

UOVS-SASOL-BIBLIOTEK 0226523



11102738290122000019

DESE KOPIE VAN 'N PLAAK MAG ONDER  
HET ONS BONDIGEDE UIT DIE  
BIBLIOTEK VERLEEN WORD NIE

'N ONDERSOEK VAN SEKERE ANTIGENIESE  
EIENSKAPPE VAN BLOUTONGVIRUS

deur

NICOLAAS TJAART VAN DER WALT

Voorgelê ter vervulling van 'n deel  
van die vereistes vir die graad M.Sc. Agric.  
in die fakulteit van Landbou  
Universiteit van die O.V.S.  
Bloemfontein

1976

Universiteitsbiblioteek - Vrystaat  
21-06-1977  
KLAS No. I 636.089692 Wal  
No. 226523  
BIBLIOTEK

DIENSTEEMPLAAR MAG ONDER  
GEEN OMSTANDIGHEDEN UIT DIE  
BIBLIOTEK VERWYDER WORD NIE

## INHOUD

Bladsy

### HOOFSTUK I – INLEIDING EN DOELSTELLING

1.1	Inleiding	1
1.2	Doelstelling	3

### HOOFSTUK II – EKSPERIMENTELE PROSEDURES

2.1	Materiaal	5
2.1.1	Chemikalieë	5
2.1.2	Medium	5
2.1.3	Buffer	5
2.1.4	Selstamme	5
2.1.5	Virusstamme	5
2.1.6	Proefdiere	5
2.1.7	Diëtiel Amino Eitel sellulose	6
2.1.8	Antiserum	6
2.1.9	Reagense vir sellulose-asetaat-membraanelektroforese	6
2.1.10	Neutraal-rooi-oplossing	6
2.1.11	Geaktiveerde Tripsien-Verseen-oplossing	6
2.2	Metodes	6
2.2.1	Selkweking	6
2.2.2	Viruskweking	7
2.2.3	Virussuiwering	7
2.2.4	Virustitrasie	9
2.2.5	Stabiliteittoetse	9
2.2.6	Neutralisasietoetse en bepaling van antiserum titers	9
2.2.7	Suiwering van immunoglobuliene	10
2.2.7.1	Presipitering van gammaglobuliene met behulp van $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	10
2.2.7.2	Fraksionering van die IgG fraksie deur kolomchromatografie	10
2.2.7.3	Die bepaling van die suiwerheid van die IgG fraksie	10
2.2.8	Immuuelektromikroskopie	11
2.2.9	Sukrose digtheidsgradiënt sentrifugering vir skeiding van IgM en IgG.	11
2.2.10	Immunodiffusietoetse	12

### HOOFSTUK III – DIE STABILITEIT VAN BLOUTONGVIRUS

3.1	Inleiding	13
3.2	Literatuuroorsig	14
3.3	Proefuitleg	16
3.3.1	Termostabiliteit	16
3.3.2	pH Stabiliteit	16
3.3.3	Stabiliteit in verskillende soutkonsentrasies	16
3.4	Resultate	17
3.4.1	Termostabiliteit	17
3.4.2	pH Stabiliteit	17
3.4.3	Stabiliteit in verskillende soutkonsentrasies	17
3.5	Bespreking	17

	Bladsy
<b>HOOFSTUK IV – DIE NEUTRALISASIE VAN BLOUTONGVIRUS</b>	
4.1	Inleiding 24
4.2	Literatuuroorsig 27
4.3	Proefuitleg 27
4.3.1	Die effek van pH op die neutralisasie reaksie 28
4.3.2	Die effek van verskillende soutkonsentrasies op die neutralisasie reaksie 28
4.3.3	Die effek van verskillende temperature op die neutralisasie reaksie en die kinetika van die reaksie 28
4.4	Resultate 28
4.4.1	Die effek van pH op die neutralisasie reaksie 28
4.4.2	Die effek van verskillende soutkonsentrasies op die neutralisasie reaksie 28
4.4.3	Die effek van verskillende temperature op die neutralisasie reaksie en die kinetika van die reaksie 28
4.5	Bespreking 32
<b>HOOFSTUK V – DIE IMMUNREAKSIE TEENoor BLOUTONGVIRUS</b>	
5.1	Inleiding 33
5.2	Literatuuroorsig 36
5.3	Proefuitleg 37
5.3.1	Die effek op die immuunreaksie van verskillende wyses van toediening van die antigeen 37
5.3.2	Genetiese verskille tussen konyne 38
5.3.3	Verskille tussen spesies 38
5.3.4	Die rol van IgM en IgG in die immuunreaksie teen BTV 39
5.3.5	Die gebruik van immuonelektromikroskopie om teenliggaamaktiwiteit teen BTV aan te toon 39
5.3.5.1	Die isolasie van IgG 40
5.3.5.2	Die bepaling van die suiwerheid van geïsoleerde IgG 40
5.3.5.3	Die gebruik van immuonelektromikroskopie om teenliggaamaktiwiteit aan te toon 40
5.4	Resultate 40
5.4.1	Die effek op die immuunreaksie van verskillende wyses van toediening van die antigeen 40
5.4.2	Genetiese verskille tussen konyne 40
5.4.3	Verskille tussen spesies 46
5.4.4	Die rol van IgM en IgG in die immuunreaksie teen BTV 46
5.4.5	Die gebruik van immuonelektronmikroskopie om teenliggaamaktiwiteit teen BTV aan te toon 46
5.4.5.1	Die isolasie van IgG 46
5.4.5.2	Die bepaling van die suiwerheid van geïsoleerde IgG 46
5.4.5.3	Die gebruik van imuonelektronmikroskopie om teenliggaamaktiwiteit aan te toon 51
5.5	Bespreking 60
<b>HOOFSTUK VI – OPSOMMING EN SLOTSOM</b>	
6.1	Opsomming 62
6.2	Slotsom 63
<b>BEDANKINGS</b> 64	
<b>LITERATUURVERWYSINGS</b> 65	

## HOOFSTUK I

### INLEIDING EN DOELSTELLING

#### 1.1 Inleiding

Wanneer beter beheer oor 'n virussiekte beoog word, is dit nodig om die verskillende beheermetodes met hul moontlikhede en beperkings goed te oorweeg.

Die oudste metode is immunologiese beheer wat in 1798 ingelui is toe Edward Jenner mense teen pokke beskerm het deur inenting van koeipokvirus. Immunisering is vandag nog die belangrikste metode in die beheer van virussiektes. Die gebruik van entstowwe gaan egter ook met heelwat probleme gepaard. 'n Probleem wat alle entstowwe raak is die merkbare verskil in die reaksie van individue teenoor 'n antigeen as gevolg van hul besondere genetiese samestelling. Dooie entstowwe, wat soms gebruik word weens gebrek aan beter alternatiewe, het 'n baie swak immuniserende potensiaal in vergelyking met lewende entstowwe. Dit kan waarskynlik toegeskryf word aan die feit dat hul kort in die sisteem van die dier bly, aangesien die virus nie vermenigvuldig nie.

Die metodes om 'n lewende verswakte entstof te produseer is meestal empiries en word dikwels nie deur die nodige basiese kennis ondersteun nie. Min is bv. bekend oor die eienskappe wat virulensie aan 'n virus verleen en die veranderinge wat nodig is om verswakking te weeg te bring. Lewende entstowwe, aan die ander kant, hou die gevaar van infeksie in en moet dus baie noukeurig gekontroleer word vir veiligheid en kwaliteit.

Die grootste nadeel van meeste entstowwe is hul spesifisiteit. Hierdie probleem kom veral na vore in gevalle waar meer as een serotipe van 'n virus voorkom. Dit geld ook in die geval van Bloutongvirus (BTV) waarvan 'n aantal serotipes dikwels gelyktydig in 'n ensoötiese gebied van Afrika aktief kan wees. Polivalente immunisering word dan vereis wat baie bemoelijk word deur die onderlinge inmenging tussen serotipes, verskille in die immuniserende potensiaal van die verskillende serotipes en die verskille in die groeitempo's van die verswakte serotipes (Howell en Verwoerd, 1971).

Ten einde die probleme wat verbonde is aan huidige entstowwe te verlig, maar die voordele aan die metode van immunologiese beheer nog te benut, is nuwe

moontlikhede ondersoek. Subvirale partikels van verskeie virusse is geproduseer met die oog om te bepaal in watter mate hulle beskerming kan verleen (Mautner en Willcox 1974, Rubin en Tint, 1975, Goldblum *et al.* 1972, Norrby *et al.* 1972 en Neurath en Benjamin, 1971). Verder kan die antigene wat belangrik is vir beskerming as suiwer proteïene geïsoleer word (Arnon, 1972). Indien aanduidings gevind word dat die produksie van suiwer proteïene as entstowwe 'n praktiese moontlikheid is, kan gepoog word om hul in molekulêre terme te definieer. Daarna kan oorweeg word om hul sinteties te berei (Jenner, 1972a).

Subvirale partikels, gesuiwerde proteïene en sintetiese antigene sou die voordele besit dat inenting daarmee sensitisering deur bykomstige proteïene uit sou skakel, asook die inokulasie van nukleïensuur. Laasgenoemde hoef nie infektief te wees nie, maar kan onwenslike koderingspotensiaal besit. Verder sal groter immuniseringsdosisse gebruik kan word en die entstowwe sal volgens biologiese en chemiese maatstawwe gestandaardiseer kan word. 'n Stam met hoë groei potensiaal sal dan nodig wees om die nodige hoeveelheid materiaal te voorsien (Perreira, 1972).

Die gebruik van temperatuursensitiewe (TS) mutante is ook 'n belangrike alternatief. Wanneer hulle geselekteer word vir hul onvermoë om by liggaamstemperatuur te groei, is hul reeds verswak. Hulle is dus baie aantreklik vir entstofbereiding. Vir entstowwe is dit egter baie belangrik dat hulle stabiele mutante moet wees soos verkry kan word deur veelvuldige of deleisie mutasies eerder as mutasies met substitusie van enkele basisse. Temperatuursensitiewe mutante kan veral belangrik wees by infeksies waar die temperatuurgradiënt wat in die liggaam bestaan, benut kan word bv. in respiratoriese infeksies. Die moontlikhede is ondersoek in die gevalle van bv. Semlike-Forest-Virus, Respiratoriese sinsitiumvirus en Influenzavirus en dis getoon dat dit heelwat belofte inhou (Jenner, 1972b) deurdat 'n mate van beskerming deur hul TS mutante verkry is (Beare, 1975).

Ander mutante wat op grond van hul biochemiese, fisiologiese of morfologiese eienskappe onderskei word, kan ook van nut wees soos in die geval van Oostelike enkefalitisvirus (Brown en Officer, 1975).

Interferon as profilaktiese middel besit die belangrike voordeel dat dit spesie-spesifiek is maar nie-spesifiek is vir die virusse van 'n bepaalde gasheer spesie. Op die

oomblik is bereiding egter 'n probleem. Die enigste hoop om dit as profilaktiese of terapeutiese middel van nut te laat wees is deur dit te induseer met poli-inosien-sitosien (Hilleman, 1972). Produksie kan moontlik verder gestimuleer word deur bestraling (Mozes *et al.*, 1974).

Chemoterapie is 'n belangrike beheer metode by bakteriese siektes, maar by virussiektes kon tot dusver nog nie veel sukses daarmee bereik word nie (Hilleman, 1972):

Laastens bestaan daar ook die moontlikheid om insekkoorgedraagde virusse te beheer deur die vektor te beheer. Daar is op gewys dat dit waarskynlik beter sou wees om die vektor se kapasiteit te beheer eerder as om die spesie self te beheer. Die teling van 'n weerstandige *Cullicoides* spesies is bv. ondersoek met die oog om die oordrag van BTV te beheer (Jones en Foster, 1974).

Die immunologiese benadering ontvang steeds die meeste aandag in ondersoeke wat beter beheer van virussiektes beoog. Die antigeniese eienskappe van die virus en die reaksie teen hierdie antigene bepaal die vlak van weerstand wat in die dier opgewek word en dus die doeltreffendheid van immunologiese beheer. Hierdie twee aspekte vorm dus die kern van hierdie studie en sal in die literatuuroorsig verder bespreek word.

## 1.2 Doelstelling en motivering

Die doel van hierdie studie was om meer kennis en perspektief op te doen van twee aspekte wat van primêre belang is in die opwekking van immuniteit teen BTV. Dit moes as grondslag kon dien vir 'n meer uitgebreide studie later. Eerstens was daar 'n studie van BTV as antigeen en tweedens van die reaksie wat dit in diere uitlok.

Motivering om juis hierdie twee aspekte te ondersoek is gegrond daarop dat dit al die faktore insluit wat die doeltreffendheid van 'n entstof bepaal en dus van aansienlike praktiese nut sou kon wees.

'n Studie van die antigeniese eienskappe van BTV het as uiteindelijke mikpunt die molekulêre definiering van die antigene wat die weerstand teen infeksie uitlok. Om dit te bereik moet die betrokke antigene eers geïsoleer word en daarna kan

die moontlikheid ondersoek word om hul te sintetiseer. 'n Sintetiese molekule kan verder gemodifiseer word om al die eienskappe te besit wat nodig is om 'n bevredigende immuniteit op te wek.

'n Beter kennis van die immuunreaksie teen BTV is om verskeie redes van belang in die ontwikkeling van 'n meer doeltreffende entstof. In die eerste plek is daar verskillende komponente wat 'n rol speel in die immuniteit teen 'n virus (Allison, 1972). Indien vasgestel kan word watter komponente van besondere belang is in immuniteit teen BTV-infeksies, kan hierdie komponente geaktiveer en versterk word, terwyl reaksies wat die opbou van immuniteit belemmer, onderdruk kan word.

Om ekonomiese redes was dit in hierdie studie nodig om die immuunreaksie in konyne te bestudeer en om dieselfde rede sal die gebruik van proefdiere in die toekoms nodig wees. Vorige studies oor die immuunreaksie is in skape gedoen. 'n Vergelyking van die reaksie in skape en ander proefdiere is baie belangrik sodat vasgestel kan word in watter mate dit wat vir die proefdier geld op die skaap van toepassing gemaak kan word.

Laastens is 'n goeie kennis van die immuunreaksie teen natuurlike BTV nodig, sodat pogings om daarop te verbeter, daarmee vergelyk kan word. Om die doeltreffendheid van subvirale partikels of suiwer virusproteïene as immuniserende antigene te bepaal moet dit met intakte virus vergelyk word.

## HOOFSTUK II

### EKSPERIMENTELE PROSEDURES

#### 2.1 Materiaal

##### 2.1.1 Chemikalieë

Aminosure en soute is verkry van Merck Chemicals (E. Merck, Darmstad, Duitsland) en agarose van Miles Laboratories (Posbus 141, Goodwood, Kaapstad, 7460), tensy anders aangedui is.

##### 2.1.2 Medium

Gemodifiseerde Eagle se medium is berei volgens die resep van McPherson en Stoker (1962). Waar nodig is 5% beesserum bygevoeg.

##### 2.1.3 Buffer

Tris-HCl-buffer is gebruik teen die verlangde konsentrasie en ingestel op die vereisde pH (Vogel, 1953).

##### 2.1.4 Selstamme

Baba Hamster Nier (BHK-21) selle is gebruik vir viruskweking en selle van die L-lyn van muisfibroblaste (LF selle) is gebruik vir virustitrasie. Beide stamme is verkry van die American Type Culture Collection (12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland, V.S.A. 20852).

##### 2.1.5 Virusstamme

Geattenueerde tipe 10 virus (10A), is verkry van die afdeling virusentstofproduksie, Onderstepoort en geattenueerde tipe 4 (4A) van Dr. R.A. Oellerman, Onderstepoort. (Navorsingsinstituut vir die Veeartsenykunde, Onderstepoort 0110.)

##### 2.1.6 Proefdiere

Vyf maande oue wyfie konyne van die Onderstepoort-geteelde stamme is deurgaans gebruik. (Navorsingsinstituut vir Veeartsenykunde, Onderstepoort 0110.)

### 2.1.7 Diëtiel Amino Etiel (DEAE-) Sellulose

Dit is verkry van Sigma (3500 de Kalbstraat, St. Louis, Missouri, V.S.A.). Dit het 'n kapasiteit van 0,89 m ekw gehad en die maaswydte ("mesh") : medium.

### 2.1.8 Antiserum

Die reagense is verkry van Cappel Laboratories, (Downingtown PA 19335, V.S.A.). In albei gevalle is bok IgG gebruik. Die anti-IgM was  $\mu$  kettingspesifiek Lot 7751 en die anti-IgG  $\gamma$  ketting spesifiek Lot 9051.

### 2.1.9 Reagense vir sellulose-asetaat-membraanelektroforese

Hierdie reagense is amal van Beckman Instruments (Eiendoms) Beperk (Posbus 8468, Johannesburg) verkry.

### 2.1.10 Neutraalrooi-oplossing

Daar is 'n 1% oplossing van neutraalrooi in etiel\_alkohol gemaak. Dis geskud en 'n paar uur laat staan. Daarna is dit filtreer om enige onopgeloste materiaal te verwyder. Hiervan is 60 ml by 2l fosfaat-buffer gevoeg (0,2M, pH6,5).

### 2.1.11 Geaktiveerde Tripsien-Verseen-oplossing

Dit is soos volg opgemaak: 80gNaCl, 4gKCl, 10g Dekstrose, 5,8gNaHCO<sub>3</sub>, 5,0g Tripsien, 2,0g E.D.T.A., 2,0g penisillien, 2,0g streptomisien, en 10ml van 'n fenol-rooi-oplossing (0,2%). Dit is opgemaak tot 1 000ml en 1:10 verdun vir gebruik.

## 2.2 Metodes

### 2.2.1 Selkweking

'n Roux fles waarop 'n digte laag BHK selle gegroei het is geneem en die medium afgegooi. Ongeveer 60ml geaktiveerde tripsien-verseen-oplossing (ATV) is daarop gegooi en ongeveer een minuut op die selle laat lê waarna dit afgegooi is. Wanneer tekens gesien kan word dat die selle van die glas begin los kom is 'n gerieflike hoeveelheid medium geneem en op die selle gespuit. Om die selagregate op te breek is die suspensie dan ongeveer agt keer op en af gespuit deur 'n 20ml spuit. Die suspensie is dan verdeel tussen 8-12 Roux flesse of 500ml McCartney bottels waarin vooraf ongeveer 80ml van Eagle se medium met 5% beesserum gevoeg is. Die bottels is by 37C geïnkubeer totdat die selle 'n digte monolaag gevorm het (gewoonlik 3-4 dae).

### 2.2.2 Viruskweking

Die metode van Verwoerd (1969) is gebruik. Bloutongvirus tipe 10A en 4A is gebruik. Baba hamster nier (BHK) selle is as 'n digte monolaag in Roux flesse of 500ml McCartney bottels gekweek. Die medium is dan afgegooi en die selle is gespoel met Eagles medium sonder serum. 'n Geskikte hoeveelheid van Eagle se medium sonder serum is dan bygevoeg om die selle te onderhou tydens viruskweking. Die selle is geënt deur virus in die fles te spuit teen 'n konsentrasie wat ooreenstem met 'n veelvuldigheid van 15 plaket-vormende eenhede virus per sel. Daarna is dit vir 48 uur by 37C geïnkubeer waarna dit geoes is deur die sellaag van die wand van die bottel af te skud.

### 2.2.3 Virussuiwering

Die metode beskryf deur Verwoerd *et al.* (1970) is gedeeltelik gevolg. Alle werk is by 4C gedoen. Die selle waaraan die virus gehêg is, is nadat dit geoes is, afgeswaai teen 1 400g vir 1 uur.

