010329	Lesions					
1	20010323	P24	PK2	Hep 1-3	Hep 1-3	Bact		20010329	Lesions					
2	20010327	P30	PK2/LK1 overlay	Hep 1	Hep 1	Bact		20010329	Hep 1					Report to Ministry
1	20010327	P30	PK2/LK1 overlay	Hep 1	Hep 1	Bact		20010329	Hep 1					
1	20010327	P31	PK2	Hep 2-4 pool	Hep 2-4 pool	Bact		20010329	Hep 1					
1	20010327	P31	LK1	Hep 1	Hep 1	Bact		20010329	Hep 2-4					
1	20010327	P31	PK2/LK1	Scrapping in	Scrapping in	Bact		20010329	Hep 1					
2	20010327	P31	PK2/LK1	Lesion head 3247	Lesion head 3247 OM	Bact		20010329	Hep 2-4					
2	20010328	P34	LK1 PK2/LK1 overlay	Lesion head 3247 Scrapping in	Lesion head 3247 OM Scrapping in	Bact		20010329	Lesion head 3247 OM					Report to Ministry 20010401
2	20010328	P34	LK1 PK2/LK1 overlay	Lesion head 3247 Scrapping in	Lesion head 3247 OM Scrapping in	Bact		20010329	Lesion head 3247 OM					
2	20010328	P34	LK1 PK2/LK1 overlay	Lesion head 3247 Scrapping in	Lesion head 3247 OM Scrapping in	Bact		20010329	Lesion head 3247 OM					
3	20010328	P33	LK1 overlay LK1 overlay	Lesion head 3247 OM Hep 1	Lesion head 3247 OM Hep 1	Bact		No ELISA PK like WH17 20010329 P0130	Lesion head 3247 OM Hep 1					Report to Ministry 20010401
4	20010328	P37	LK2 overlay	Hep 1	Hep 1	Bact		20010401 P0136	Hep 1					
1	20010328	P37	PK2/LK2	Hep 2-4 pool	Hep 2-4 pool	Bact		20010401 P0136	Hep 1					
2	20010328	P37	PK2/LK2	Scrapping in	Scrapping in	Bact		20010401 P0136	Hep 1					
2	20010328	P37	LK2	Lesion head 3247	Lesion head 3247 OM	Bact		20010401 P0136	Lesion head 3247 OM					
2	20010328	P37	PK2/LK2	Scrapping in	Scrapping in	Bact		20010401 P0136	Lesion head 3247 OM					
2	20010328	P40	LK2	Lesion head 3247	Lesion head 3247 OM	Bact		20010401 P0136	Lesion head 3247 OM					
3	20010328	P40	LK2	Lesion head 3247	Lesion head 3247 OM	Bact		20010401 P0136	Lesion head 3247 OM					
1	Submission 0126		3	Submission 0126	Submission 0126	PK1								
2	Submission 0135		4	Submission 0135	Submission 0135	LK1								fast passage in pig tissues cells fast passage in lamb gutting cells



Table 4. Summary of the procedures undertaken and results achieved with respect to timeline up to and including 28 March, which are relevant to the question that this committee was posed.

Submission	Date	Protocol	Cells	Sample	Result	Stage	Date	Protocol	Sample	ELISA	Result	Unit	Remarks
1	20010321	P14	PK1	Vesicle	Bact		20010323		vesicle			1.5 dB	
1				Hep 1-3									WNT: 4 sera Neg
1				Hep 4									No ELISA P14 accept vesicle
1	20010322	P19	PK2	Filtrate Ves	Bact		20010323		Filtrate Ves				
1				Filtrate Hep 4	Bact				Filtrate Hep 4				
2	20010322	P18	PK1	Scraping xx	Bact								
2				Lesion head 3247	Bact								4 sera, 6 heps not tested
2	20010322	P21	PK2	Vesicle			No ELISA P19						
1	20010323	P21	PK2	Hep 1-2 pool			20010322	P01.20	Lesion head 3247 OM				
1				Hep 3-4 pool			No ELISA P21						
1	20010323	P21	PK2	Scraping xx									
2				Lesion head 3247			No ELISA P21						
2	20010325	P23	PK1 overlay	Lesion head 3247									
1	20010325	P24	PK1	Lesion head 3247 OM									
1	20010327	P30	PK1LK1 overlay	Hep 1-4			20010327		Hep 1-4				
1				Hep 1					Hep 1			0.3%	0.1
1				Hep 2-4 pool									Report to Ministry
1	20010327	P31	PK2 overlay	Hep 1									
1				Hep 2-4 pool									
1				Hep 1									
1				Hep 2-4									
2	20010327	P31	PK2LK1	Scraping xx									
2				Lesion head 3247									
2				Lesion head 3247 OM									
1	Submission 01.26	PK1		first passage in pig kidney cells									
2	Submission 01.35	LK1		first passage in lamb kidney cells									



Report finalised on 23 August with table revisions on 2 September 2011.