Die bostand is weggegooi maar die proppie is gesuspendeer in 2 mM Tris-buffer (10 ml/15 500ml McCartney-bottels). Hierdie suspensie is dan afgeswaai teen 38 000 g vir 10 minute in 'n Spinco 50 Ti rotor. Die bovloeistof is weggegooi en die proppie by 4C gestoor totdat dit benodig is. Die volgende stappe is dan gevolg:

#### (1) FREON I

- 1) 'n Freon ekstraksie (sien punt No. 9) is op die gestoorde proppie gedoen. Dit het gelewer bovloeistof I en proppie I.
- 2) Proppie I is gewas met soveel 2 mM Tris-buffer as wat in die eerste ekstraksie verloor is deur dit vir 60 sekondes te homogeniseer. Die wasvloeistof is by bovloeistof I gevoeg – en proppie I weggegooi.

#### (2) FREON II

'n Freon ekstraksie is op bovloeistof I gedoen en dit het bovloeistof II en proppie II gelewer – proppie II is gehou.

#### (3) FREON III

'n Verdere freon ekstraksie is dan op bovloeistof II gedoen en dit het proppie III en bovloeistof III gelewer – proppie III is gehou.

## (4) Was van proppie II en III

Proppie II en III is bymekaar gevoeg en daarna gewas deur 'n volume tris-buffer (2mM) wat gelykstaan in volume aan die verskil in volume van bovloeistof III en die volume van die suspensie waarmee die suiwering begin is by te voeg en te homogeniseer vir 60 sekondes. Die suspensie is weer afgeswaai. Die bovloeistof is by bovloeistof III gevoeg en proppies II en III weggegooi.

## (5) FREON IV

'n Ekstraksie is nou op bovloeistof III gedoen en die proppie is weggegooi, maar bovloeistof IV is gehou.

## (6) Eter-ekstraksie

By bovloeistof IV is 'n 1/25 volume 5% albumien (in 2mM Tris-buffer), 1/10 volume 10% Tween 80 (in 2mM Tris-buffer) en 'n gelyke volume hergedistilleerde eter gevoeg. Die mengsel is goed geskud vir 60 sekondes en daarna uitgeswaai teen 1 400g vir 10 minute.

## (7) Die soutkonsentrasie van die waterige fase is tot 50 mM

aangepas deur 1/80 volume van 'n 4M NaCl oplossing by te voeg. Dit is dan versigtig bo-op 'n 1/4 volume sukrose kussing gespuit en vir 90 minute uitgeswaai teen 100,000 g in 'n Spinco 60 Ti rotor. Die proppie wat nou verkry is, is in 'n geskikte volume 2mM Tris-buffer gesuspendeer en as antigeen gebruik. Vir immuunelektronmikroskopie is die virus verder gesuiwer soos beskryf in (8).

## (8) Die proppie is gesuspendeer in ongeveer 6 ml 2mM Tris-buffer. Daarna is 3 ml per buis bo-op 'n 4-40% sukrose gradient gespuit (sukrose in 2mM Tris-buffer, pH 8,8). Dit is gesentrifugeer teen 78 000 g vir 50 min in 'n SW 27 rotor. Die virus bande is dan op die buis gemerk en afgesuig met 'n spuit. Hierdie virus is vir immuunelektronmikroskopie gebruik.

## (9) Freon ekstraksie

Die virus proppie is in 2mM Tris-buffer gesuspendeer (150 ml vir 8-240 500ml McCartney bottels) en een tiende 1/10 volume 5%

Sephadex G-200 (superfine) (verkry van Pharmacia, Fine Chemicals AB, Uppsala, Sweden) en 1/3 volume freon is bygevoeg. Die mensel is gehomogeniseer vir 60 sekondes en uitgeswaai teen 1 400 g vir 10 minute.

#### 2.2.4 Virustitrasie

Die titer van ongesuiwerde en gesuiwerde virus is soos volg bepaal. Van die suiwer virus voorraad is  $10^6$ ,  $2 \times 10^6$ ,  $10^7$ ,  $2 \times 10^7$ ,  $10^8$ ,  $2 \times 10^8$ ,  $10^9$ ,  $10^{10}$  en  $10^{11}$  verdunnings gemaak. Van die ongesuiwerde virus is  $10^5$ ,  $2 \times 10^5$ ,  $10^6$  en  $2 \times 10^6$  verdunnings gemaak. Verdunnings is in 2mM Tris-buffer gemaak. Elke verdunning is in duplikaat uitgeplaat op monolae van LF selle. 'n Laag voedings agar sonder serum is bo-oor gegiet. Na 'n inkubasie periode van 4 dae by 37C in 'n vogbeheerde inkubator wat met CO<sub>2</sub> voorsien is, is die bakkies gekleur met neutraalrooi-kleurstof vir 2-3 uur. Die kleurstof is dan afgegooi en die helder plakette getel. Die titer van die virus is uitgedruk as aantal viruspartikels per ml.

#### 2.2.5 Stabiliteittoetse

Geoesde virus (kyk 2.2.1) is gebruik vir die toetse. Die titer van hierdie suspensie was ongeveer  $1 \times 10^8$ /ml. Dit is in Tris-buffer met die verlangde soutkonsentrasie en pH (kyk hoofstuk III) verdun tot 'n uiteindelijke verdunning wat ongeveer 100 plaketvormende eenhede (PVE) per 0,1 ml sout bevat. Daarna is dit vir 'n spesifieke tyd en temperatuur geïnkubeer (kyk hoofstuk III) waarna 0,1 ml op 'n monolaag LF-selle wat gekweek is op 'n petribakkie (60 mm) uitgeplaat is. Dit is later bedek met 'n voedingsagar soos beskryf deur Howell *et al.* (1967). As kontrole is virus gehou onder toestande waar dit volgens Verwoerd (1969) stabiel sou wees, nl. in 2mM Tris-buffer, pH 9,0 by 4C.

#### 2.2.6 Neutralisasie-toetse en bepaling van antiserum titers

'n Reeks tweevoudige verdunnings van die serum is in fisiologiese soutoplossing (0,154M) gemaak. By elke serumverdunning is 'n konstante volume en konsentrasie virus gevoeg. Die konsentrasie van die virus was dan sodanig dat dit PVE/0,1 ml bevat het indien geen neutralisasie plaasgevind het nie. Die virus-antiserum suspensie is dan vir die vereiste tyd en temperatuur (kyk hoofstuk IV) geïnkubeer en daarna is 0,1 ml uitgeplaat op 'n monolaag LF-selle in 'n 60 mm Petribakkie en geïnkubeer (kyk 2.2.4). Serum en virus kontroles is by elke eksperiment ingesluit. Antiserum titers word deurgaans aangegee as daardie verdunning waarby 50% neutralisasie plaasvind.

## 2.2.7 Suiwering van immunoglobuliene

### 2.2.7.1 Presipitering van gammaglobuliene m.b.v. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

Die metode van Hebert *et al.* (1973) is gevolg met 'n effense wysiging. Honderd milliliter serum is versigtig geroer terwyl 50 ml ammoniumsulfaat bygevoeg en goed gemeng is. Die reaksie mengsel is vir 1 uur by kamertemperatuur gehou en daarna gesentrifugeer om die gepresipiteerde proteïene te pak. Die bovloeistof is afgegooi en gehou vir latere suiwerheidsbepalings. Die presipitaat is hergesuspendeer en opgelos in gedeïoniseerde water tot 'n volume gelyk aan die oorspronklike volume serum. Die presipitasie is 3x herhaal. Die finale fraksie is gedialiseer teen 0,01M fosfaat buffer pH 8,0 totdat geen sulfaat meer in die dialisaat waargeneem kon word nie. Die suspensie is gekonsentreer tot 'n konsentrasie wat 64 mg/ml proteïene bevat het.

### 2.2.7.2 Fraksionering van die IgG fraksie deur kolomchromatografie

Vorbereiding, pak en laai van die kolom is gedoen soos beskryf in Williams en Chase (1967a). Tweehonderd ses en vyftig mg  $\gamma$  globuliene in 'n 6 ml suspensie is op 'n 1,5x30 cm glas kolom gelaai. Eluering van die kolom is gedoen volgens die metode van Williams and Chase (1967b).

### 2.2.7.3 Die bepaling van die suiwerheid van die IgG fraksie

#### (a) Met behulp van poliakrielamiedjielektroforese

Die metode van Summers *et al.* (1965) is gebruik met 'n paar wysiginge.

'n Shandon pypies-jel elektroforese apparaat is gebruik. Dit hou 8 pypies 0,5 cm x 7,0 cm. Die jelkolom het uit 2 konsentrasies bestaan. Onder was ongeveer 1,3ml van 'n 8% poliakrielamied konsentrasie wat as skeidingsjel gedien het met bo-op 0,1 ml gel met 3% konsentrasie wat gedien het om die monster te konsentreer. Verder het albei bestaan uit 0,5% etileendiakrilaat as kruisbindingvormer, 0,2% N, N, N', N'-tetrametileendiamien (Temed), 0,2% natrium dodesiel sulfaat (SDS), 8M ureum, 0,02M EDTA (etileendiamientetraasynsuur), 0,01M fosfaat-buffer (pH 7,2) en 0,08% ammoniumpersulfaat as katalisator. Ureum is gedeïoniseer deur 'n harskolom (Elgalite 219 Standard Resine 208) net voor gebruik. Akrielamied is omgekristalliseer volgens die metode soos beskryf deur Loenning (1967).

Die jelle is vir 10 minute gepre-elektroforetiseer. Die proteïenmonsters is met 40% sukrose vermeng in 'n 1:1 verhouding en dan afhangend van die proteïenkonsentrasie van die monster is 4–7  $\mu$ l van die mengsel op 'n pypie gesit. Elektroforese is uitgevoer teen 5m Amps per jel vir 2 uur (Whipple, 1964).

Die konsentrasie van die buffer in die bakke was 0,01M fosfaat met 0,2% SDS en 0,02M EDTA by pH 7,2.

Jelle is gefikseer vir 5 min in 40% Trichloorasynsuur (TCA), gewas in water en dan vir 15 min gekleur in 0,25% Coomassie Brilliant Blue G-250 in 'n oplossing van ysasyn, Metanol en water in 'n 1:5:4 verhouding. Ontkleuring is gedoen in 5% asynsuur.

#### (b) Sellulose-asetaat-membraanelektroforese

Die metode is gedoen met die Beckman Microzone apparaat en prosedure volgens die meegaande handleiding (Beckman Instruments (Eiendoms) Beperk, Posbus 8468, Johannesburg.)

#### 2.2.8 Immunelektronmikroskopie

As uitgangspunt is die metode van Almeida en Waterson (1969) geneem, maar die toestande wat die beste resultaat gee in die BTV sisteem is empiries bepaal. Die serum is geïnaktiveer deur verhitting by 56C vir 30 minute om moontlike effekte van komplement uit te skakel en daarna uitgeswaai teen 140 000g in 'n SW 50 rotor. Van die virussuspensie met 'n titer van  $5 \times 10^9$  is 0,1 ml gemeng met 1,8 ml 2mM Tris-buffer, pH 8,8 en 0,1 ml van die antiserum (titer 1/32) of IgG fraksie (titer 1/64). Die reaksie mengsel is vir 15 minute laat staan by kamertemperatuur en daarna gesentrifugeer teen 8 500g vir 15 minute by 4C. Die bovloeistof is afgetrek met behulp van 'n spuit en die proppie opgeneem in 0,1 ml 2mM Tris-buffer. Daarna is dit gemeng met 'n gelyke volume 3% fosforwolframsuur by pH 6,0. 'n Druppel van hierdie mengsel is daarna geplaas op 'n 200-maaswydte siffie, die oormaat vloeistof afgesuig met filtreerpapier en die siffie onmiddellik in die elektronmikroskoop geplaas.

#### 2.2.9 Sukrosedigtheidsgradient-sentrifugering vir skeiding van IgM en IgG

Die metode van Williams en Chase (1967) is effens gewysig. 'n Aaneenlopende gradient is met 'n Beckman Gradient Former gemaak deur 40% sukrose as hoë kon-

sentrasie geleidelik te meng met 4% sukrose. Die sukrose is opgemaak in Sörensen se buffer pH 7,3 (Vogel, 1953). Na vorming van die gradient in 5 ml buise, is 0,5 ml koue verdunde serum ('n 1:1 verdunning in 'n fisiologiese soutoplossing) bo-op gesit. Die monster grens is effens verswak deur dit versigtig te roer met die punt van die pipet. Sentrifugering is so gou as moontlik begin teen 38 000 o.p.m. vir 18 uur by 4C (in 'n Beckman model L-2 of L2-50 sentrifuge in 'n SW 50 rotor). Fraksies is druppelsgewyse van onder uit die buis opgevang. Eers is 3-0,5 ml fraksies opgevang, dan 'n 1 ml fraksie en dan die res. Die uitvloei uit die buis is beheer deur 'n prop en 'n pypie bo in die buis te plaas.

#### 2.2.10 Immunodiffusietoetse

Gradientfraksies is kwalitatief getoets teen anti-IgG en anti-IgM reagentie deur immunodiffusie. Die toetse is gedoen deur 2,5 ml van 'n 0,8% agar in Sörensen se buffer (pH 7,3) in 35mm Petri-bakkies te gooi. Natrium-azied (0,01% is bygevoeg om die groei van bakterieë te inkubeer. Die holtes van die patroonplaat was 5 mm van die middelste een af en 2 mm in deursnit. Die bakkies is vir 48 uur by 37C ge-inkubeer, en daaglik ondersoek.

## HOOFSTUK III

### DIE STABILITEIT VAN BLOUTONGVIRUS

#### 3.1 Inleiding

Bloutong is 'n akute insekoorgedraagde siekte van skape. Dit kan klinies herken word aan die inflammasie van die slymvliese van die respiratoriese en spysverteringskanale wat geassosieer is met degeneratiewe veranderinge in die skeletspiere. Die groot mate van uittering en swakheid wat op die akute siekte volg veroorsaak 'n uitgerekte herstelperiode wat weer lei tot ernstige ekonomiese verliese as gevolg van verminderde produktiwiteit (Howell en Verwoerd, 1971). Die ekonomiese belang van die merino in wolproduksie (Howell, 1969) was seker meer as enige iets anders 'n aanspooring om die biofisiese (Verwoerd, 1969), morfologiese (Els en Verwoerd, 1969) genetiese en molekulêre (Huismans, 1970; Huismans en Howell, 1973 en Shiphams, 1973) asook die immunologiese eienskappe (Howell, 1969) van BTV te ondersoek.

Die bg. bevindings het baie daartoe bygedra om 'n beter begrip van die virus te kry. Dit is bv. vasgestel dat die virus 'n deursnit van 54 nm het en dat sy kapsied uit 32 kapsomere bestaan. Die virus besit geen egte omhulsel nie (Els en Verwoerd, 1969), maar twee van sy polipeptiede vorm 'n diffuse proteïen laag om die nukleokapsied (Verwoerd *et al.*, 1972). Die genetiese materiaal bestaan uit dubbeldraad ribonukleïensuur (RNA) wat na isolasie altyd as 10 afsonderlike segmente voorkom (Verwoerd, 1969). Tydens replikasie word 10 boodskapper RNA segmente gemaak (Huismans 1970). Hierdie feit is *in vitro* bevestig (Verwoerd en Huismans, 1972). Indien elke genoomsegment as 'n geen funksioneer, sou 10 ooreenstemmende polipeptiede verwag word. Daar is egter net 7 polipeptiede in die kapsied van die virus gevind (Verwoerd *et al.*, 1972).

Met die oog op suksesvolle beheer van bloutong is die immunologiese eienskappe van die virus van besondere belang. Tot dusver is 16 serotipes aangetoon. (Howell en Verwoerd, 1971). Hierdie onderskeiding is op genoomvlak bevestig met behulp van kruisibridisasie eksperimente en die aanduidings is dat die verskille tussen serotipes relatief groot is (Huismans en Howell, 1973). Aangesien die serologiese determinante van die virus in die proteïenkapsied geleë is, sou verwag kon word

dat die ooreenstemmende polipeptiede van die verskillende serotipes van mekaar sal verskil. Die belangrikste fisies-chemiese kenmerke van 'n polipeptied wat gebruik word vir sy karakterisering is sy molekulêre gewig, aminosuursamestelling en die volgorde van die aminosure. In 'n vergelyking van die BTV kapsied polipeptiede se molekulêre gewigte het De Villiers (1974b) gevind dat die polipeptiede 2 en 6 wat deel uitmaak van die diffuse buitelaag, beduidend tussen die serotipes verskil.

Hierdie resultaat stem ooreen met die verwagting dat hulle as gevolg van hul posisie 'n belangrike rol speel in die bepaling van die serologiese spesifisiteit van die virus. Ander immunologiese aspekte van die virus wat bestudeer is, raak veral die immuniteit teen die virus en die ontwikkeling van 'n geskikte entstof.

Die stabiliteit van die virus onder verskillende fisiese en chemiese toestande is in hierdie studie van belang sodat 'n aanduiding gekry kan word onder watter toestande die neutralisasie reaksie betekenisvol ondersoek kan word. Die stabiliteit is in immunologiese werk belangrik omdat dit die versekering gee dat die antigene wat virusneutraliserende-teenliggaam uitlok behoue bly. Die fisiese stabiliteit van die virus is ook belangrik met die oog op die bereiding van subvirale partikels. Indien die toestande bekend is waarby die virus onstabiel is, kan dit gebruik word om hom op te breek. In feitlik alle werk oor die virus is sy biologiese stabiliteit van belang.

### 3.2 Literatuuroorsig

Die term "stabiliteit" word in hierdie hoofstuk gebruik om die behoud van infektiwiteit aan te dui wat dien as maatstaf van onopgebreekte virus en kan dus as biologiese stabiliteit beskryf word. Dit is in hierdie studie gemeet aan die hoeveelheid plaketvormende eenhede (PVE) wat na 'n sekere tyd teenwoordig is in 'n suspensie in vergelyking met waarmee begin is. Fisiese en chemiese stabiliteit word nie noodwendig geïmpliseer nie. By die interpretasie van die literatuur moet die term "stabiliteit" versigtig beskou word aangesien dit 'n relatiewe begrip is. Dit hang af van die tegnieke waarmee dit bepaal is en die tydsbestek waarvoor dit bepaal is. In die geval van BTV kan die bepaling ook beïnvloed word deur die hoeveelheid proteiene in die suspensie. Verder moet die tipe virus gespesifiseer word, aangesien verskillende serotipes van dieselfde virus kan verskil in stabiliteit bv. in die geval van poliovirus (Davis *et al.*, 1967) en ook in die geval van BTV (De Villiers, 1974a).

Die ondersoek wat reeds na die stabiliteit van die virus gedoen is, sluit hoofsaaklik die in van Owen, 1964, Howell *et al.*, 1967 en Verwoerd, 1969. In al hierdie gevalle is die stabiliteit oor 'n veel langer tydsbestek ondersoek as wat nodig is vir die neutralisasie reaksie. Dit is dus nodig geag om die stabiliteite te bepaal onder toestande wat vir hierdie studie van belang is d.w.s. wat nodig sou wees t.o.v. die neutralisasie reaksie.

### Termostabiliteit

Die termostabiliteit van BTV is deur verskeie werkers bestudeer. Neitz (1948) het die virus "baie termostabiel" genoem omdat daar nog infektiewe virus in serum gevind is, nadat dit vir 25 jaar by kamertemperatuur gestaan het. Andersyds is egter gevind dat laer titers gemeet word in eiers wat by 37C geïnkubeer word teenoor dié wat by temperature effens onder liggaamstemperatuur geïnkubeer word. (Alexander, 1947) Svehag (1963b) wat bepalings op BTV-8 gedoen het, noem die virus opmerklik termostabiel omdat 10% van die infektiwiteit demonstreerbaar is na verhitting by 37C vir 48 uur. Hy toon ook dat daar min verskil in die stabiliteit na 20 uur by 5C en kamertemperatuur is. Nadat 'n plaket-telmetode vir BTV ontwikkel is, is dit ook gebruik om die termostabiliteit van BTV te ondersoek (Howell *et al.*, 1967). Hy bevind dat die virus baie meer stabiel is by 4C as by 37C waar dit relatief onstabiel is.