Nigel Ferris
Institute for Animal Health
Ash Road
Furbricht, Surrey
GU24 0NF
UK

Kris De Clercq
Veterinary and Agrochemical research Center
Groeselenberg 99
1180 Ukkel
Belgium



Report finalised on 23 August with table revisions on 2 September 2011.

Nigel Ferris
Institute for Animal Health
Ash Road
Pirbright, Surrey
GU24 0NF
UK

Kris De Clercq
Veterinary and Agrochemical research Center
Groeselenberg 99
1180 Ukkel
Belgium

**Rapport van een expertbezoek
aan het Centraal Veterinair Instituut,
Lelystad, Nederland,
9-10 augustus 2011.**

Experts:

Nigel Ferris, Institute for Animal Health, Ash Road, Pirbright, Surrey,
GU24 0NF, Verenigd Koninkrijk

Kris De Clercq, Centrum voor Onderzoek in Diergeneeskunde en
Agrochemie, Groeselenberg 99, 1180 Ukkel, België

Wetenschappelijk onderzoek ten behoeve van veilige voedselproductie en diergezondheid

Logo Logo Institute for Animal Health

B-1180 Ukkel
België

GU24 0NF
Verenigd Koninkrijk

De vergadering werd geopend op 9 augustus 2011 om 08:45 uur.

1. Deelnemers:

- H. van Dongen, Ministerie van Economische Zaken, Landbouw en Innovatie
- A. Bianchi, J. Bongers, A. Dekker (AD), CVI
- N. Ferris, K. De Clercq, expertcommissie

2. Inleiding:

De vergadering van het expertcomité voor de technische evaluatie van de virusisolatietest, die is uitgevoerd op een monster van de boerderij van Teunissen in Kootwijkerbroek in reactie op een verzoek van het Ministerie van Economische Zaken, Landbouw en Innovatie, werd gehouden in het Centraal Veterinair Instituut, Houtribweg 39, 8221 RA Lelystad, Nederland.

De vergadering werd geopend door H. van Dongen, lid van het managementteam van de directie Voedsel, Dier en Consument, die de experts verwelkomde uit naam van C. Brusckke, CVO van Nederland, en die de experts bedankte voor het aannemen van de opdracht. In zijn inleiding informeerde hij de expertcommissie over de achtergrond van het verzoek van het ministerie en benadrukte hij de doelstellingen.

A. Bianchi, directeur van het CVI, verwelkomde op zijn beurt de expertcommissie en bracht hen op de hoogte van de geschiedenis van het CVI sinds 2001 en de betrokkenheid van het CVI bij de diagnose van MKZ in 2001.

3. Opdracht van de experts

In de brief van A. Oppers, directeur van Voedsel, Dier en Consument, namens het Ministerie van Landbouw (ref. 223267), wordt de expertcommissie verzocht een antwoord te geven op de volgende vraag:

"Aangaande de resultaten van de viruscultuurtest en de daarop volgende IDAS-ELISA, is het monster (nr. 26.1.) van de boerderij van Teunissen in Kootwijkerbroek correct geclassificeerd als positief in de fax van 28 maart 2001?"

4. Achtergrond

Tijdens een omvangrijke epidemie van mond-en-klauwzeer (MKZ) in het Verenigd Koninkrijk, die begon in februari 2001, verspreidde MKZ zich in maart naar Nederland en veroorzaakte daar vervolgens een reeks van (26 bevestigde) uitbraken gedurende een periode van ongeveer één maand.

Op 20 maart werd de aanwezigheid van MKZ vermoed op de boerderij van Teunissen in Kootwijkerbroek en werden daar en (in het geval van de vierde inzending) in een daaraan gelieerd bedrijf vier partijen monsters genomen en aangeboden bij het Centraal Veterinair Instituut (CVI) voor diagnose op MKZ. Het ging hierbij om (respectievelijk submissienummer, datum ontvangen, totaal aantal monsters: type monsters):

1. 01.26, 20/21 maart, 9: 1 schraapsel van blaren, 4 sera en 4 gehepariniseerd bloed
2. 01.35, 22 maart, 10: 1 schraapsel plus 1 kop van hetzelfde dier, 4 sera en 4 gehepariniseerd bloed
3. 01.50, 25 maart, 35: 4 koppen, 1 poot, 15 sera en 15 gehepariniseerd bloed
4. 01.57, 28 maart: 67: 1 blaarmateriaal, 50 sera en 16 gehepariniseerd bloed

5. Geaccrediteerde laboratoriumtestprocedures

Naast het klinisch bewijs dat werd verkregen op de boerderij, waren, voor zover wij weten, de enige van het CVI afkomstige testresultaten die van juridische relevantie waren voor het vaststellen van een MKZ-uitbraak, de resultaten van de geaccrediteerde virusisolatietests (VI) in celcultuur en een MKZV-antigeendetectie ELISA (voor het opsporen van MKZV-antigen) en een virusneutralisatietest (voor het opsporen van MKZV-antilichamen). Verdere testprocedures werden tijdens het onderzoek uitgevoerd, er is bijvoorbeeld een dierexperiment uitgevoerd bij het CVI en er zijn (op dat moment nog experimentele) RT-PCR-procedures uitgevoerd op monsters van de hierboven genoemde submittie I, en resultaten werden vastgelegd in de onderstaande rapporten die we hebben opgesteld. Deze laatste testresultaten zijn niet meegenomen bij de totstandkoming van ons antwoord op de vraag uit paragraaf 3.

6. Data-analyse

Op basis van het gepresenteerde bewijs hebben wij spreadsheets opgesteld als samenvatting van de laboratoriumtestprocedures en de resultaten van VI en ELISA, uitgevoerd van 21 maart tot 28 maart 2001. Op die datum werd een rapport naar het ministerie gefaxt met daarin een nauwkeurige beschrijving van de positieve uitslag voor MKZV in één heparinemonster (nr. 26.1.) dat was genomen op de boerderij van Teunissen in Kootwijkerbroek.

Deze spreadsheets werden voor de volledigheid aangevuld met de resultaten van tests die zijn gedaan na 28 maart 2001 en zijn op 4 verschillende manieren weergegeven:

Tabel 1: geeft een overzicht van de gevolgde procedures en behaalde resultaten wat betreft de tijdlijn

Tabel 2: geeft een overzicht van de gevolgde procedures en behaalde resultaten wat betreft de ingediende partij monsters.

Tabel 3: geeft een overzicht van de gevolgde procedures en behaalde resultaten met een tijdlijn waarin ook de resultaten van het dierexperiment en PCR zijn meegenomen

Tabel 4: geeft een overzicht van de gevolgde procedures en behaalde resultaten wat betreft de tijdlijn tot en met 28 maart, die relevant zijn voor de aan het comité gestelde vraag

7. Korte beschrijving van veelzeggende informatie die is geleverd door AD

Bij het begin van de uitbraak werden diagnostische monsters geënt op celculturen van varkensnier (VN) voor VI-procedures bij het CVI.

Er rezen echter twijfels over de geschiktheid van het gebruik van VN-cellen (wat betreft hun gevoeligheid voor virusdetectie en groei) in de huidige situatie, omdat het virus dat de uitbraak veroorzaakte slecht aangepast leek voor groei in dit celttype. Daarom werden lammerniercellen (LN) geïntroduceerd voor het gebruik bij VI-testprocedures aangezien er aanwijzingen waren dat de oorzakelijke MKZ-virusstam beter zou groeien in dit celttype. AD beschreef dat LN-celsuspensies beschikbaar waren in de vloeibare stikstofopslag van het CVI om celkweken in te zetten, maar dat er geprobeerd werd de LN-cellen te laten groeien in plastic buisjes, omdat er onvoldoende glazen buisjes (die normaal gesproken gebruikt zouden worden) waren om aan de testbehoefte te voldoen. De LN-cellen hechtten zich echter slecht aan het plastic, waarop werd besloten op zoek te gaan naar een alternatieve bron van LN-cellen. Dit werd opgelost doordat een lam uit een MKZ-vrij deel van het land naar het instituut werd gebracht. De nieuwe LN-cellen, die met succes in plastic schaaltes werden gekweekt, waren uiteindelijk op 27 maart beschikbaar voor diagnostisch gebruik en een aantal van de eerder uitgevoerde VI-testprocedures met betrekking tot deze en andere gevallen werden herhaald of voortgezet met deze nieuwe LN-cellen. AD beschreef daarnaast ook dat het onderhoudsmedium dat werd gebruikt voor de geïnoculeerde celculturen werd herzien (kopje 'overlay' in de bijgevoegde tabellen), waardoor het methylcellulose bevatte (om de negatieve invloed van celcytokinen op virusrePLICATIE gedurende de passage in de celcultuur tegen te gaan, maar dit werd hierna niet altijd consequent gebruikt).

Het resultaat hiervan was dat (op 27 maart) het stadium werd bereikt dat supernatant van VN1 en het materiaal van het oorspronkelijke monster van submittie 1 konden worden gepasseerd op zowel LN- als VN-cellen (d.w.z. VN1LN1-, VN2- en LN1-passages; VI P30, 31).