### pH Stabiliteit

Owen (1964) het twee tipes, nl. I en III ondersoek. Sy *in vitro* studies het getoon dat die virus stabiel is tussen pH 6,2 en pH 7,5 en buite hierdie gebied is daar 'n skerp afname in stabiliteit. Hy het verder gevind dat die punt waarby BTV in vleis geïnaktiveer word, tussen pH 5,4 en pH 6,3 is. Svehag *et al.*, (1966) het die stabiliteit van 'n BTV stam nl. BT-8 ondersoek en vind 'n nou gebied van stabiliteit tussen pH 6,0 en pH 8,0. Verwoerd (1969) het vir die eerste keer gesuiwerde virus gebruik en ook vir die eerste keer die plaket-telmetode om sy bepalings te doen. Hy het 'n optimum stabiliteit by pH 9,0 gevind en heelwat minder stabiliteit by pH 7,0 en pH 8,0.

### Stabiliteit by verskillende soutkonsentrasies

Die enigste vorige werk is gedoen deur Verwoerd (1969). Hy het egter net twee sout konsentrasies ondersoek nl. 2 mM Tris en 2 mM Tris + 1N NaCl en bevind dat die virus meer onstabiel skyn by die hoë molariteit.

## Die stabilisering van BTV

Verskeie werkers het aangetoon dat die virus meer stabiliteit vertoon as daar vreemde proteïene by die oplossing bygevoeg word. (Alexander, 1947, en Neitz 1948). Svehag (1963b) het aangetoon dat die inaktiveringstempo van BTV omgekeerd eweredig is aan die hoeveelheid uitwendige proteïene wat teenwoordig is. Howell *et al.* (1967) het ook aangetoon dat die byvoeging van proteïene soos 1% albumien, serum, peptone of ander proteïenderivate, die stabiliteit van die virus (in die geval tipe-4) in 'n verskeidenheid toestande verhoog. Die stabiliserende vermoë van 0,5% albumien in 'n verskeidenheid behandelings is ook aangetoon deur Verwoerd (1969).

### 3.3 Proefuitleg

#### 3.3.1 Termostabiliteit

Die biologiese stabiliteit van BTV tipe 10A is ondersoek by verskillende temperature nl. 4C, 27C, 32C en 37C, terwyl die soutkonsentrasie op 10mM en die pH by pH 9,0 konstant gehou is. Ongesuiwerde virus is verdun om ongeveer 100 PVE per petri-bakkie te gee is by die betrokke toestand gehou en na verskillende periodes uitgelaat om te sien hoeveel infektiwiteit behou is.

#### 3.3.2 pH stabiliteit

Die biologiese stabiliteit van die virus is by pH 7,0, pH 8,0, pH 9,0, pH 10,0 en pH 11,0 ondersoek, terwyl die temperatuur by 4C en die soutkonsentrasie by 10mM konstant gehou is. Ongesuiwerde virus is verdun om ongeveer 100 PVE per petri-bakkie te gee. Dit is by die betrokke toestand gehou en na verskillende periodes uitgeplaas om te sien hoeveel infektiwiteit behou is.

#### 3.3.3 Stabiliteit in verskillende soutkonsentrasies

Die biologiese stabiliteit van die virus is ondersoek by 10 mM, 50 mM, 100mM en 150 mM terwyl die pH en temperatuur konstant gehou is by 4C en pH 9,0. Ongesuiwerde virus is verdun om ongeveer 100 PVE per petri-bakkie te gee. Dit is dan by die betrokke toestand gehou en na verskillende periodes uitgeplaas om te sien in watter mate die infektiwiteit afgeneem het. Die virus skyn ongevoelig te wees vir konsentrasieveranderinge tussen 10 mM en 150 mM. (Kyk fig. 3.3.3a). In 'n tweede reeks eksperimente is hoër soutkonsentrasies vergelyk met 2mM Tris, nl. 200 mM, 600 mM en 1 000 mM NaCl in 10 mM Tris. Ander toestande is weer konstant gehou.

### 3.4 Resultate

#### 3.4.1 Termostabiliteit

Die termostabiliteit van ongesuiwerde BTV tipe 10A word aangedui in fig. 3.3.1. Die stabiliteit verskil min tussen 4C en 32C, maar neem vinnig af by 37C.

#### 3.4.2 pH stabiliteit

Die pH stabiliteit soos aangedui in fig. 3.3.2 dui aan dat die virus baie onstabiel is by pH 7,0 en pH 11,0. Tussen hierdie waardes d.w.s. pH 8,0 – pH 10,0 is BTV taamlik stabiel.

#### 3.4.3 Stabiliteit in verskillende soutkonsentrasies

Dit is duidelik dat 'n heelwat laer titer gemeet word in oplossings waar die soutkonsentrasie 200 mM of meer is (kyk fig. 3.3.3b), aangesien die begin titer heelwat laer is. Die stabiliteit geneem oor tyd bly egter nagenoeg konstant.

### 3.5 Bespreking

In die geval waar Neitz (1948) die virus baie termostabiel noem, is dit belangrik om te let op die hoë konsentrasie vreemde proteïen wat teenwoordig was. Hy het residuele infektiwiteit vir skape na blootstelling aan kamertemperatuur gemeet. Die bevinding van Alexander (1947) wat minder termostabiliteit aangedui het, is by 37C gedoen. Svehag (1963b) het termostabiliteit weer volgens 'n heel ander tegniek gemeet. Sy gevolgtrekking dat die virus opmerklik termostabiel is, is dus op heel ander eksperimentele bewyse gegrond. Al hierdie werkers het ongesuiwerde virus gebruik en in lg. 2 gevalle is die oorblywende infektiwiteit bepaal in 'n toetssisteem wat self 'n hoë konsentrasie proteïene bevat het nl. die eier. Die eiersisteem het ook die nadeel dat dit kwantitatief minder akkuraat is as die plaketsisteem waar elke infektiewe virus partikel waargeneem kan word. Howell *et al.* (1967) was die eerste wat die plaketmetode gebruik het. Sy resultate kon egter ook nie in hierdie studie gebruik word nie, aangesien hy BTV Tipe 4 gebruik het. Sy bepalings is ook oor lang tydperke (0–25) dae gedoen en die bepalings is etlike dae uitmekaar.

In die huidige studie is ongesuiwerde virus gebruik sonder byvoeging van vreemde proteïen. Dit is ook belangrik om daarop te let dat BTV tipe 10A gebruik is. Die resultate wat moontlik die meeste ooreenkoms met die huidige sou toon is die van Howell *et al.* (1967) omdat dieselfde toetssisteem gebruik is.

Ten spyte van verskille in tegnieke, tipe virus wat gebruik is en die afwesigheid of teenwoordigheid van vreemde proteïene is deurgaans gevind dat die virus redelik stabiel is tussen 4C en 32C.

In die huidige studie is die virus eers verdun tot 'n konsentrasie wat 100 PVE per petri-bakkie gee en daarna is dit op die betrokke tye uitgeplaat. Ander werkers wat ook die plaket-telmetode gebruik het, het 'n hoë konsentrasie virus aan die vereiste toestande onderwerp en dit op die betrokke tye getitreer. Uit die resultate blyk egter dat die verskil in die tegnieke nie belangrik is nie.

Die belang daarvan om onder gekontroleerde pH toestande te werk in eksperimentele ondersoeke met BTV, is reeds deur die eerste werker op die gebied beklemtoon (Owen, 1964). Ondersoeke na die invloed van pH op die infektiwiteit van die virus het soms tot uiteenlopende resultate gelei. Die verklaring hiervoor lê waarskynlik ook in die verskille in toetstegniek en die tipe virus wat gebruik is.

Owen (1964) en Svehag *et al.* (1966) het albei 'n nou sone van stabiliteit gevind tussen ongeveer pH 6,0 en pH 8,0. Verwoerd (1969) het 'n optimum stabiliteit gevind by pH 9,0 en heelwat minder stabiliteit by pH 8,0 en pH 7,0.

Die bevindings in die huidige studie kom meer met die van Verwoerd (1969) ooreen. In albei die gevalle is tipe 10 virus gebruik en die plaket-telmetode, terwyl die vorige 2 werkers die bepaling intraserebraal in muise gedoen het. 'n Verskil wat moontlik belangrik kon wees, is die suiwerheid van die virus. Die ooreenkoms tussen hierdie werk en die wat hy met gesuiwerde virus gedoen het, dui egter daarop dat die teenwoordigheid van weefselmateriaal nie 'n groot invloed op pH stabiliteit het nie.

Min werk is gedoen op die invloed van verskillende soutkonsentrasies op die stabiliteit van die virus. Die resultate in die huidige studie kom ooreen met die van Verwoerd (1969), nl. dat die stabiliteit veel beter by laer molariteit (2 mM) as by hoër molariteit (1000mM) is. As figure 3.3.3a en b vergelyk word is dit nou duidelik dat die nadelige effek eers vir molare konsentrasies bo 150 mM geld. Figuur 3.3.3b gee ook 'n aanduiding dat die nadelige effek van die hoër konsentrasies oplossings op 'n ander manier verklaar kan word as deur onstabiliteit. Dit is nl. dat die 0 uur uitplating reeds veel laer is as die kontrole en dat die titer daarna min of meer

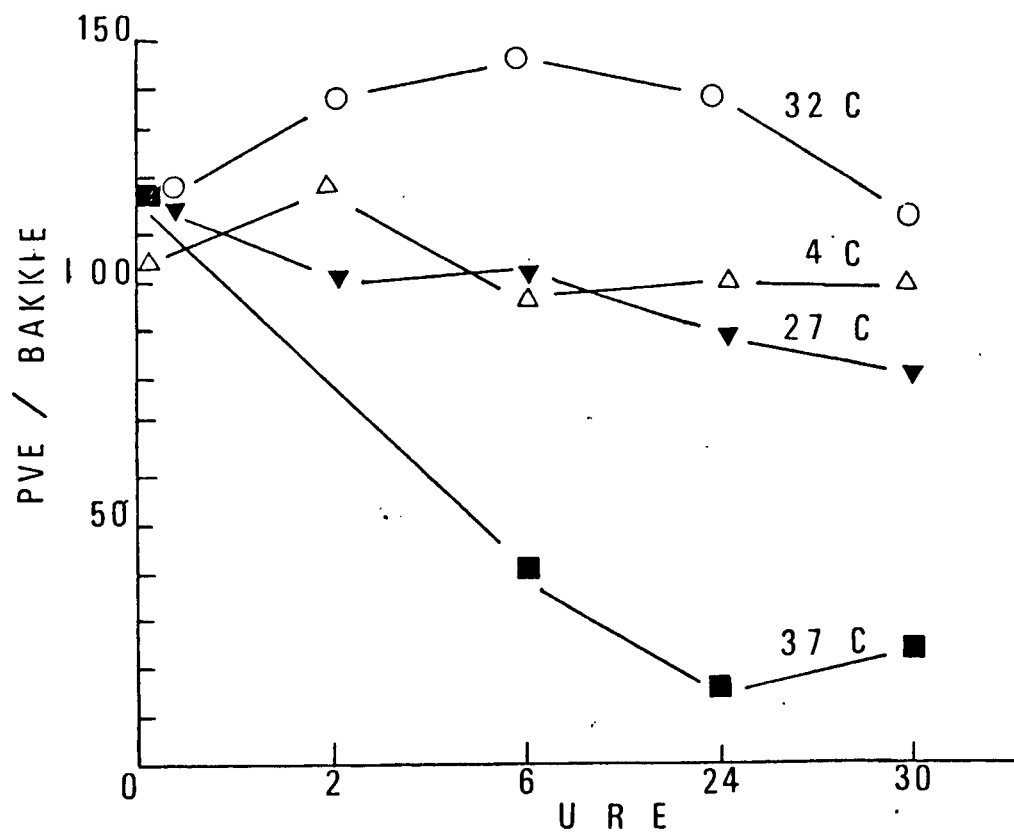


Fig. 3.3.1. Die stabiliteit van BTV tipe 10A (ongesuiwerde) by verskillende temperature, by pH 10 en 'n soutkonsentrasie 10 mM.

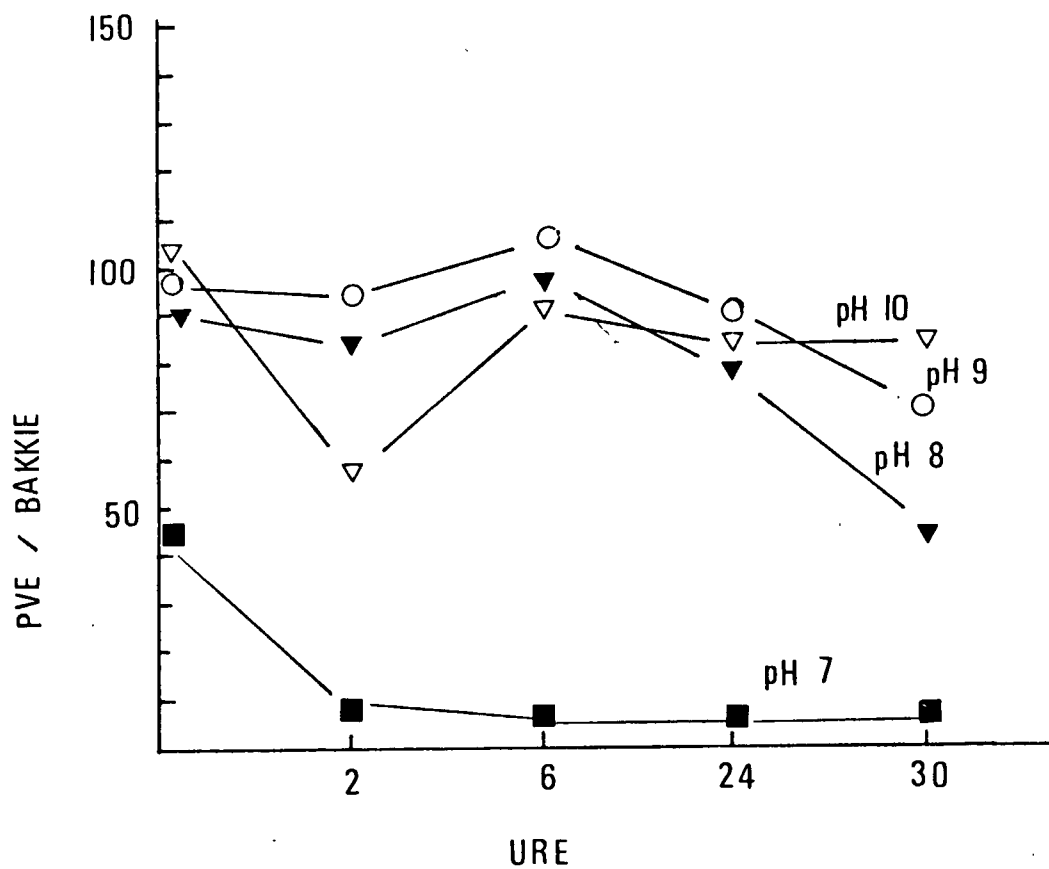


Fig. 3.3.2. Die stabiliteit van BTV tipe 10A by verskillende pH's.

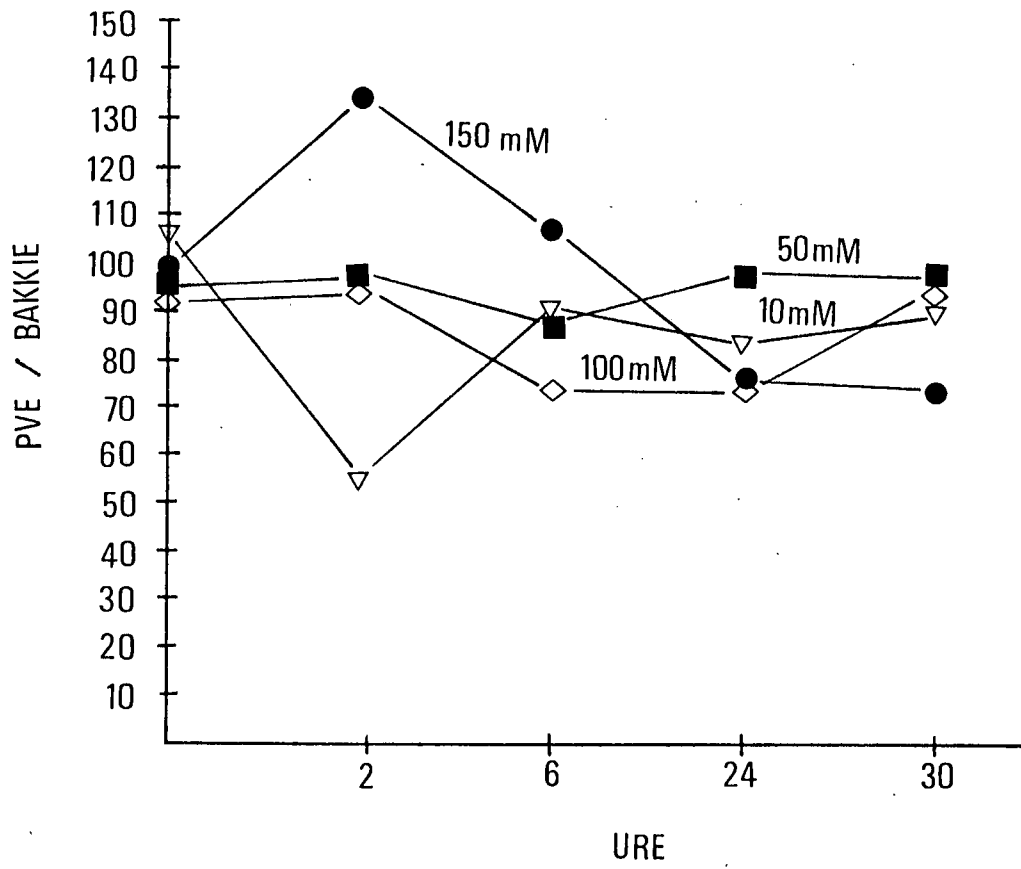


Fig. 3.3.3(a). Die stabiliteit van BTV tipe 10A in verskillende sout-konsentrasies.