De volgende dag (28 maart) was een cytopathisch effect (CPE) te zien in de VN1LN1-celculturen en (minder duidelijk) VN2-celculturen van het monster hep 1. Een deel (aliquot) van de supernatantvloeistof van de celcultuur van VN1LN1 werd getest met ELISA en gaf positieve resultaten voor MKZV-type O (gemiddelde gecorrigeerde optische dichtheidswaarde [OD] van 0,34 bij onverdunde vloeistof en 0,1 bij een verdunning van 1:5).

De testresultaten werden op 28 maart gefaxt naar het ministerie en op basis hiervan werd een uitbraak van MKZ afgekondigd bij de boerderij van Teunissen in Kootwijkerbroek.

Op 26 maart werd (laat in de avond) in een isolatie-eenheid van het CVI een runderachtige op meerdere plekken op de tong geïnoculeerd met verschillende monsters uit de ingediende partijen van de betreffende boerderij. Op 28 maart waren er duidelijke vesiculaire laesies zichtbaar bij het dier. Het verkregen materiaal leverde een positief testresultaat op voor MKZV-type O in de ELISA (P01.29).

Er werd een reeks MKZV RT-PCR-procedures (die op dat moment nog in experimentele ontwikkeling waren) uitgevoerd op de monsters, echter met conflicterende resultaten; d.w.z. verschillende monsters gaven inconsistente

positieve/negatieve resultaten.

Op een latere datum is nog een DNA-analyse (gedeeltelijke sequentieanalyse) uitgevoerd door een onafhankelijk laboratorium om de oorsprong van het monster te bevestigen.

8. Opmerkingen

8.1 In het kader van kwaliteitscontrole en GLP wordt idealiter aangeraden dat het gebied waaruit de dieren, waarvan de klieren worden gebruikt voor het produceren van primaire celcultuursystemen, afkomstig zijn, eerst worden gecontroleerd op afwezigheid van MKZV en MKZV-antilichamen. In de praktijk wordt deze richtlijn niet opgevolgd omdat er (redelijkerwijs) van wordt uitgegaan dat dit materiaal inderdaad vrij is van MKZV-infectie als de klieren verkregen zijn uit dieren die uit een MKZV-vrij gebied komen. De celculturen worden vóór gebruik bij virusisolatie visueel gecontroleerd door middel van microscopisch onderzoek (afwezigheid van CPE). Tijdens de uitbraak leverde indirect bewijs, verkregen uit hun verdere diagnostische gebruik, aanvullend bewijs dat de cellen niet inherent positief waren voor MKZV-infectie, aangezien niet alle monsters een positieve uitslag gaven na inoculatie hiermee.

8.2 Met betrekking tot het inoculeren van celculturen waren er gevallen waarbij geprepareerde monsters van verschillende locaties tegelijkertijd aan dezelfde celcultuurplaat werden toegevoegd, waardoor de mogelijkheid bestaat dat er kruisbesmetting kon plaatsvinden. Op 27/03/2001 in VI Protocol P30 werd een monster van boerderij 2001/04 toegevoegd aan platen 1 en 3 in well C1. Diezelfde platen bevatten ook monsters van submitisie 01.26. Het monster van boerderij 2001/04 gaf na 24 uur een positieve CPE, waardoor de mogelijkheid bestaat dat dit monster de monsters van submitisie 01.26 heeft besmet. De volgorde waarin de monsters op de plaat werden aangebracht en het feit dat exact dezelfde resultaten werden verkregen op platen 1 en 3 (3 en 4 waren het spiegelbeeld van 1 en 2, maar bevatten verschillende celtypen voor VI), maken het echter zeer onwaarschijnlijk dat er kruisbesmetting van monsters heeft plaatsgevonden.

8.3 We begrijpen niet waarom het supernatant van de CPE positieve celcultuur van het heparine 1-monster uit submitisie 01.26, dat op 25/03/2001 op VN-cellen werd gezet voor virusisolatie in VI Protocol P24 en dat na 48 uur op 27/03/2001 werd gepasseerd op VN-cellen in VI protocol P30, niet is getest door ELISA. Dit monster zou zeer waarschijnlijk een positief signaal hebben gegeven in de ELISA en zou de conclusie die op 28/03/2001 werd getrokken en gerapporteerd verder hebben ondersteund.

8.4 Er zijn andere voorbeelden na 28/03/2001 van monsters die een CPE positief resultaat hadden die vervolgens niet werden getest in de ELISA, zoals de monsters van VI Protocol P30 en P34. Hoewel dit geen invloed heeft op de uiteindelijke conclusie, kunnen we de inconsequentie van deze benadering niet begrijpen.

8.5 In de ELISA die werd uitgevoerd op 28 maart werden alleen reagentia gebruikt voor één MKZV-serotype (type O) en bewijzen voor mogelijke kruisbesmettingen kunnen

alleen worden gebaseerd op reactie tegen SVDV, aangezien reagentia voor dit virus het enige extra systeem was dat was opgenomen in de analyses. Er waren geen aanwijzingen voor kruisbesmetting met SVDV, wat de interpretatie van de testresultaten ondersteunt. Wanneer er ELISA-kruisreacties plaatsvinden, is het waarschijnlijker dat deze plaatsvinden tegen reagentia voor meer dan één MKZV-serotype. Dus zelfs als de kans bestond dat het virus verkeerd was geserotypeerd, blijft de conclusie staan dat het agens inderdaad MKZV was. Idealiter zouden reagentia voor alle 7 MKZV-serotypen (of anders meer dan één MKZV-serotype) moeten worden meegenomen in de ELISA, maar het feit dat dit niet is gebeurd, doet niets af aan de conclusie die werd getrokken.

8.6. We hebben opgemerkt dat er een inconsequente benadering bestaat voor het testen van supernatants van celculturen die duidelijk CPE negatief waren.

8.7 We hebben niet alle redenen kunnen herleiden waarom na 28/03/2011 sommige ingediende monsters niet werden verwerkt. Dit heeft waarschijnlijk een aantal redenen: a) sommige monsters waren niet geschikt voor testonderzoek, b) het laboratoriumpersoneel was buitengewoon druk bezig met het verwerken van andere ingediende monsters, en c) de boerderij was positief verklaard voor MKZV, waardoor verdere testen niet nodig waren.

8.8 Met betrekking tot ELISA Protocol 01.36 van 01/04/2011:

- Monster Hep1 van 01.26 en monster 35-3247 van 01.35 waren CPE positief in VI Protocol 37 (2^e passage) en negatief bij ELISA Protocol 01.36
- Twee monsters (afkomstig van een andere boerderij) van VI Protocol 42 die CPE positief waren, waren positief in ELISA Protocol 01.36

Hieruit is geconcludeerd dat de twee monsters per ongeluk zijn verwisseld. Deze conclusie wordt echter niet noodzakelijkerwijs ondersteund door de gegevens omdat monsters 1 en 13 uit dezelfde ELISA ook CPE positief en ELISA negatief waren. De ELISA negatieve resultaten voor de monsters uit 01.26 en 01.35 zijn waarschijnlijk valide, maar er werd geen herhaalde ELISA uitgevoerd omdat er twijfels waren over de accuraatheid van de tests.

8.9 Hoewel alle monsters, tests en resultaten herleidbaar waren, kostte dit veel tijd omdat het referentienummersysteem dat in 2001 in gebruik was voor de monsters en testen verwarrend was. We hebben vernomen dat er na 2001 een herziening is geweest van het monstermanagementsysteem.

8.10 De resultaten van de PCR en het dierexperiment die waren verkregen vóór 28 maart zijn ongetwijfeld van invloed geweest op het besluit om positieve bevindingen te rapporteren in de fax aan het ministerie van 28 maart 2001.

8.11 De betrouwbaarheid van de conclusies die werden getrokken aan de hand van PCR-analyses was aangetast, omdat er inconsistente resultaten werden behaald in de vijf PCR-analyses die daarna zijn uitgevoerd. De PCR-tests zijn echter niet meegenomen in de conclusie van onze evaluatie.

9. Expertconclusie en antwoord op de vraag van het ministerie

Het gefaxte rapport van 28 maart 2001 vermeldde slechts een van de drie toen geaccrediteerde testprocedures waarop een besluit tot MKZ-status kon worden gebaseerd, namelijk virusisolatie in een celcultuur. Het vaststellen van positieve CPE in celcultuur is op zich niet voldoende om te bevestigen dat oorzakelijk agens van de positieve CPE MKZV was; daarvoor is een positieve uitslag van de ELISA nodig. De noodzaak om het agens te bevestigen door middel van ELISA wordt genoemd in de CVI SOP LVZ AV02: Isolatie van het mond-en-klauwzeervirus op secundaire lammerniercellen. Het lijkt er dus op dat er ofwel sprake was van nalatigheid om een verwijzing naar het positieve resultaat voor MKZV-type O dat was verkregen met ELISA op 28 maart weg te laten, ofwel dat de fax vroegtijdig is verzonden, voordat een conclusie van de ELISA was verkregen. Het Ministerie van Economische Zaken, Landbouw en Innovatie heeft echter schriftelijk bevestigd dat 'het ministerie de ELISA-test altijd heeft gepresenteerd als een integraal onderdeel van de virusisolatietest'.