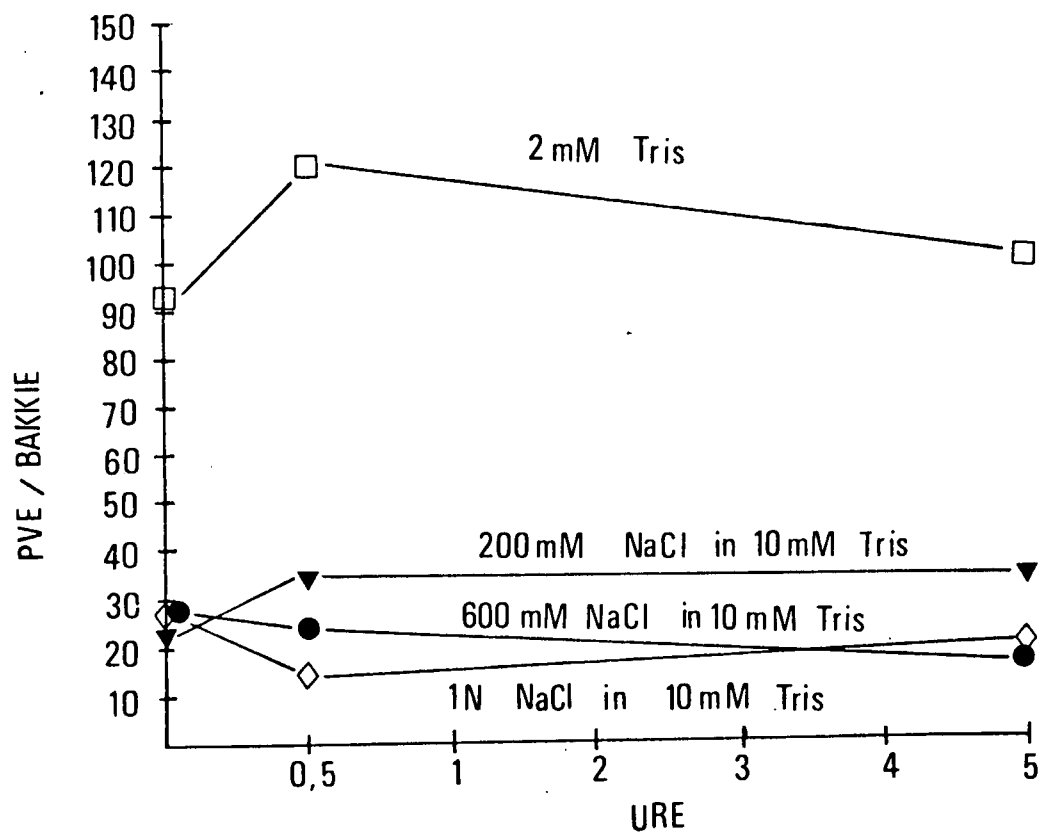


Fig. 3.3.3(b). Die stabiliteit van BTV by verskillende sout-konsentrasies.

konstant bly. Dit dui op 'n aggregasie van viruspartikels wat daartoe sal lei dat meer as een infektiewe viruspartikel as een plaket getel word en die indruk van onstabieleit word dan geskep. Die bevinding in die huidige studie dat konsentrasies so hoog as fisiologiese konsentrasie nie nadelig vir die virus is nie, word ondersteun deur Howell *et al.* (1967).

Hierdie resultate het dit moontlik gemaak om te besluit onder watter toestande die neutralisasiereaksie betekenisvol ondersoek kon word.

## HOOFSUK IV

### DIE NEUTRALISASIE VAN BLOUTONGVIRUS

#### 4.1 Inleiding

Wanneer polivalente immunisering en die probleme daaraan verbonde ondersoek word, is dit nodig om die basiese aspekte wat daarby betrokke is goed te begryp. Immunisering berus deels op die induksie van teenliggame waardeur beskerming gebied word. Die neutralisasie reaksie is die model *in vitro* sisteem met behulp waarvan die meganisme waardeur hierdie beskerming gebied word bestudeer kan word. Die proses van neutralisasie bestaan uit twee fases nl. 'n primêre monovalente reaksie van die antigeen en teenliggaam wat gevolg word deur sekondêre reaksies wat die stabiliteit van die kompleks kan verhoog. Belangrike inligting oor die proses kan verkry word deur 'n studie van die vorming en dissosiasie van die virus-teenliggaam kompleks. Dit is slegs die binding van sekere virus-antigene en teenliggame op 'n spesifieke wyse wat lei tot neutralisasie.

Drie aspekte van die neutralisasie proses by virusse word vervolgens beskou nl:-

1. die antigeen,
2. die teenliggaam, en
3. die reaksie tussen die twee.

Ten einde die antigene te karakteriseer of in molekulêre terme te definieer is dit nodig om hul te isoleer. Die antigeniese komponente van verskillende virusse is dus berei (Neurath en Benjamin 1971), veral om hul immunologiese belangrikheid beter te verstaan (Cowan, 1973).

Die bek-en-klouseervirus bevat 4 polipeptiede wat aangedui word as VP<sub>1</sub>, VP<sub>2</sub>, VP<sub>3</sub> en VP<sub>4</sub> (Stohmaier en Adam 1974). Slegs die volledige virus partikel (met 'n sedimentasie koëffisient van 140S) bevat egter immuniserende potensiaal wat gekorreleer kan word met VP<sub>1</sub>. Die leë partikels (75S) het ook 'n goeie vermoë om immuniserende teenliggaam uit te lok onder spesiale omstandighede. Die 12S subeenheid wat natuurlik voorkom of geproduseer kan word deur milde suurbehandeling, besit 'n baie swakker vermoë om neutraliserende teenliggaam uit te lok.

'n Ander picornavirus waarvan die antigeniese komponente ook bestudeer is, is poliovirus wat ook uit 4 polipeptiede bestaan. Poliovirus bereidings bevat 2 antigenies onderskeibare partikels – die wat nukleiënsuur bevat (D partikels) en dus volledig is en die leë partikels (C partikels) (Hummeler en Anderson, 1962) wat nie nukleiënsuur bevat nie en ook nie die vierde polipeptied nie. Aangesien die C partikels ook minder immunogenies is speel die nukleiënsuur en die vierde polipeptied moontlik bydraende rolle in die antigeniese struktuur van die virus (Cowan, 1973).

Antigeniese eienskappe van subvirale komponente van influenzavirus is ook deeglik ondersoek (Neurath en Rubin, 1971). Die tipe spesifisiteit word bepaal deur die oplosbare (S) of ribonukleoproteïene antigeen (Duesberg, 1968 en Pous, 1968). Die belangrikste antigene t.o.v. immunisering is waarskynlik die 3 oppervlakte antigene nl. die hemagglutinin- en neuraminidase-antigene wat op die verskillende uitsteeksels voorkom (Laver en Valentine, 1969 en Webster en Darlington, 1969) en 'n gasheersel-antigeen. Die hemagglutinin subeenheid is die eenheid waarmee die virus aan die selle heg en induseer neutraliserende teenliggaam (Webster *et al.*, 1968a en Schulze, 1970). Die neuraminidase-antigeen lok nie neutraliserende teenliggaam uit nie, maar kan 'n beduidende rol speel in die beskerming teen die siekte (Rott *et al.*, 1974 en Schulman *et al.*, 1968). Die rol en betekenis van die gasheer-antigeen is nie bekend nie (Knight, 1944) en die ribonukleoproteïene speel 'n minder belangrike rol in immunisering (Davenport *et al.*, 1960).

Die antigene en subvirale komponente van die adenovirus is ook deeglik ondersoek, omdat dit 'n ideale sisteem is om die gebruik van subeenhede in immunisering te ondersoek. Die belangrikste subkomponente van die virus is die heksons en pentons wat bestaan uit 'n penton basis en 'n vesel (Philipson en Petterson, 1973). Suiwer hekson en vesel lok teenliggaam uit wat muise teen 'n letale dosis virus kan beskerm en die virus neutraliseer. Die heel virus is egter nog meer immunogenies as die subkomponente (Mautner en Willcox, 1974).

Die tweede reagens wat deelneem aan die neutralisasie-reaksie, is die teenliggaam. Teenliggaam aktiwiteit en konsentrasie word meesal gemeet deur gebruik te maak van hul vermoë om die infektiwiteit van virusse te neutraliseer. By die gebruik van neutralisasietoetse moet steeds in aanmerking geneem word dat hierdie prosedure

net teenliggame teen sekere determinante meet, terwyl teenliggame teen baie ander antigeniese determinante ook gemaak word (Haimovich en Sela, 1969). Die ontwikkeling van 'n plaket-toetstegniek vir dierevirsusse op sel monolae (Dulbecco, 1952) het dit moontlik gemaak om sekere aspekte van die immuunrespons te bestudeer en ook om neutralisasie kwantitatief te bestudeer (Dulbecco, 1956). Neutralisasie gee egter geen aanduiding van die eienskappe van die neutraliserende teenliggame, bv. die klas van die teenliggaam, idiotipe, allotipe, ligte ketting-tipe en affiniteit nie. Die klasse en eienskappe van die teenliggame kan ook aansienlik varieer tydens die immuunreaksie, waarvan die neutralisasie reaksie geen aanduiding gee nie (Macario en de Macario, 1975; Blank *et al.*, 1972; Finkelstein, 1966 en Webster, 1968b).

Wanneer die neutralisasiereaksie self in die laaste plek beskou word, moet 'n paar basiese aspekte in gedagte gehou word. Die reaksie volg basies die wet van massawerking. Ewewigskonstantes kan dus bepaal word om aanduidings te gee van die tipe bindings wat 'n rol speel, asook die doeltreffendheid van die teenliggaam om virus te neutraliseer. Die aard van die antigeen-teenliggaam kompleks word bepaal deur die antigeniese groepe op die oppervlakte van die viruspartikel en die bindingsplekke op die teenliggaammolekuul. Geen unieke spesifieke bindings is betrokke nie, maar wel Van der Waals kragte, elektrostatiese bindings, polêre nie-ioniese bindings, waterstofbindings en moontlik hidrofobiese bindings. Aangesien geen unieke spesifieke bindings betrokke is nie, is die spesifiteit van die reaksie 'n gevolg van die komplementariteit van die groepe. Die tempo van assosiasie van antigeen en teenliggaam is baie hoog (Svehag, 1968).

Teenliggaam kan virus infektiwiteit op verskillende wyses neutraliseer (Dulbecco *et al.*, 1956; Fazekas de St. Groth, 1962; Dales en Kajioka, 1964; Mandel, 1967a,b; Fenner, 1968 en Silverstein, 1970) afhangende van die virus-gasheersel wat betrokke is. Die mees bekende maniere waarop teenliggaam virus kan neutraliseer is inhibisie van aanhegting van virions aan selle, die voorkoming van opname van geabsorbeerde virions, belemmering van die vrystelling van virus nukleïensuur en 'n versnelling van die afbreking van virusnukleïensuur.

Die vermoë van teenliggaam om 'n virus te neutraliseer, hang af van die tipe sel wat betrokke is, en die fisiologiese toestande in die reaksie mengsel (Neurath en Rubin, 1971).

Dit is ook belangrik om die rol van komplement in gedagte te hou aangesien dit op verskillende maniere neutralisasie kan beïnvloed bv. deur 'n "kombers effek", aggregasie van virus teenliggaam komplekse, virolise of direkte neutralisasie (Oldstone, 1975).

Met die oog op die belang van die neutralisasiereaksie in 'n studie van die immuunreaksie teen BTV is in hierdie studie veral gepoog om toestande te vind waar neutralisasie optimaal plaasvind.

#### 4.2 Literatuuroorsig

Serum-virus neutralisasie is die serologiese toets wat mees algemeen gebruik word vir die bepaling van BTV teenliggame en ook vir die tipering van BTV stamme. Die tegniek is in verskeie gasheersisteme gebruik bv. intraserebraal in muise (Kipps, 1958) en hamsters (Cabasso *et al.*, 1955). Hoenderembrio's is aanvanklik as ongeskik beskou om die reaksie in te doen (McKercher, 1954) maar is later wel redelik algemeen gebruik (Svehag 1963; Klontz *et al.*, 1962 en Goldsmit en Barzilai 1965). Die resultate van hierdie neutralisasietoetse moet egter versigtig vergelyk word aangesien daar aansienlike variasie in die tegnieke was. Sulke variasies was bv. in die serum- en viruskonsentrasies, roete van infeksie, dosis en die metode waarvolgens die eindpunte bepaal is. Svehag (1963a) het met sy studies met eieraangepaste virus gewys op die belangrikheid van "kontakondisies" in die neutralisasie reaksie. Hy het verder aange-  
toon dat meer gunstige kontakondisies die sensitiwiteit van die neutralisasietoets aansienlik kan verhoog. Verder merk hy ook op dat die "persentasie wet" by lae toetsdosisse van BTV slegs geldig is as verlengde kontakondisies gebruik word. Hy het hierdie resultate meer akkuraat probeer beskryf deur die gegradeerde respons kurwe te gebruik (Svehag, 1966b). Die meer verfynde en akkurate plaket-telmetode is egter vir die eerste keer in die huidige studie gebruik vir bepaling t.o.v. die neutralisasie reaksie, hoewel die plaket-telmetode reeds lank in gebruik is. (Howell *et al.*, 1967).

#### 4.3 Proefuitleg

Die effek van verskillende eksperimentele toestande op die neutralisasiereaksie is eerstens ondersoek:-

#### 4.3.1 Die effek van pH op die neutralisasie reaksie

Die neutraliserende vermoë van 'n bepaalde antiserum is vergelyk by pH 7,0, pH 8,0, pH 9,0 en pH 10,0, deur die neutraliserende titer by hierdie toestande te bepaal soos onder metodes beskryf is. Die soutkonsentrasie en temperatuur is konstant gehou by 10mM en 4C respektiewelik.

#### 4.3.2 Die effek van verskillende soutkonsentrasies op die neutralisasie reaksie

Die neutraliserende vermoë van 'n bepaalde antiserum is vergelyk by 10 mM, 50 mM, 100 mM en 150 mM deur die titer van die antiserum by die betrokke toestand te bepaal. Die pH en temperatuur is konstant gehou by pH 9,0 en 4C respektiewelik.

#### 4.3.3 Die effek van verskillende temperature op die neutralisasie reaksie en die kinetika van die reaksie

Die neutraliserende vermoë van 'n bepaalde antiserum is vergelyk by 4C en 28C deur die antiserum titer by die betrokke toestand te bepaal. Die soutkonsentrasie was 10mM en die pH 9,0 in albei gevalle.

### 4.4 Resultate

#### 4.4.1 Die effek van pH op die neutralisasie reaksie

Dit is duidelik dat daar meer neutralisasie plaasvind by die fisiologiese pH, as by die hoër pH's (fig. 4.3.1.2). Daar vind egter nog 'n groot mate van neutralisasie plaas by pH 10,0.

#### 4.4.2 Die effek van verskillende soutkonsentrasies op die neutralisasie reaksie

Die meeste neutralisasie is gevind by 150 mM en 'n klein hoeveelheid minder by soutkonsentrasies van 10mM tot 100mM (kyk fig. 4.3.2.).

#### 4.4.3 Die effek van verskillende temperature op die neutralisasie reaksie en die kinetika van die reaksie

Daar is feitlik geen verskil in die hoeveelheid neutralisasie wat by 4C en 28C plaasvind nie. Wat betref die tempo van neutralisasie het dit ewe vinnig by die twee temperature plaasgevind vir sover meetbaar deur die metode. Na 15 minute was die neutralisasie volledig en geen verdere neutralisasie het daarna plaasgevind nie (tot en met 5 uur) (kyk fig. 4.3.3.).

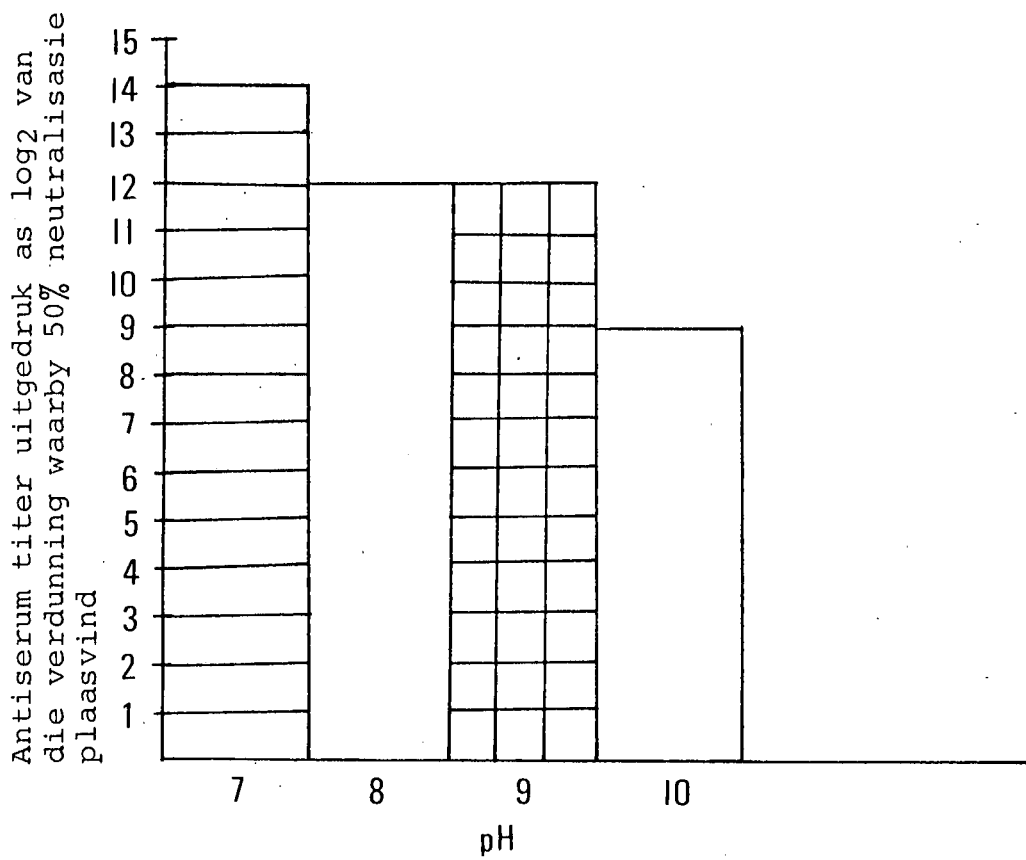


Fig. 4.3.1. Die invloed van verskillende pH's op die titrasie van BTV anti-serum.

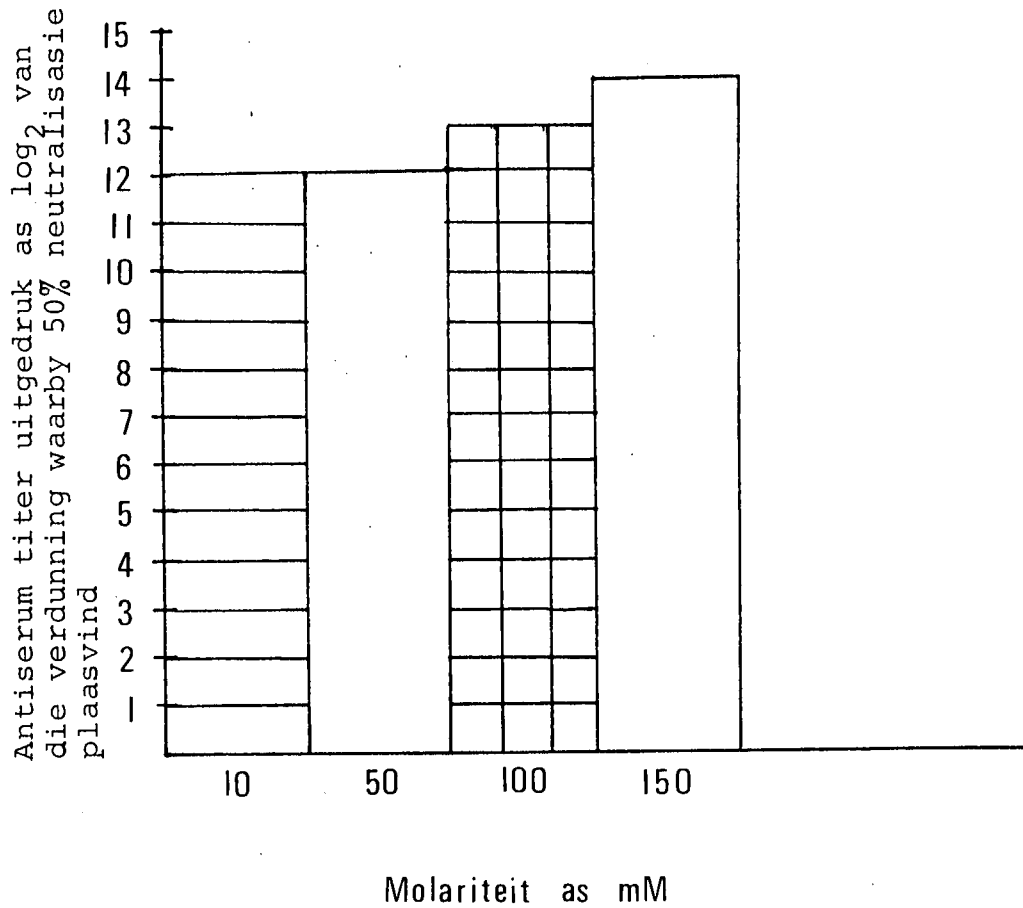


Fig. 4.3.2. Die invloed van verskillende soutkonsentrasies op die titrasie van 'n BTV antiserum.