De conclusie dat MKZV van type O aanwezig was in monster nr. 26.1 is daarom gerechtvaardigd:

- a) Op basis van het feit dat de ELISA, die werd uitgevoerd op 28/03/2001 (ELISA Protocol P01.29), valide werd geacht door de succesvolle uitvoering van de positieve controle met geïnactiveerde antigenen, een lage achtergrondkleurontwikkeling, en er geen bewijs bestond voor kruisreacties met SVDV, is de afgeleide gemiddelde gecorrigeerde OD-waarde voor het onverdunde hep1-monster voor MKZV serotype-O van 0,34 een positief resultaat voor de aanwezigheid van MKZV-type O [waarbij hep1 het heparine 1-monster van submittie 01.26 is dat op 25/03/2001 op VN-cellen werd geplaatst voor virusisolatie in VI Protocol P24 en na 48 uur op 27/03/2001 werd gepasseerd op LN-cellen in VI Protocol P30].
- b) De gevallen van positieve MKZV-type O resultaten die na 28 maart werden verkregen uit de ingediende monsters verlenen achteraf gezien juistheid aan het besluit om op de betreffende datum een uitbraak vast te stellen in Kootwijkerbroek.

10. Slotbijeenkomst

De voorlopige opmerkingen en conclusie werden gepresenteerd op 10 augustus 2011 om 11:30 uur bij het CVI in de aanwezigheid van de onderstaande personen:

- K. Kardinal en H. Maurice namens het Ministerie van Economische Zaken, Landbouw en Innovatie
- A. Bianchi, J. Bongers, A. Dekker, CVI
- N. Ferris, K. De Clercq, Expertcommissie

De slotopmerkingen en conclusie zijn opgenomen in dit rapport.

Bijlage 1. Spreadsheets ter samenvatting van de laboratoriumtests en resultaten van virusisolatie (VI) en antigeen IDAS-ELISA. Tabel 1. Overzicht van de gevolgde procedures en behaalde resultaten wat betreft de tijdlijn

Submissie	Datum	Protocol	Cellen	VI Monstert	Stadium	ELISA Datum	Protocol	Monstert	Resultaat	Resultaat	Opmerkingen
1	20010321	P14	VNI	Blaar		20010323		vesiculair			VNI: 4 ser. Neg
1				Hep 1-3							Green ELISA P14 behalve Blaar
1	20010321	P19	VN2	Hep 4							
1	20010321	P19	VN2	Filtraat Ves		20010323		Filtraat Ves			
1	20010321	P18	VNI	Straal Hep4				Filtraat Hep4			
2				Schraafsel xx							
2				Laesie kop 3247							4 ser. 4 hep. niet getest
2	20010322	P21	VN2	Blaar		20010323	P01.20	Laesie kop 3247 OM			
1	20010323			Hep 1-2 pond							
1	20010323			Hep 3-4 pond							
2	20010323	P21	VN2	Schraafsel xx							
2	20010325	P23	VNI overlay	Laesie kop 3247							
2	20010325	P24	VNI	Laesie kop 3247 OM							
1	20010327	P30	VNI/VNI overlay	Hep 1-4		20010327	P01.28	Hep 2-4			
1				Hep 1		20010329	P01.31	Hep 1			Respondeen realiseren
1				Hep 2-4 pond							
1				Hep 1							
1	20010327	P31	VNI	Hep 1		20010329	P01.31	Hep 1			
1				Hep 2-4							
1	20010327	P31	VNI/VNI	Schraafsel xx							
2				Laesie kop 3247							
2				Laesie kop 3247 OM							
2	20010328	P34	VNI/VNI overlay	Schraafsel xx		20010329	P01.31	Laesie kop 3247 OM	1.8	1.2	Respondeen realiseren 20010401
2				Laesie kop 3247							
2				Laesie kop 3247 OM							
3	20010328	P33	VNI overlay	15 Hep4		20010330	P01.33	15 Hep4			
4	20010328			15 ser. 16 behalve Blaar							
1	20010328	P37	VNI overlay	Hep 1		20010401	P01.36	Hep 1			Rapport 20010410 conclusie: alle neg / Ad tests afgevoerd
1				Hep 2-4 pond							
2	20010328	P37	VNI/VNI	Schraafsel xx							
2				Laesie kop 3247							
2				Laesie kop 3247 OM							
2	20010330	P40	VNI/VNI	Schraafsel xx		20010401	P01.36	Laesie kop 3247 OM			
2				Laesie kop 3247							
2				Laesie kop 3247 OM							
3	20010330	P40	VNI	15 Hep4		20010401	P01.36	Laesie kop 3247 OM	2.1	1.1	
1	Submissie 01.25			Schraafsel xx							
2	Submissie 01.25			Laesie kop 3247 OM							
1	Submissie 01.25		3	Laesie kop 3247 OM							
2	Submissie 01.25		4	Green ELISA							
				overals passage in vermenscolen							
				perifele passage in lammetriecolten							

Tabel 2. Overzicht van de gevolgde procedures en behaalde resultaten wat betreft de ingediende partij

Submissie	Datum	Protocol	Colten	VI Monster	Resul- taat	Stadium	ELISA Datum	Protocol	Monster	Resultaat		Opmerkingen	
										Over- dund	1,5 verdu- ning		
1	20010321	P14	VN1	Blaar Hep 1-3	Bact		20010323		verschillen			VNT 4 en 6 Neg Geen ELISA P14 behaalde Blaar	
1	20010322	P19	VN2	Filtreat Ves Filtreat Hep4 Blaar	Bact Bact Bact		20010323		Filtreat Ves Filtreat Hep4				
1	20010323	P21	VN2	Blaar	-		Geen ELISA P21						
1	20010325	P24	VN1	Hep 1-2 pool Hep 3-4 pool	-		20010327		Hep 1-4				
1	20010327	P30	VN1/LN1 overlay	Hep 1-4 Hep 1	-	24 Jun 30 wv	20010329 20010329	P01.29 P01.31	Hep 1 Hep 1		0.34 2.3	0.1 1.2	Rapport aan ministerie
1	20010328	P37	VN2 overlay	Hep 2-4 pool Hep 1	-		Geen ELISA P30 VN2 WAAROM?						
1	20010327	P31	LN1	Hep 2-4 pool Hep 1	-		20010329	P01.31	Hep 1		0.8	0.2	
1	20010328	P37	LN2 overlay	Hep 2-4 Hep 1	-		20010401	P01.36	Hep 2-4 Hep 1				
2	20010322	P18	VN1	Schraapsel xx Laesie kop 3247	Bact Bact		Geen ELISA P18 20010322	P01.20	Laesie kop 3247 OM				4 sets, 4 heps, dat gefast
2	20010323	P21	VN2	Schraapsel xx Laesie kop 3247	-		Geen ELISA P21						
2	20010325	P23	PN1 overlay VN2/LN1	Laesie kop 3247 OM Schraapsel xx	-								
2	20010327	P31	LN1	Laesie kop 3247	-								
2	20010328	P34	VN2/LN1 overlay	Laesie kop 3247 OM Schraapsel xx	-		20010329	P01.31	Laesie kop 3247 OM		1.8	1.2	Rapport aan ministerie 20010401
2	20010329	P37	LN1 overlay	Laesie kop 3247 OM Schraapsel xx	-		Geen ELISA P34 LN1 WAAROM?						
2	20010329	P37	VN2/LN2	Schraapsel xx	-								
2	20010330	P40	LN2	Laesie kop 3247 OM Schraapsel xx	-		20010401	P01.36	Laesie kop 3247 OM				
2	20010328	P34	LN2	Laesie kop 3247 OM	-		20010401	P01.36	Laesie kop 3247 OM		2.1	1.1	
3	20010329	P43	LN1 overlay	15 Heps	-		20010330	P01.33	15 Heps				
3	20010328	P40	LN2	15 Heps	-		Geen ELISA						
4	20010328			15 saraf 18 Heps / Blaar									
1	Submissie 01.26	3		Submissie 01.20	VN1	eerste passage in van Kaderlaboort serie passage in IJmmerrecellin							
2	Submissie 01.35	4		Submissie 01.37	LN1							Rapport 20010410 beschikbare alle heps	

Tabel 3. overzicht van de gevolgde procedures en behaalde resultaten met een tijdlijn waardoor ook de resultaten van het dierexperiment en PCR zijn meegenomen