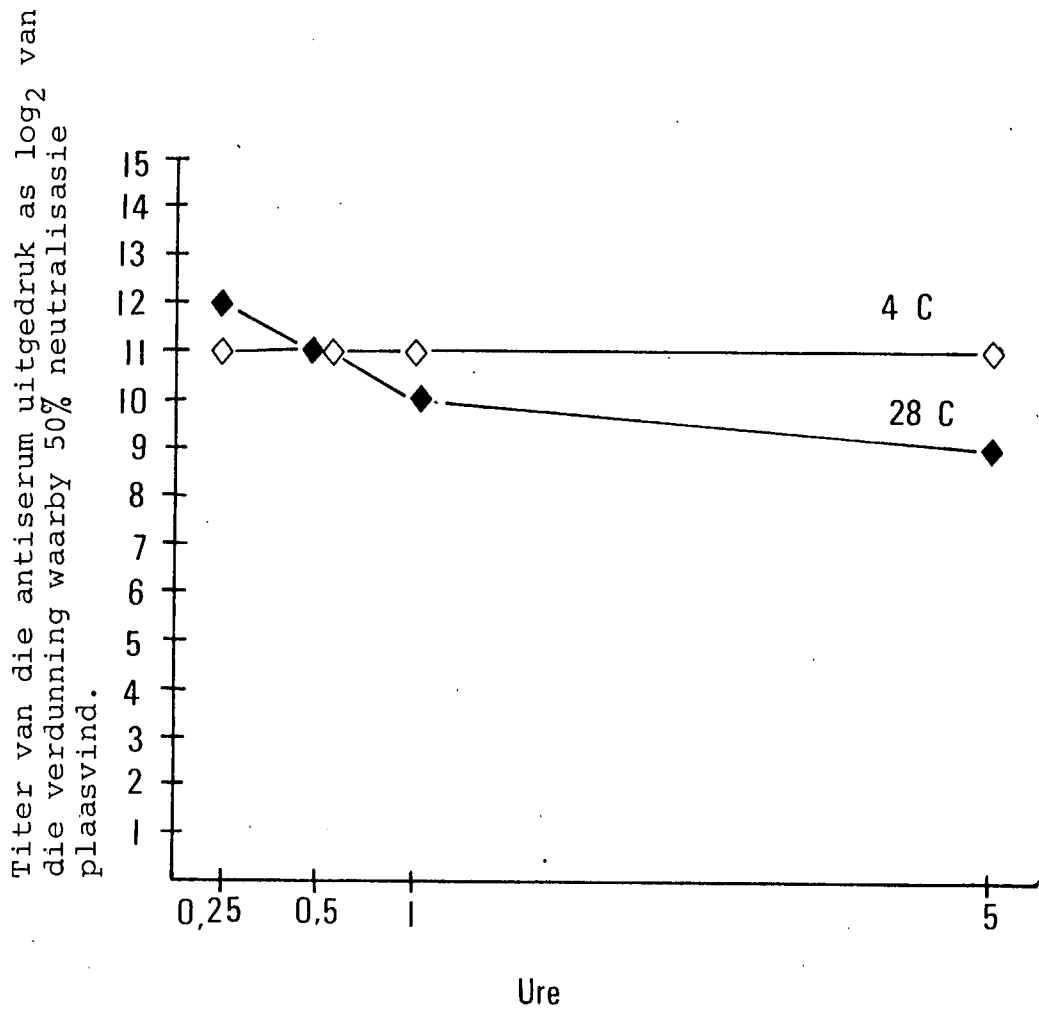


Fig. 4.3.3. Die invloed van temperatuur op die neutralisatiereaksie.

#### 4.5 Bespreking

Die resultate (figs. 4.3.1 en 4.3.2) dui op 'n effense toename in neutralisasie by fisiologie toestande. Die toename by pH 7, kan egter moontlik toegeskryf word aan die groter onstabiliteit van die virus by hierdie pH (sien hoofstuk II) wat kan lyk na meer neutralisasie. Die toename in sensitiwiteit is in elk geval nie soveel soos wat Svehag (1963a) gevind het nie.

Die toestande waarby minimale neutralisasie plaasvind is egter ook van belang. Indien die hoeveelheid geneutraliseerde virus bepaal wil word of die teenliggaam uit die kompleks herwin wil word, moet die virus-teenliggaam kompleks gedissosieer word. Dit is uit die resultate duidelik (figs. 4.3.1 en 4.3.2) dat in die gebiede wat ondersoek is nie voldoende dissosiasie plaasvind vir sodanige herwinnings nie. Die toestande waarby assosiasie en dissosiasie van die virus-teenliggaam kompleks bestudeer kan word, word beperk deur die stabiliteit van die virus. Spesifieke teenliggaam kan moontlik berei word deur die kompleks onder toestande te bring waar die virus opbreek en die teenliggaam vry kom, maar dit sou 'n uiters onekonomiese proses wees en bereiding tot 'n baie klein skaal beperk.

Die kinetika-eksperiment (fig. 4.3.3) toon dat daar nie beduidend meer neutralisasie plaasvind by hoër temperatuur as by laer temperatuur nie en ook dat die tempo van neutralisasie nie beduidend verskil nie. Verdere werk sou nodig wees om te bepaal of die aard van die kompleks onder die verskillende toestande verskil bv. ten opsigte van stabiliteit van die kompleks.

Dit word duidelik uit die resultate dat indien die effektiwiteit van die neutralisasie toets verhoog wil word, dit skynbaar by laer pH gedoen moet word (fig. 4.3.1). Terselfdertyd dui die ooreenkoms van teenliggaamtiter by verskillende toestande op aansienlike stabiliteit van die kompleks, d.w.s. dissosiasie vind nie maklik plaas nie.

## HOOFSTUK V

### DIE IMMUNREAKSIE TEENoor BLOUTONGVIRUS

#### 5.1 Inleiding

By 'n ondersoek van die eienskappe en hoeveelhede van teenliggame wat verskyn na 'n antigeniese stimulus, moet al die aspekte van die immuunreaksie in gedagte gehou word. 'n Veralgemeende siening van die humorale immuunreaksie teen virusse is dat dit bifasies is, met 'n aanvanklike piek van antivirale aktiwiteit binne 5 tot 8 dae, gevolg deur 'n tweede piek na 15–20 dae. Die bifasiese aard van die responskurwe kan toegeskryf word aan die algemeen aanvaarde opeenvolgende verskyning van immunoglobulien M (IgM) en immunoglobulien G (IgG) teenliggame (Svehag, 1964 en Cowan, 1973). Die vertraagde verskyning van komplementbindende teenliggame kan moontlik toegeskryf word aan die IgM wat gewoonlik vroeg verskyn en nie komplement bind nie (Graves *et al.*, 1964; Cowan en Trautman, 1965; Bellanti *et al.*, 1965 en Schmidt, 1968). Immunoglobulien M oorheers die vroeë respons, maar of dit IgG vooraf gaan, is nie bekend nie. In die gevalle van antigene soos bv. serum albumien- en  $\gamma$  globulien is getoon dat IgG en IgM gelyktydig verskyn (Freeman en Stavitsky, 1965 en Osler *et al.*, 1966).

In vroeëre werk was dit voldoende om die humorale immuunreaksie net te bepaal en te beskryf in terme van serum teenliggame titers. Later is die reaksie meer akkuraat beskryf toe 'n onderskeid tussen IgG en IgM gemaak is. Om 'n akkurate beeld van die humorale immuunreaksie te gee moet assosiasie konstantes van die teenliggame op verskillende tydstippe gedefinieer word en die allotipe en idiotipe ook aangedui word (Macario en de Macario, 1975).

Dit is verder van belang om te let na die verband tussen die titer van neutraliserende teenliggame en beskerming teen infeksies. In verskeie gevalle is gevind dat die neutralisasie toets nie 'n betroubare aanduiding gee van die immuunstatus van die dier nie. In die gevalle is gevind dat die diere ten spyte van hoë vlakke neutraliserende teenliggame, nie daging met die betrokke infektiewe agent kan weerstaan nie bv. bek-en-kloseervirus (Cowan, 1973) en Oostelike enkefalitisvirus (Brown en Officer, 1975).

Om die beskermende effek van antivirale teenliggame te begryp, moet die belang van die verskille in biologiese aktiwiteit van die klasse en subklasse van teen-

liggaam in gedagte gehou word (Oldstone, 1975). In voorafgaande is op enkele verskille in die aktiwiteit van IgG en IgM gewys. Die subklasse van IgG van 'n verskeidenheid spesies, bv. marmot, konyn, hond en rot vertoon ook verskille in biologiese aktiwiteit (Bloch *et al.*, 1963; Ovary *et al.*, 1963 en Davis *et al.*, 1967). Die manier van immunisering kan 'n rol speel in die relatiewe hoeveelhede IgG1 en IgG2 wat geproduseer word (Benacerraf, *et al.*, 1963). Immunisering met oplosbare antigene geemulsifeer in 'n volledige olie adjuvant prikkel die vorming van beide subklasse, hoewel IgG2 vroeër verskyn. Intraperitoneale immunisering sonder adjuvant kan daartoe lei dat hoofsaaklik IgG1 gevorm word. In die geval van konyne wat geimmuniseer is met poliovirus het IgG1 voor IgG2 verskyn (Svehag, 1964). Marmotte geimmuniseer met Herpes Simplexvirus (HSV) het 'n ietwat hoër vlak IgG2 as IgG1 geproduseer na primêre immunisering, maar na 'n "opjaag" inspuiting was die IgG1 op 'n hoër vlak as die IgG2 (Tokumaru, 1967). Min of meer dieselfde situasie geld vir mense wat besmet is met varicella zostervirus (Leonard *et al.*, 1970). Hieruit blyk dus dat die wyse en roete van toediening 'n belangrike faktor kan wees in die mate van beskerming (Fine *et al.*, 1974) en die aard van die immuun reaksie (Kerbel en Davies, 1974). In sommige ander gevalle het dit skynbaar nie 'n effek nie (Ganguly *et al.*, 1974). Daar kan ook 'n verskil wees in die beskermende vermoë van stadige en vinnige IgG teenliggame (Tokumaru, 1967).

Dit is lank reeds bekend dat die vermoë van 'n individu om teenoor 'n sekere antigeen te kan reageer gekorreleer kan word met sy genetiese samestelling. Dit is 'n feit wat belangrik is om te onthou wanneer reaksies in diere getoets word soos in die huidige projek. Dit lyk asof die gene wat die reaksie van individue beheer, ook hul vatbaarheid teenoor siektes bepaal. Genetiese beheer bepaal nie net of 'n dier teen 'n sekere antigeen kan reageer nie, maar ook hoe sterk hy sal reageer (Mozes *et al.*, 1972).

Wanneer die immuniteit van individue teen infeksie beskou word is dit belangrik om in gedagte te hou dat sodanige weerstand uit verskillende komponente opgebou kan wees. Die belang van 'n bepaalde komponent hang van die besondere virus-gasheer kombinasie af (Allison, 1972). Die eerste lyn van verdediging is die beperking wat die gasheersel kan plaas op virusvermeerdering. Dit kan plaasvind deurdat adsorpsie van die virus aan die sel (McLaren, 1959) verhinder word of die vrystelling van die virus se nukleiënsuur kan gekeer word (Darnell en Sawyer, 1960) of die virus nukleiënsuur kan

afgebreek word (Sturman en Tamm, 1969 en Wall en Taylor, 1970). Indien strukturele proteïene wel gesintetiseer word, kan virus samevoeging in sekere gevalle geblokkeer word (Taylor *et al.*, 1969).

Immunoglobulien A (IgGA) of makrofage speel ook 'n belangrike rol vroeg in infeksies. Immunoglobulien A is veral belangrik by infeksies van die spysverterings- of respiratoriese kanaal. Dit word lokaal geprikkel en is teenwoordig in sero-mukus sekresies (Schwartz en Buckley, 1971 en Waldman *et al.*, 1972). Makrofage speel weer 'n belangrike rol om virusse uit die weefsel of bloed te verwyder. Makrofage van volwasse diere beperk verspreiding deurdat dit nie virusvermeerdering toelaat nie (Allison, 1972). Hierdie eienskap word geneties bepaal en is gekoppel aan virulensie soos getoon in byvoorbeeld die geval van die Wesselsbron en Germiston virusse, waar gevind is dat die virulente virus in die makrofaag kan vermeerder, maar nie die avirulente virus nie (Olson *et al.*, 1975). Die rol van makrofage in immuniteit kan geïllustreer word deur eksperimente waar hul funksie benadeel word deur die toediening van silika (Selgrade *et al.*, 1974). Die aktiwiteit van makrofage kan verhoog word deur 'n immuunreaksie (Allison, 1972).

In gevalle waar vermeerdering van die virus by die primêre setel van infeksie nie beperk kan word deur bogenoemde meganismes nie, speel sirkulerende teenliggaam 'n baie belangrike rol om die viremiese verspreiding van die virus te beperk en aldus beskerming teen infeksie te verleen (Oldstone, 1975). Hierdie feit kan onteenseglik bewys word waar teenliggaam passief oorgedra word na diere waarin hul eie immuunapparaat onderdruk word (Allison, 1972). Hierdie werker toon aan dat humorale immuniteit veral 'n baie belangrike rol speel in die immuniteit teen arbo- en enterovirusse. Die binding van virus aan teenliggaam kan egter ook nadelige effekte hê en 'n rol speel in die patogenese van sekere siektes (Oldstone, 1975).

Sellulêre immuniteit kan ook 'n belangrike rol speel in 'n dier se weerstand teen infeksies. Dit speel in die geval van Herpes- en pokvirus infeksies 'n belangrike rol. Dit kan aangetoon word deur neonatale timektomie uit te voer en anti-limfosietserum toe te dien. Hierdie behandeling onderdruk die sellulêre immuniteitsmeganisme grootliks en weerstand teen infeksie word daardeur verlaag (Kozinowski en Brandlow, 1975; Gardner *et al.*, 1974 en Allison, 1972).

## 5.2 Literatuuroorsig

Die vroegste studies oor die immuunrespons teen BTV het 'n beter beskerming teen BTV-infeksies beoog. Die belangrikste probleme t.o.v. BTV immunisering in die vroeë stadium was die herhaaldelike voorkoms van die siekte by diere wat tevore al geïnfecteer was en die kort duur van die immuniteit, wat toegeskryf is aan die veelvuldigheid van stamme wat in die natuur voorkom (Spreull, 1905 en Theiler, 1906). Theiler se entstof wat bestaan het uit virus wat verswak is deur 'n serie van oorspuitings in skape (Theiler, 1908) is ten spyte van hierdie probleme lank gebruik. Die eerste vordering om 'n beter begrip van die probleme te verkry was toe Neitz (1948) deur sy werk *in vivo* die bestaan van 'n veelvuldigheid van stamme met verskillende serologiese eienskappe bewys het. Hy het verder aangetoon dat een rede vir die ondoeltreffendheid van Theiler se entstof is dat 'n serie van oorspuiting in skape in werklikheid nie verswakking van die virus veroorsaak het nie. Die veelvuldigheid van stamme is verder gestaaf toe Howell (1960) ook *in vitro* 12 immunologiese tipes onderskei het deur 'n reeks neutralisasie toetse in kulture van lamnierselle in rolbuise. Later is nog 4 addisionele serotipes geklassifiseer (Howell, 1960 en Howell, 1969).

Die immuunreaksie is ten opsigte van die verskyning, duur en verdwyning van teenliggame deeglik ondersoek. Du Toit (1929) het van daageksperimente in skape afgelei dat daar 'n stadige afname in immuniteit is vanaf die derde tot die twaalfde maand na infeksie, waarna dit nie meer betekenisvol teenwoordig is nie. Neitz (1948) kon hierdie resultate nie bevestig nie en het verklaar dat daar na 12 maande geen merkbare afname is in die immuniteit teen 'n homoloë tipe virus nie. Hy het die korte duur van immuniteit wat die vorige werkers gerapporteer het toege-skryf daaraan dat 'n heteroloë stam moontlik vir die daging gebruik is. Klontz *et al.* (1962) het die verband tussen neutraliserende en presipiterende teenliggaam ondersoek. Hy het 2 skape gebruik om die verskyning, duur en verdwyning van die teenliggaam te ondersoek. By albei skape is sirkulerende neutraliserende teenliggaam waargeneem van 4 tot 8 dae na infeksie met virulente virus en het 'n piek bereik binne een tot twee maande. Die twee skape het meer verskil van mekaar in hul reaksie t.o.v. presipiterende teenliggaam. Verskyning was na ongeveer dieselfde tyd as neutraliserende teenliggaam nl. 4-8 dae. Neutraliserende teenliggaam het 'n piek bereik na 24 dae,

terwyl presipiterende teenliggaam na 96 dae 'n piek bereik het. Presipiterende teenliggaam is egter langer op 'n hoë vlak gehandhaaf. Slegs die neutraliserende teenliggaam vertoon 'n amnestiese reaksie.

Komplementbindende teenliggaam kan reeds teen die 10e dag nadat die koors die eerste keer begin styg het, aangetoon word en bereik 'n hoogtepunt teen die 36ste dag. Dit word gehandhaaf vir 6 tot 8 weke, maar is na 12 maande nie meer betekenisvol teenwoordig in die sirkulasie nie (Verwoerd en Howell, 1971). Howell (1969) wys daarop dat die konsentrasie van die antigeen 'n belangrike rol speel in die uitslag van die komplementbinding toets. Hy het ook gevind dat die verswakte stamme min of geen komplementbindende teenliggame uitlok nie. Die komplementbindende reaksie kan groepspeesifiek of serotipe spesifiek wees, afhangende van die prosedure wat gebruik word en die betrokke virus. In die geval van BTV het hy gevind dat die neutralisasie reaksie serotipe spesifiek is, maar die komplement binding reaksie groepspeesifiek. Die bestaan van groep spesifieke en tipe spesifieke antigene kan verklaar word in terme van die bevindings van De Villiers (1974). Dit blyk nl. uit hierdie werk dat polipeptiede 2 en 6 wat die serotipespesifiteit bepaal in die buiteste proteïen laag geleë is, terwyl die ander polipeptiede dieselfde is by die verskillende tipes is en waarskynlik dus die groepspeesifieke antigeen of antigene bevat.

### 5.3 Proefuitleg

Verskeie aspekte van die immuunreaksie teenoor BTV is ondersoek:-

#### 5.3.1 Die effek op die immuunreaksie van verskillende wyses van toedienings van die virus

Om vas te stel of die wyse van toediening van die virus 'n belangrike rol speel in die aard van die immuunreaksie wat uitgelok word, is die virus soos in tabel 5.3.1 aangedui aan konyne toegedien.

Tabel 5.3.1.1. Die verskillende wyses waarvolgens BTV toegedien is.

Virus	Roete	Byvoegings	Titer/ml
A. Gesuiwer	b.s.	—	$1 \times 10^{10}/$
B. Gesuiwer	b.s.	—	$1 \times 10^5/$
C. Gesuiwer	b.s.	onvolledige Friends	$2 \times 10^{10}/$
D. Gesuiwer	b.a.	—	$1 \times 10^8$
E. Gesuiwer	o.h.	—	$1 \times 10^8$
F. Ongesuiwer	b.s.	—	$1 \times 10^8$
G. Ongesuiwer	b.s. en b.a.	—	$1 \times 10^8$

b.s. — binnespiers

b.a. — binne-aars

o.h. — onderhuids

L.W. Alle inspuitings is weekliks herhaal vir 3 weke. Die eerste bloeiing het plaasgevind een week na die laaste inspuiting.