Submissie	Datum	Protocol	Cellen	VI Monstert	Resultaat	Sie- dium	ELISA Datum	Protocol	Monstert	Resultaat	Opmerkingen
1	20010321	P14	VN1	Blaar Hep 1-3	Bact		20010323		verschillen		VNT: 4 sera neg Geen ELISA P14 behalve Blaar
1	20010322	P13	VN2	Hep 4 Filtraat Ves	Bact		20010323		Filtraat Ves Fibrat Hep 4		
2	20010322	P18	VN1	Schraapsel xx Laesie kop 3247	Bact Bact		Geen ELISA P18 20010322				4 sera, 4 heps, niet gelast
1	20010322	PCR1		Alle monsters van 1	Hep 2 = C129			P01.20	Laesie kop 3247 OM		
1	20010323	P21	VN2	Blaar							
1	20010323	P21	VN2	Hep 1-2 pool Hep 3-4 pool			Geen ELISA P21				
2	20010323	P21	VN2	Schraapsel xx Laesie kop 3247			Geen ELISA P21				
2	20010323	PCR 2		Hep 2							
2	20010325	P23	VN1 overlay	Laesie kop 3247 OM							
1	20010326	PCR 3		Hep 1-4	Hep 1 = C81						Watercontrole * C81
1	20010326	P24	VN1 (herpaling)	Hep 1-4			20010327		Hep 1-4		
2	20010327	PCR 4		Hep 2							
2	20010326	Dienk		Mengeling van monsters	Laesies 28/03		20010326	P01.29	Laesies	2,4	2,0
1	20010327	PCR 5		Hep 1/Hep 2	C135/ C135/						
1	20010327	P30	VN1/LN1 overlay	Hep 1		24 uur 48 uur	20010328	P01.29 P01.31	Hep 1 Hep 1	0,34 2,3	0,1 1,2
1	20010327		VN2 overlay	Hep 2-4 pool Hep 1		24 uur	Geen ELISA P30 VR2 WAAROM?				Rapport aan ministerie
1	20010327	P31	LN1	Hep 2-4 pool							
1	20010327	P31	VN2/LN1	Hep 2-4 Schraapsel xx			20010328	P01.31	Hep 1 Hep 2-4	0,8	0,2
2	20010327	P31	LN1	Laesie kop 3247							
2	20010328	P34	VN2/LN1 overlay	Laesie kop 3247 OM			20010328	P01.31	Laesie kop 3247 OM	1,8	1,2
2	20010328		LN1 overlay	Schraapsel xx Laesie kop 3247 Laesie kop 3247 OM							Rapport aan ministerie 20010401
3	20010328	P33	LN1 overlay	13 Heps			Geen ELISA P34 LN1 WAAROM?				
4	20010328	P37	LN2 overlay	15 sera/16 Heps/Blas			20010330	P01.33	15 Heps		
1	20010329	P37	LN2 overlay	Hep 1			20010401	P01.36	Hep 1		Rapport 20010410 conclusie alle neg
1	20010329	P37	VN2/LN2	Hep 2-4 pool Schraapsel xx							
2	20010329	P37	LN2	Laesie kop 3247	-						
2	20010330	P40	VN2/LN2	Laesie kop 3247 OM	-		20010401	P01.36	Laesie kop 3247 OM		
2	20010330		LN2	Schraapsel xx Laesie kop 3247			20010401	P01.36	Laesie kop 3247 OM	2,1	1,1

3	20010330	P40	LN2	15 Heaps	Gain ELISA		
1	Submissie 01.26		3	Submissie 01.50	epidat passaport in vakvoersierstellen	VM1	
2	Submissie 01.35		4	Submissie 01.57	cerata postata in zandmetrallen	LN1	

[Deze pagina: voortzetting tabel 3]

Tabel 4. overzicht van de gevolgde procedures en behaalde resultaten wat betreft de tijdlijn tot en met 28 maart, die relevant zijn voor de aan het comité gestelde vraag.

Submissie	Datum	Protocol	Cellen	VI Monster	Resultaat	Stadium	ELISA Batum	Protocol	Monster	Resultaat	Opmerkingen
1	20010321	P14	VN1	Blaar	Bact		20010323		vesticulair		
1	20010322	P19	VN2	Hep 1-3 Hep 4 Filtraat Ves Filtraat Hep 4 Filtraat Ves Filtraat Hep 4 Schraapsel xx Laesje kop 3247	Bact Bact Bact Bact Bact Bact Bact		20010323				VN1: 4 sera Neg Geen ELISA P14 behalve Blaar
2	20010322	P18	VN1		Bact						
2	20010322	P21	VN2		Bact		Geen ELISA P18 20010322	P01.20	Laesje kop 3247 OM		4 sera, 4 heps, niet getest
1	20010323	P21	VN2	Blaar	-		Geen ELISA P21				
1	20010323	P21	VN2	Hep 1-2 pool Hep 3-4 pool Schraapsel xx	- - -						
2	20010323	P21	VN2	Schraapsel xx	-		Geen ELISA P21				
2	20010325	P23	PNI overlay	Laesje kop 3247	-						
1	20010325	P24	VN1	Laesje kop 3247 OM	-						
1	20010327	P30	VN1 N1 overlay	Hep 1 Hep 2-4 pool	++ +	24 uur	20010327 20010328	P01.29	Hep 1-4 Hep 1	0.34 0.1	Rapport aan ministerie
1			VN2 overlay	Hep 1	-						
1	20010327	P31	LNI	Hep 2-4 pool Hep 1	- -	24 uur	Geen ELISA P30 VN2				
1			LNI	Hep 2-4	-						
2	20010327	P31	VN2 LN1	Schraapsel xx Laesje kop 3247	- -						
2			LNI	Laesje kop 3247 OM	-	24 uur					
1	Submissie 01_28		VN1	eerste passagie in varkensniervellen	-						
2	Submissie 01_35		LNI	eerste passagie in lammericellen	-						

Rapport afgerond op 23 augustus 2011 met herzieningen van de tabellen op 2 september 2011.

Nigel Ferris
Institute for Animal Health
Ash Road
Pirbright, Surrey
GU24 0NF
Verenigd Koninkrijk

[handtekening]

Kris De Clercq
Centrum voor Onderzoek in Diergeneeskunde en Agrochemie
Groeselenberg 99
1180 Ukkel
België