Om die invloed van die genetiese variasie tussen individue op die resultate te beperk is 3 konyne in elke groep gebruik. Die inspuitings is weekliks herhaal vir 3 weke. Die eerste serum is verkry een week na die laaste inspuiting. Neutraliserende teenliggaam titers is bepaal soos in hoofstuk II beskryf.

### 5.3.2 Genetiese verskille tussen konyne

Ten einde vas te stel in welke mate die konyne geneties van mekaar verskil is 5 konyne onder dieselfde toestande ingespuut nl. een inspuiting van 1 ml BTV suspensie (ongesuiwer) met titer  $6 \times 10^8$ /ml en hul reaksies daarop gevolg.

### 5.3.3 Verskille tussen spesies

Dit is bekend dat sekere antigene in een spesie glad nie immunogenies is nie, maar wel in 'n ander spesie. Om die beste dier te kies uit die wat oorweeg is vir hierdie werk, is die antigeen se immunogeniteit in konyne en marmotte vergelyk. Twee groepe marmotte van elk 3 individue is ingespuut met 3 weklikse inspuitings van 1 ml BTV (ongesuiwer) met titer  $3 \times 10^8$ /ml. Die groep marmotte wat die beste reageer het is daarna vergelyk met 'n groep van 3 konyne. Die konyne het 3 weklikse inspuitings van 1 ml ongesuiwerde BTV gekry met titer  $1 \times 10^8$ /ml en hul reaksie daarop gevolg.

### 5.3.4 Die rol van IgM en IgG in die immuunreaksie teen BTV

Ten einde die rol van IgM en IgG in die immuunreaksie teen BTV te bepaal is 'n konyne met BTV geïmmuniseer en daarna na verskillende tussenposes gebloeï. Die anti-BTV teenliggaam titer word in fig. 5.3.4 voorgestel. Elke serum monster is geskei in die IgG en IgM fraksies m.b.v. sukrose gradient sentrifugering en gestoor by  $-40^{\circ}\text{C}$  totdat dit gebruik moes word. Die suiwerheid van die fraksies is d.m.v. immunodiffusie bepaal. Die prosedure vir gradient-sentrifugering en immunodiffusie is in hoofstuk II beskryf. Van die IgG en IgM fraksies is 0,5 ml gemeng met 'n 0,5 ml van 'n suspensie virus met 'n konsentrasie sodanig dat as geen neutralisasie plaasvind nie, dit by uitplating van 0,1 ml, ongeveer 100 plakette per petri-bakkie sou gee.

Tabel 5.3.4. Die rol van IgM en IgG in die immuunreaksie teen BTV

Dag van inspuiting en dosis as PVE/ml	Aantal dae na eerste inspuiting wat monster geneem is.	Aantal plakette na vermenging met aangeduide fraksie. Die kontrole waarde is 100		Totale teenliggaam titer.
		IgM	IgG	
0-10 ml $5 \times 10^7$		64	130	0
	2	95	112	0
	6	0	36	$2^9$
	13	0	32	$2^7$
	22	4	28	$2^6$
	30	32	0	$2^6$
	36	—	—	—
44-10ml $5 \times 10^7$	44	55	0	$2^9$

### 5.3.5 Die gebruik van immuunelektronmikroskopie om teenliggaam-aktiwiteit teen BTV aan te toon

In die heel vroeë stadium, tydens die sg. induksie periode, kan geen teenliggaam teen BTV deur neutralisasietoetse aangedui word nie (kyk fig. 5.3.4). Om dus op 'n ander wyse te probeer vasstel of teenliggaam in hierdie stadium wel teen BTV gemaak word, is die tegniek van immuunelektronmikroskopie gebruik. As teenliggaam-bron teen BTV is 'n gepoelde antiserum (monsters wat van 1 week tot 3 maande na immunisering geneem is) gebruik. Die konyne het 3 wekelikse inspuitings gekry van 1 ml onsuiver BTV met titer  $1 \times 10^8/\text{ml}$  en is wekeliks of 2 wekeliks na die laaste toediening gebloeï.

### 5.3.5.1 Die isolasie van IgG

Om die resultaat van die immuunelektronmikroskopie te probeer verbeter is die immunoglobulien G (IgG) fraksie uit die serum geïsoleer en as sodanig as BTV teenliggaam bron gebruik. Die isolasie van  $\gamma$  globulien is gedoen deur drie  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  presipitasies. Die  $\gamma$  globulien is dan d.m.v. DEAE sellulose verder gefraksioneer om die IgG te isoleer.

### 5.3.5.2 Die bepaling van die suiwerheid van geïsoleerde IgG

'n Monster van elke suiweringsstap d.w.s (a) die hele serum b), c), d) die vloeistowwe van 3 opeenvolgende presipitasies, e) die 3e presipitaat en f) die IgG fraksie na kolom fraksionering is behou en die samestelling bepaal om die verloop van die eksperiment te kontroleer en die suiwerheid van die IgG fraksie te bepaal. Dit is gedoen m.b.v. poliakrielamiedjelektroforese en sellulose-asetaat-membraanelektroforese waarop elke monster ondersoek is.

### 5.3.5.3 Die gebruik van immuunelektronmikroskopie om teenliggaamaktiwiteit aan te toon

Die immuunelektronmikroskopie is gedoen deur gebruik te maak van tipe 10A en tipe 4A BTV. Sien fig. 5.3.5.4 (a-i). Twee kontroles, is vir tipe 10A en vir tipe 4A gebruik nl. (a) tipe 10A + 2m Tris en (b) tipe 10A + negatiewe kontrole serum, (c) tipe 4A + 2mM Tris en (d) tipe 4A + negatiewe kontrole serum. Om te toets of daar enige immunologiese aktiwiteit in die antiserum teenwoordig is, is elke tipe virus met antiserum (e en f) met antiserum teen tipe 10A en met die IgG fraksie van hierdie antiserum (g en h) geïnkubeer.

Ten einde vas te stel of teenliggaamaktiwiteit in serum aangetoon kan word vroeër as wat m.b.v. die neutralisasietoets aangedui kan word is serum geneem 2 dae na immunisering. 'n Tweemaal verdunning van hierdie antiserum is gebruik in 'n immuunelektronmikroskopie eksperiment.

## 5.4 Resultate

### 5.4.1 Die effek op die immuunreaksie van verskillende wyses van toedienings van die virus

Die resultate word volledig in tabel 5.3.1.2 weergegee en voorgestel in fig. 5.3.1.1. Die reaksies op die verskillende toedienings kan rofweg in 3 groepe ingedeel word. nl.:

- (1) 'n hoë reaksie groep
- (2) 'n middelmatige reaksie groep
- (3) 'n lae reaksie groep.

1) Die hoë reaksie groep sluit in C, D en F d.w.s. C: gesuiwerde virus in onvolledige Freund's adjuvant binnespiers toegedien, titer  $2 \times 10^{10}$ /ml; D: gesuiwerde virus b.a. ingespuut, titer  $1 \times 10^8$ /ml en F: ongesuiwerde virus, b.s. titer  $1 \times 10^8$ .

2) Die middelmatige reaksie groep sluit A en G in. A: gesuiwerde virus, b.s., titer  $1 \times 10^{10}$  en G: ongesuiwerde virus, b.s. en b.a., titer  $1 \times 10^8$ .

3) Die lae reaksie groep: sluit in groep B: gesuiwerde virus, b.s., titer  $1 \times 10^5$  en groep E: gesuiwerde virus, o.h., titer  $1 \times 10^8$ .

Tabel 5.3.1.2. Die immuunreaksies van vyf groepe konyne na verskillende maniere van toediening van die antigeen

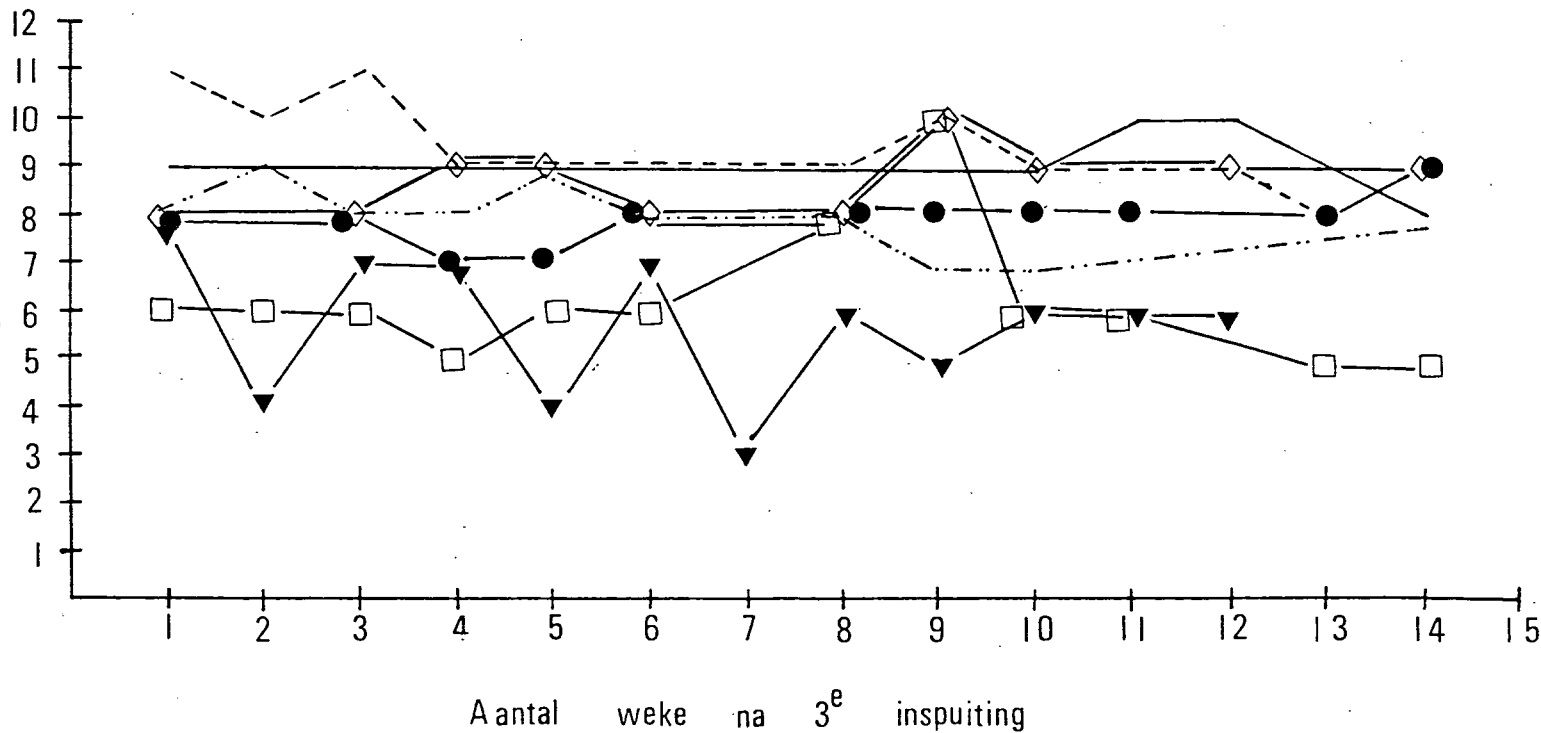
Aantal weke na 3e inspuiting	Maniere van toediening*						
	A	B	C	D	E	F	G
1.	8**	6	9	11	8	8	8
2.	8	6	9	10	4	8	9
3.	8	6	9	11	7	8	8
4.	7	5	9	9	7	9	8
5.	7	6	9	9	4	9	9
6.	8	6	9	—	7	8	8
7.	8	—	9	—	3	8	8
8.	8	8	9	—	6	8	7
9.	8	10	9	10	5	10	7
10.	8	6	9	9	6	9	7
11.	8	6	10	9	6	—	—
12.	8	—	10	9	6	—	—
13.	8	5	9	8	—	—	—
14.	9	5	8	—	—	9	8
15.	8	6	8	—	—	—	—
16.	8	5	8	—	—	—	—
17.	10	4	8	—	—	—	—
18.	8	6	8	—	—	—	—
19.	8	6	9	—	—	—	—
20.	7	—	—	—	—	—	—

\* Sien tabel 5.3.1.1. vir verklaring van simbole.

\*\* Die syfers in die kolomme dui die titer van die antiserum aan uitgedruk as  $\log_2$  van die verdunning van die antiserum wat 50% neutralisasie gee.

Om die moontlike invloed van roete op die antigeniteit van die virus duidelik na vore te bring word in fig. 5.3.1.2 twee uiterstes vergelyk. 'n Groep wat 'n hoë reaksie gegee het (D) word vergelyk met 'n groep wat 'n lae reaksie gegee het (E). Dit is duidelik dat 'n aansienlike rol gespeel word deur die roete van immunisering.

Antiserum titer aangedui as log<sub>2</sub>  
van die verdunning wat 50%  
neutralisasie gee.



- A ●—● 1x10<sup>10</sup> gesuiwerde PVE/ml, b.s. toegedien.  
 B □—□ 1x10<sup>5</sup> gesuiwerde PVE/ml, b.s. toegedien.  
 C - - - 2x10<sup>10</sup> gesuiwerde PVE/ml, gemulsifiseer in onvolledige Freund se adjuvant, b.s. toegedien.  
 D - - - 1x10<sup>8</sup> gesuiwerde PVE/ml, b.a. toegedien.  
 E ▼—▼ 1x10<sup>8</sup> gesuiwerde PVE/ml, o.h. toegedien.  
 F ◇—◇ 1x10<sup>8</sup> ongesuiwerde PVE/ml, b.s. toegedien.

Fig. 5.3.1.1. Die reaksies van konyne na toediening van BTV op verskillende maniere.

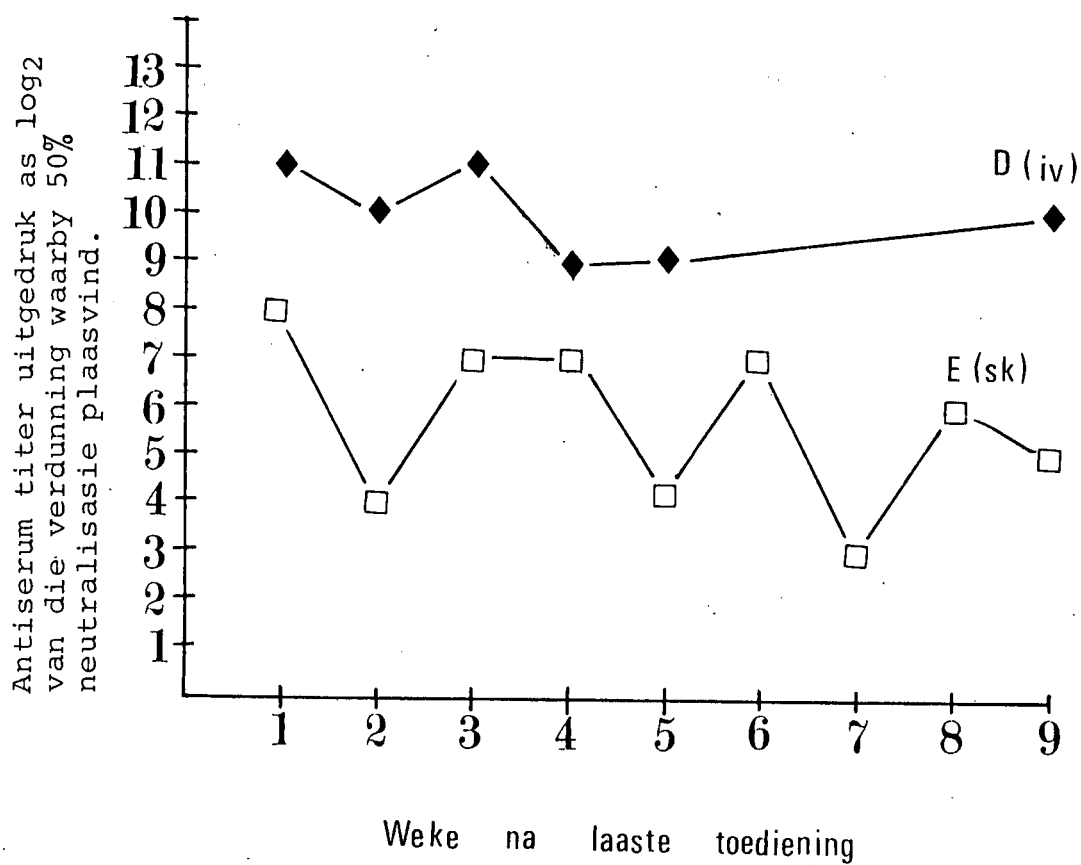


Fig. 5.3.1.2. Die reaksie van konyne nadat immunisering deur 2 verskillende roetes plaasgevind het.

D(iv) – intraveneus  
E(sk) – subkutaan.

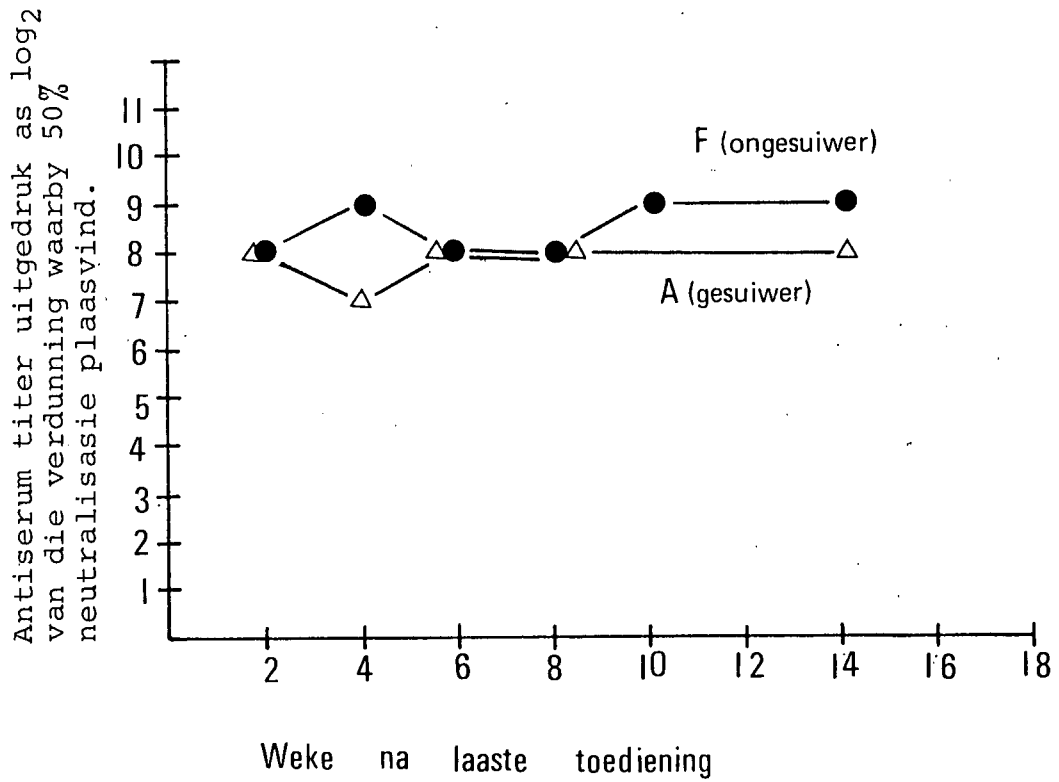


Fig. 5.3.1.3. Die invloed van die suiwerheid van die virus op die vlak van die immuunreaksie wat daardeur uitgelok word.

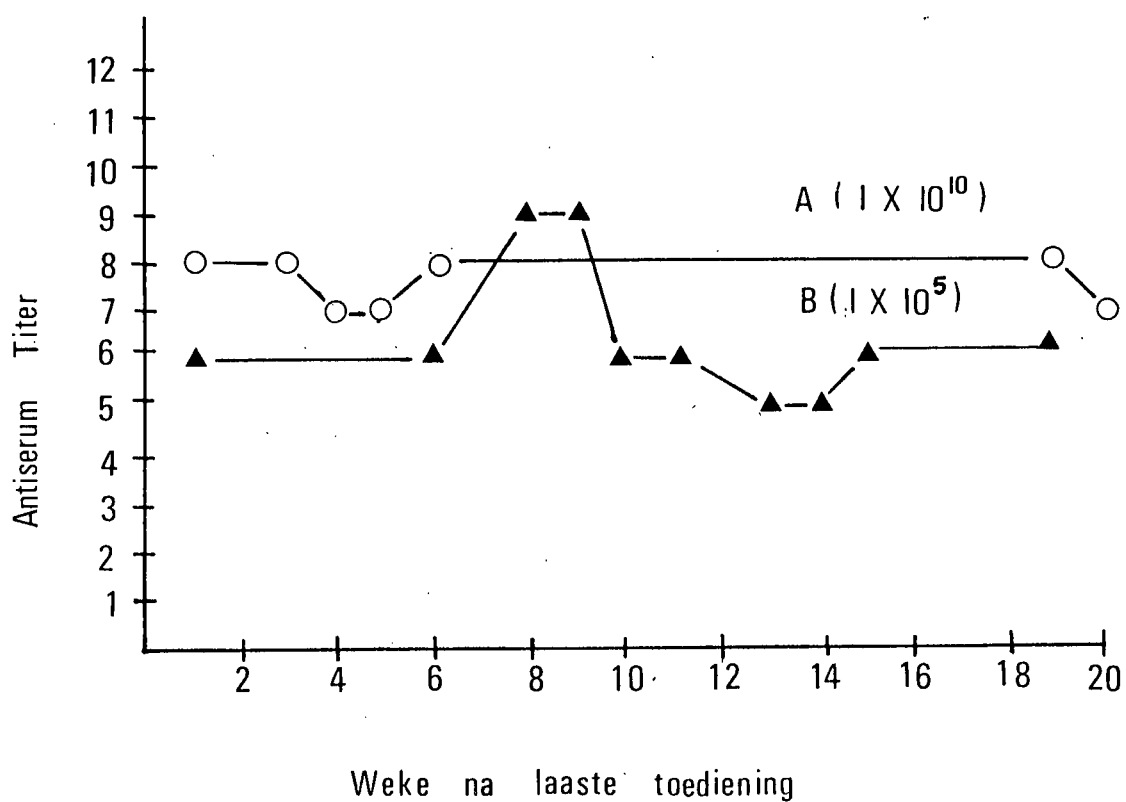


Fig. 5.3.1.4. Die invloed van die titer van die virus in die inokulum op die hoogte van die immuunreaksie wat daardeur uitgelok word.

Om die effek van die suiwerheid van die virus voor te stel word groepe A en F in fig. 5.3.1.3 vergelyk. Groep A is gesuiwerde virus en groep F is ongesuiwerde virus. In albei gevalle is die virus binnespiers toegedien. Daar skyn min verskil te wees as die laer titer van die ongesuiwerde virus verder in ag geneem word.

Laastens kan die invloed van die titer van die virus in die inokulum op die immuun reaksie beskou word. Dit blyk uit fig. 5.3.1.4 dat die titer van min belang is.

#### 5.4.2 Genetiese verskille tussen konyne

In fig. 5.3.2 word die resultaat aangedui en dit wil voorkom of die genetiese verskille tussen die individue minimaal is.

#### 5.4.3 Verskille tussen spesies

Die resultate van die vergelyking van die reaksies van konyne en marmotte word voorgestel in fig. 5.3.3.2 waaruit blyk dat hulle nie betekenisvol verskil nie.

#### 5.4.4 Die rol van IgM en IgG in die immuunreaksie teen BTV

As 100% neutralisasie (d.w.s. geen plakette) as maatstaf geneem word, is dit duidelik uit tabel 5.3.4 dat IgM vroeg in die immuunreaksie die belangrikste rol speel en IgG later.

#### 5.4.5 Die gebruik van immuunelektronmikroskopie om teenliggaam-aktiwiteit teen BTV aan te toon

##### 5.4.5.1 Die isolasie van IgG

Ten einde suiwer IgG te bekom vir gebruik in immuunelektronmikroskopie is  $\gamma$  globulien gefraksioneer m.b.v. 'n DEAE-sellulose kolom. Die IgG kom uit in ongeveer 30–45 ml eluant (kyk fig. 5.3.5.1).

##### 5.4.5.2 Die bepaling van die suiwerheid van geïsoleerde IgG

Die suiwerheid van die geïsoleerde IgG is bepaal deur poliakrielamiedjelektroforese en sellulose-asetaat-membraanelektroforese. In fig. 5.3.5.2 word die resultaat op

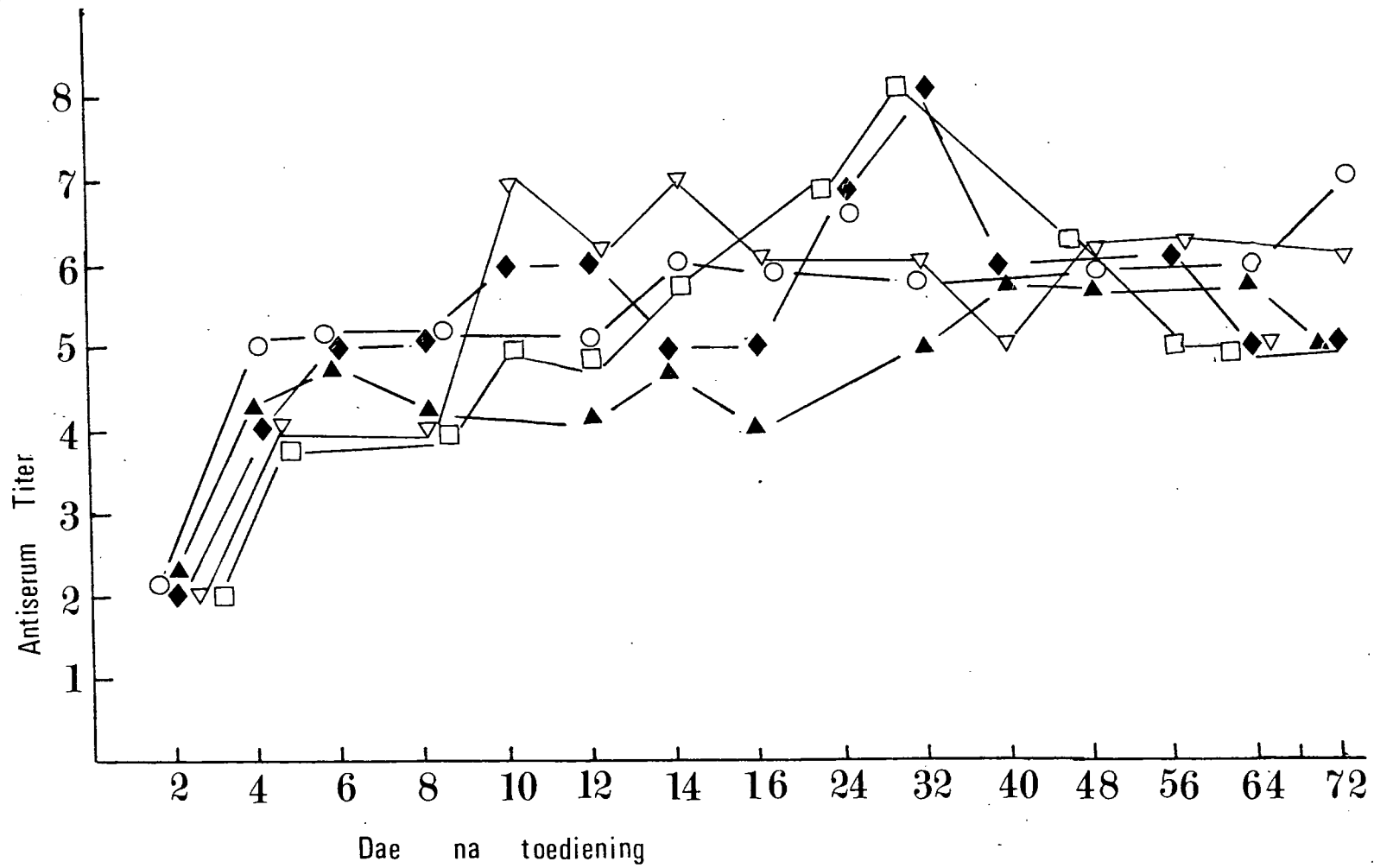


Fig. 5.3.2. Die reaksies van 5 konyne te vergelyk na toediening van 'n inspuiting van 1 ml BTV met titer  $6 \times 10^8$ /ml.

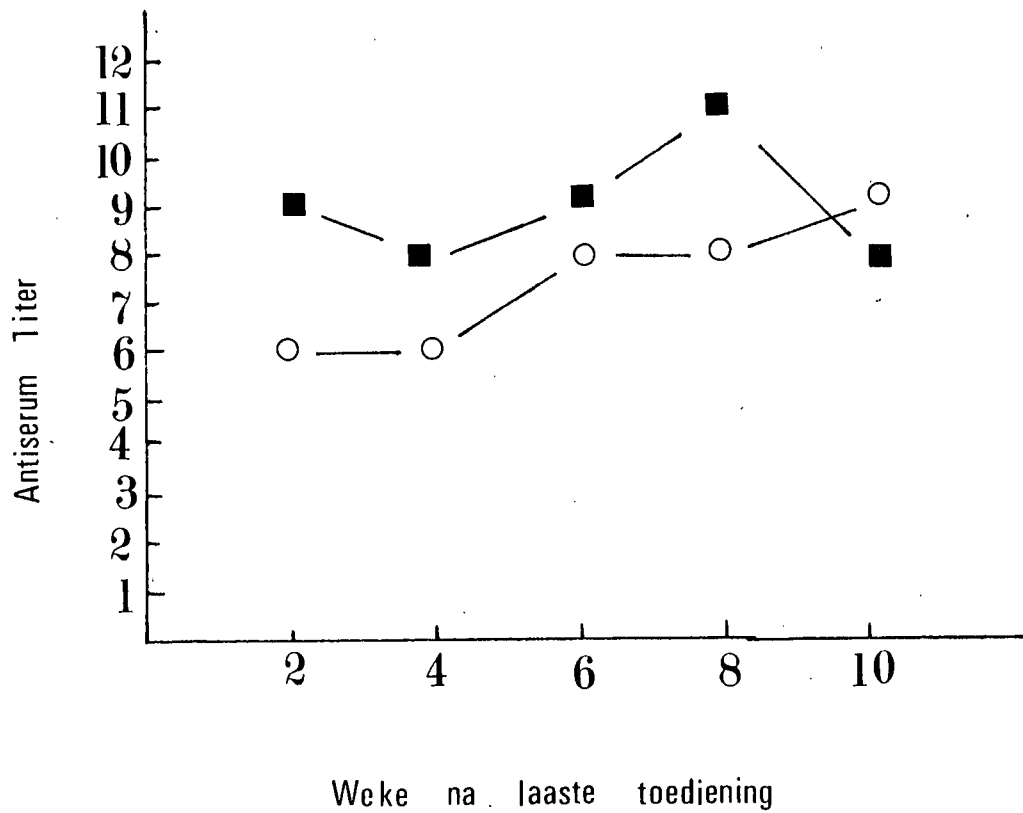


Fig. 5.3.3.1. Die reaksie van 2 groepe marmotte na toediening van 3 wekelijkse inspuitings van 1 ml BTV met titer  $3 \times 10^8$ .

■ — ■ : groep 1  
 ○ — ○ : groep 2

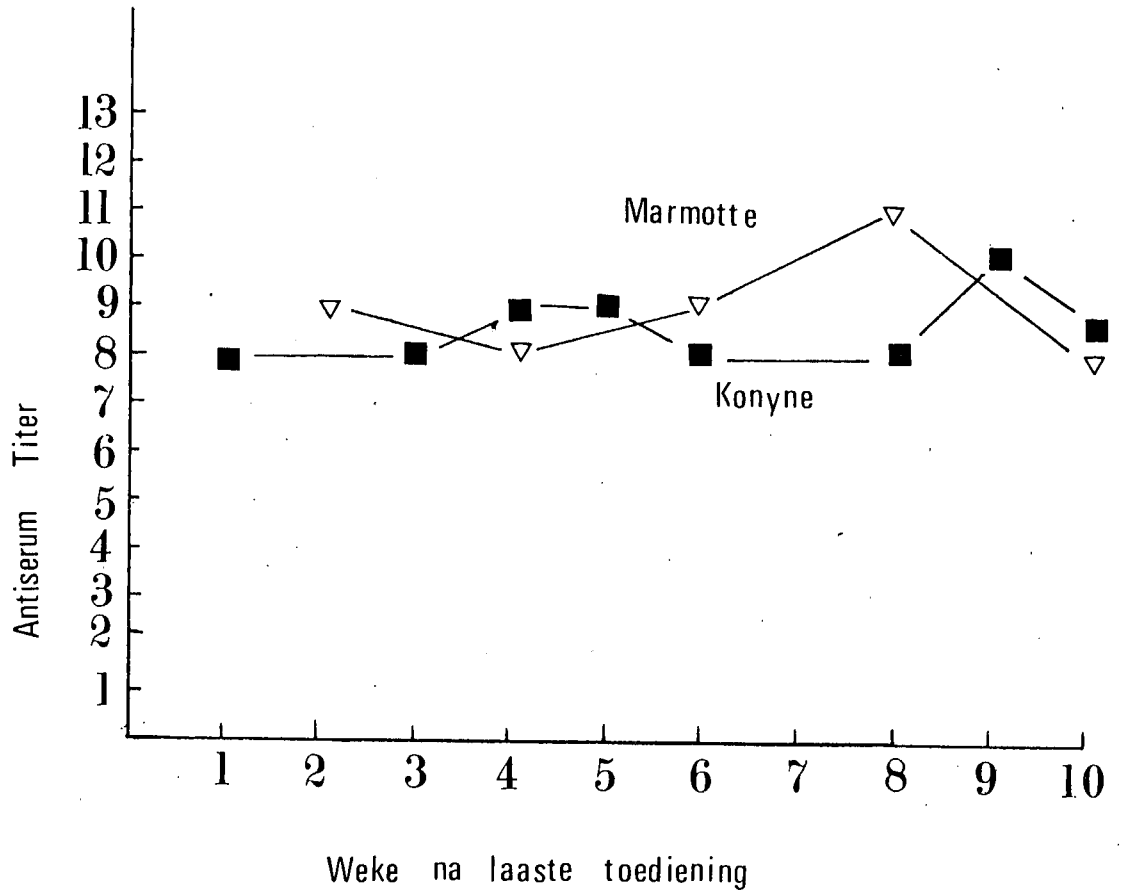


Fig. 5.3.3.2. 'n Vergelyking van die reaksie van konyne en marmotte na immunisering met BTV.

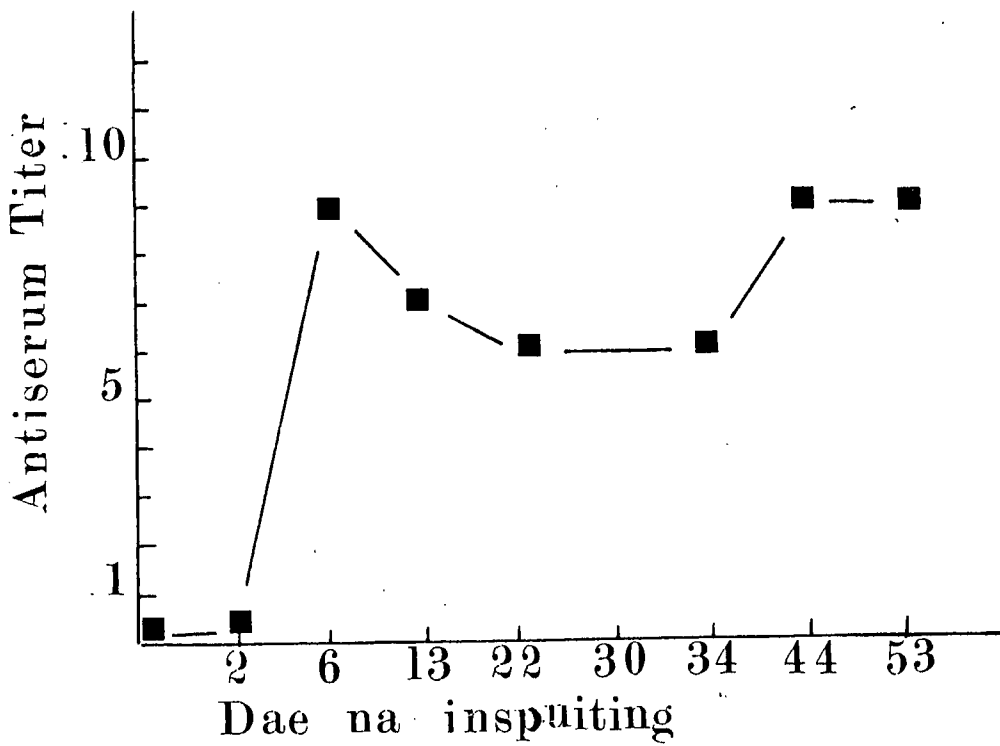


Fig. 5.3.4. Die reaksie van 'n konyn op 2 inspuitings van 10 ml virus met titer  $5 \times 10^7$ .

jelektroforese aangedui en in fig. 5.3.5.3 op sellulose-asetaat-membraan elektroforese. Dit is duidelik dat elke presipitasie 'n groot aantal proteïene (veral albumiene) verwyder, maar dat selfs die 3e presipitaat nog nie-globuliene bevat. Na kolom fraksionering is relatief die suiwerste fraksie verkry.

#### 5.4.5.3 Die gebruik van immuunelektronmikroskopie om teenliggaamaktiwiteit aan te toon

Na aanleiding van Almeida en Waterson (1969) is 2 kriteria gebruik om te oordeel of 'n immunologiese aktiwiteit merkbaar is nl. 1) 'n aggregasie van virusse en 2) 'n verdoffing van die fyn skerp struktuur van die virus. Daar is 'n duidelike aggregasie wanneer tipe 10A en sy homoloë antiserum of IgG geïnkubeer word, (fig. e en g). Geen verdere aanduidings van 'n immunologiese reaksie kan egter aangetoon word nie, want alhoewel in die positiewe reaksie (fig. e) 'n verdoffing van die detailstruktuur voorkom in vergelyking met die kontrole in fig. a, skyn dit dat die verdoffing waarskynlik 'n nie-spesifieke toedoen van proteïene, is, wanneer dit vergelyk word met fig. b). As hierdie figure vergelyk word met h en f is dit duidelik dat die reaksie serotipe spesifiek is.

Serum wat negatief is in die neutralisasie reaksie, toon ook nie teenliggaam-aktiwiteit in 'n immuunelektronmikroskopiese ondersoek nie. Dit blyk uit fig. 5.3.5.4(i) waar die reaksie gesien kan word van sodanige serum. Dit is geneem 2 dae na iminusering en verskil merkbaar van die positiewe kontrole wat gesien kan word in fig. 5.3.4(e).



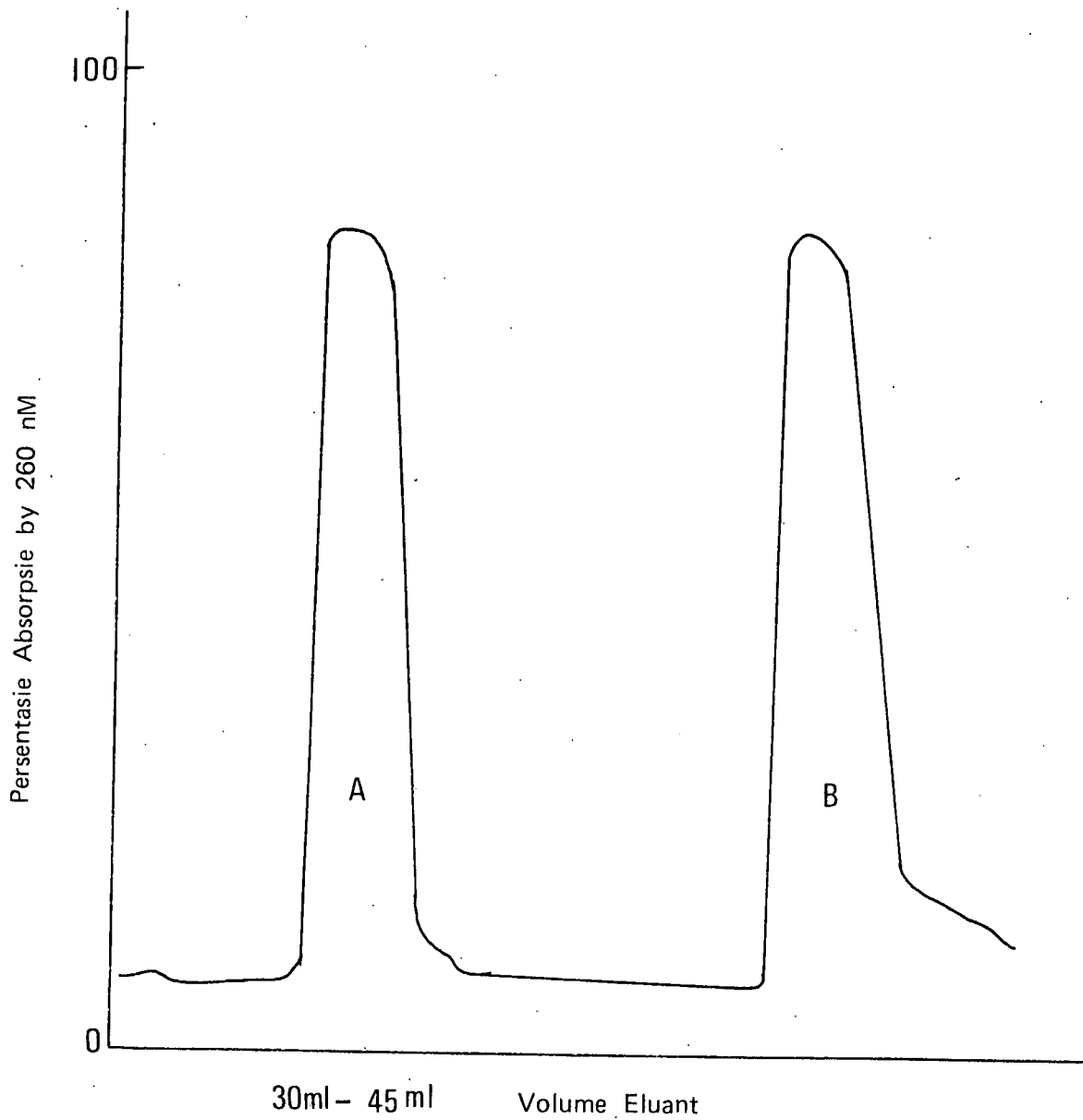


Fig. 5.3.5.1. Die isolasie van IgG uit 'n globulien preparaat d.m.v. DEAE-sellulose kolomfraksionering.  
Piek A - IgG  
Piek B - ongeïdentifiseerde globuliene.



Fig. 5.3.5.2. Die suiwing van IgG deur middel van poliakrielamied jeelektroforese gedurende verskillende stappe.

- a — die samestelling van volledige serum.
- b,c,d — die samestelling van die bovloeistowwe van 3 opeenvolgende presipitasies.
- e — die samestelling van die 3e presipitaat.
- f — die samestelling van die IgG fraksie na kolomfraksionering.

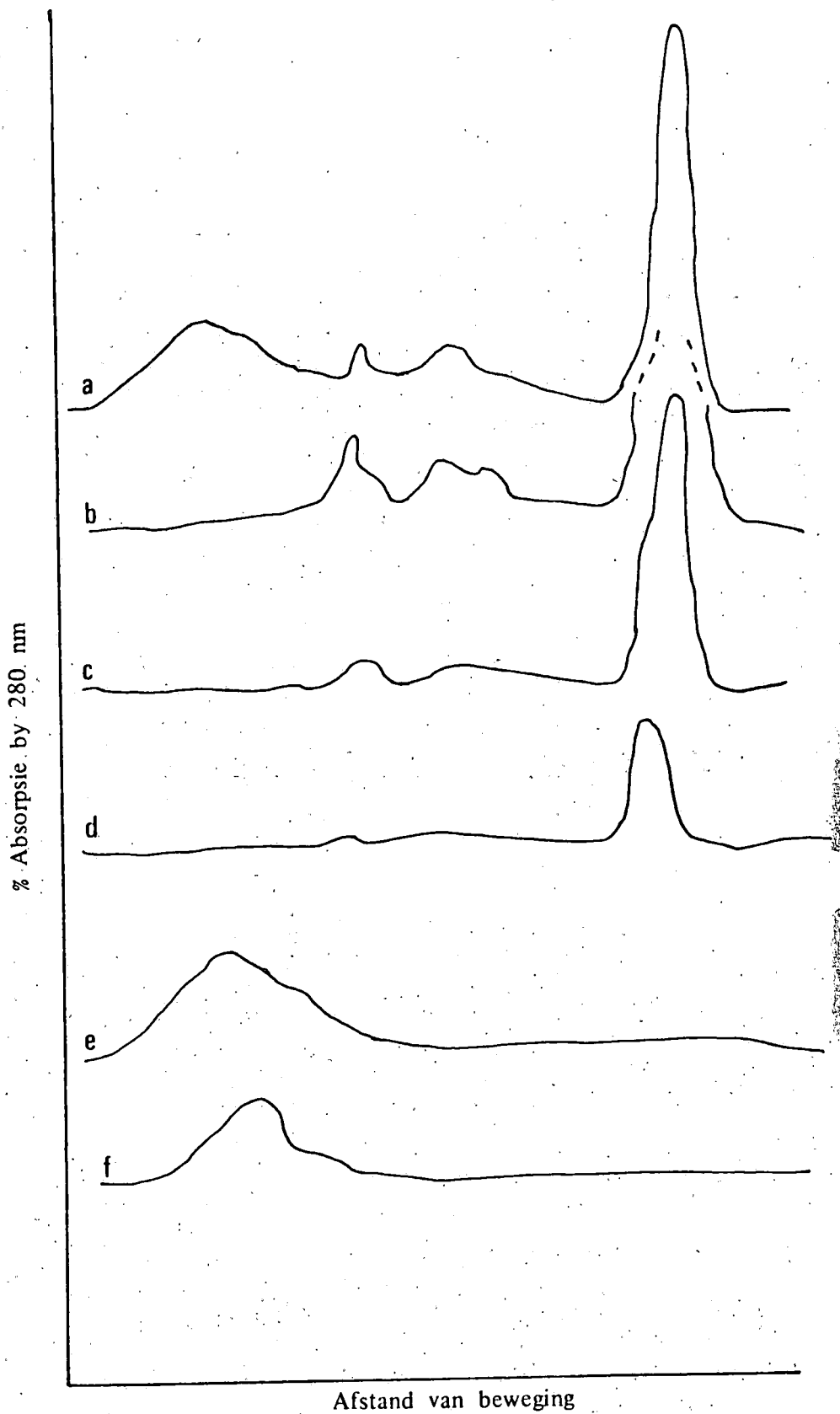


Fig. 5.3.5.3. Elektroforetiese profile van die fraksies wat verkry word gedurende verskillende stappe van die suiwing van IgG.

- a — volledige serum.
- b,c,d — die boyleistowwe van 3 opeenvolgende presipitasies.
- e — die samestelling van die 3e presipitaat.
- f — die samestelling van die IgG fraksie na kolomfraksionering.

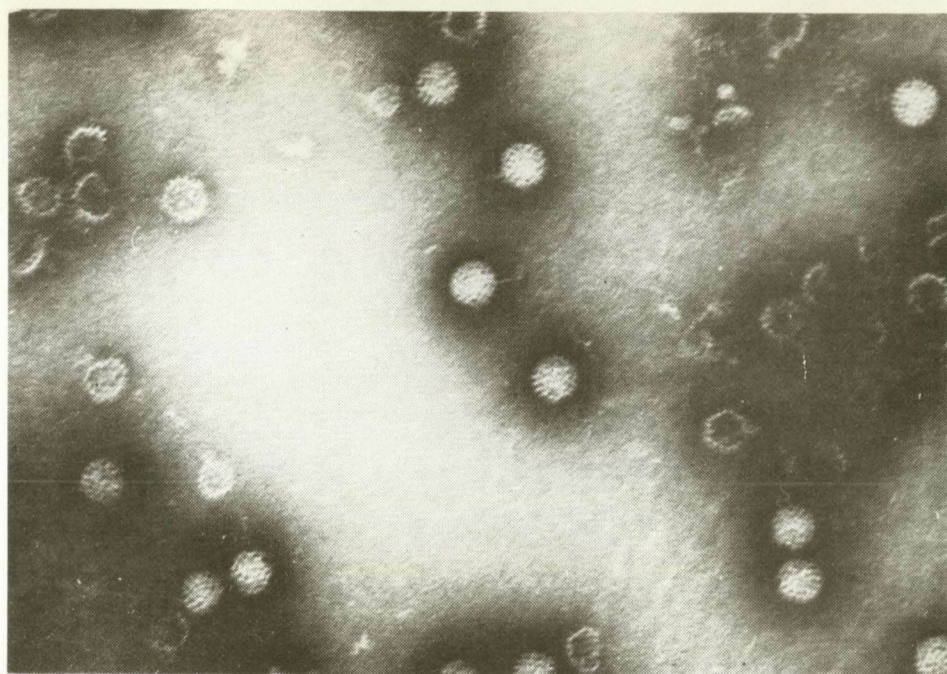


Fig. 5.3.5.4(a) – Die voorkoms van 'n kontrole preparaat van BTV-tipe 10A met negatiewe kleuring in 2mM Tris gesuspendeer. Vergroting X100 000

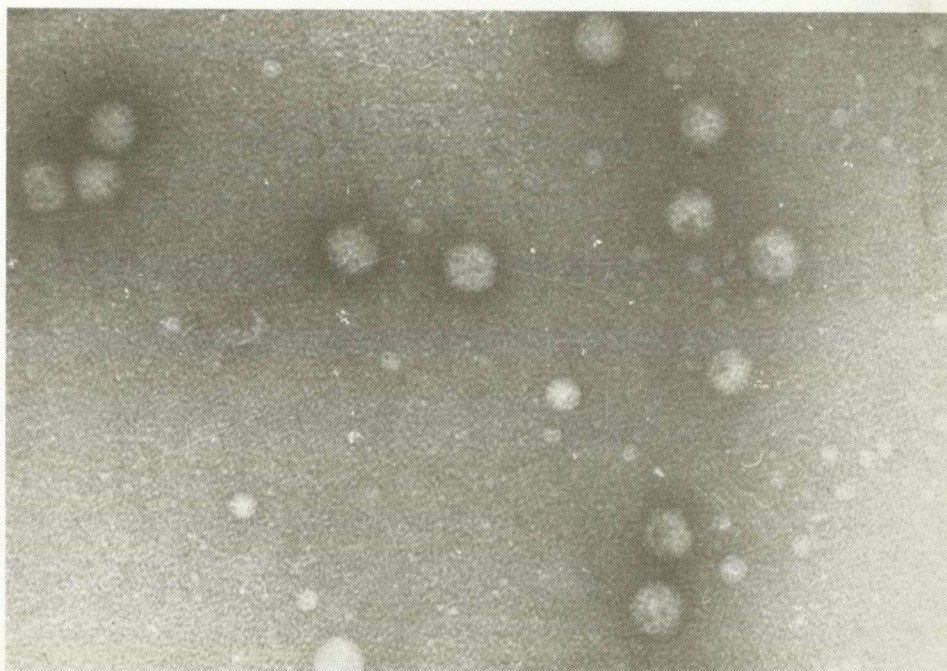


Fig. 5.3.5.4(b) – Dieselfde preparaat as in (a) na behandeling met 'n kontrole serum wat negatief is vir BTV-teenliggaam in die neutralisasie reaksie. Vergroting x100 000.

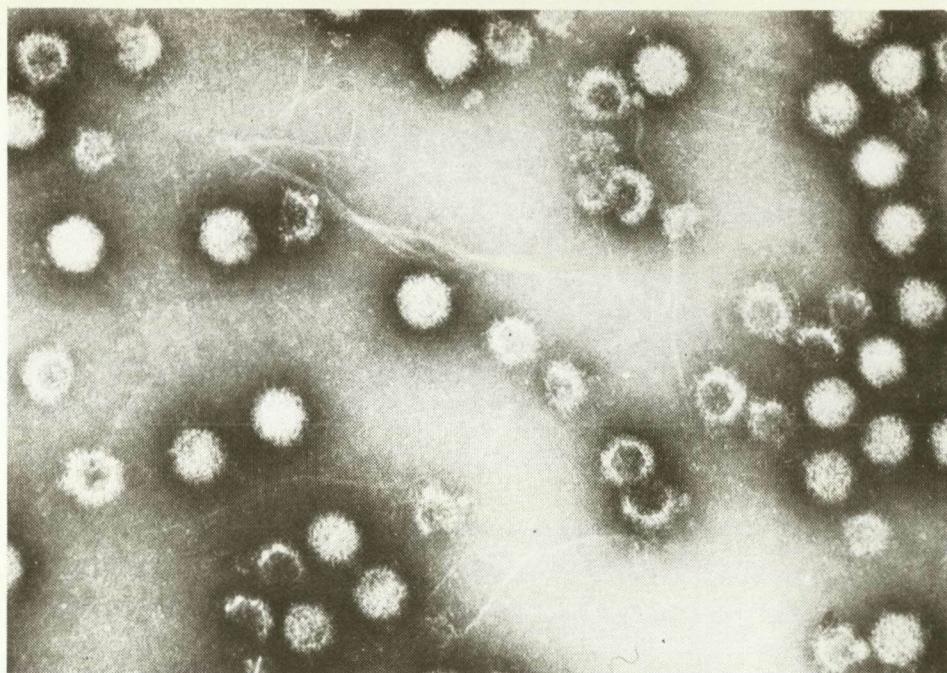


Fig. 5.3.5.4(c) — Die voorkoms van 'n kontrole preparaat van BTV-tipe 4A met negatiewe kleuring in 2 mM Tris gesuspendeer. Vergroting x100 000

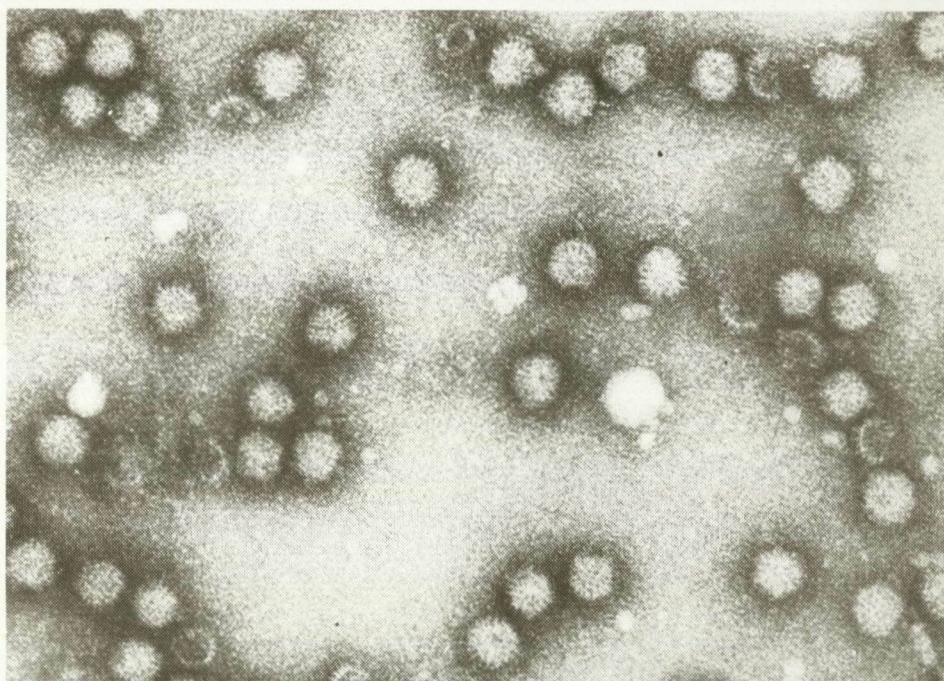


Fig. 5.3.5.4(d) — Dieselfde preparaat as in (c) na behandeling met 'n kontrole serum wat negatief is vir BTV-teenliggame in die neutralisasiereaksie. Vergroting x100 000

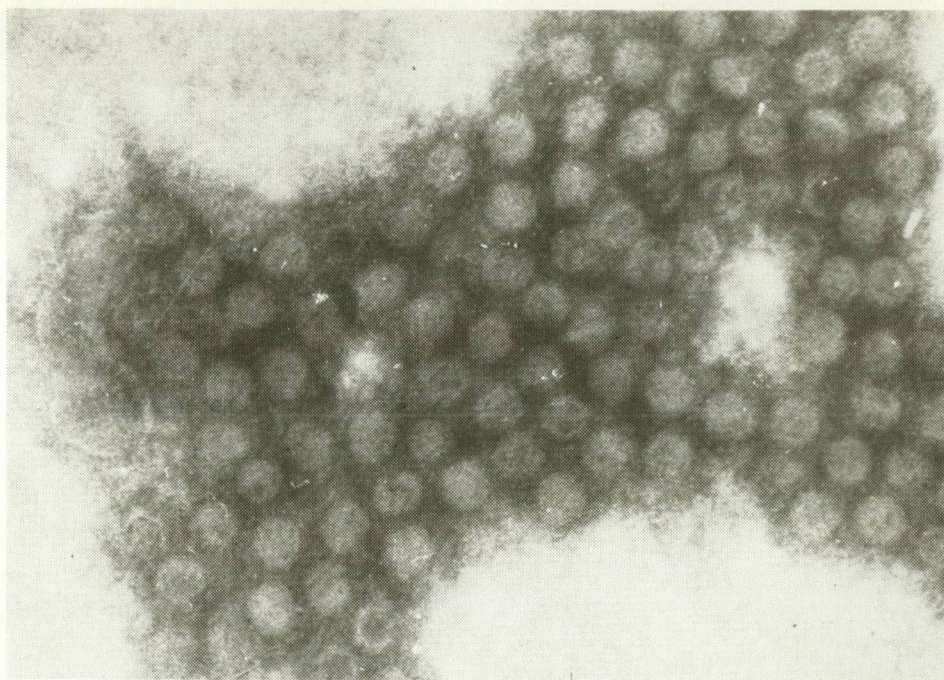


Fig. 5.3.5.4(e) – Dieselfde preparaat virus (BTV-tipe 10A) as wat in figuur (a) en (b) getoon is na behandeling met spesifieke homoloë tipe 10A antiserum. Vergroting x100 000

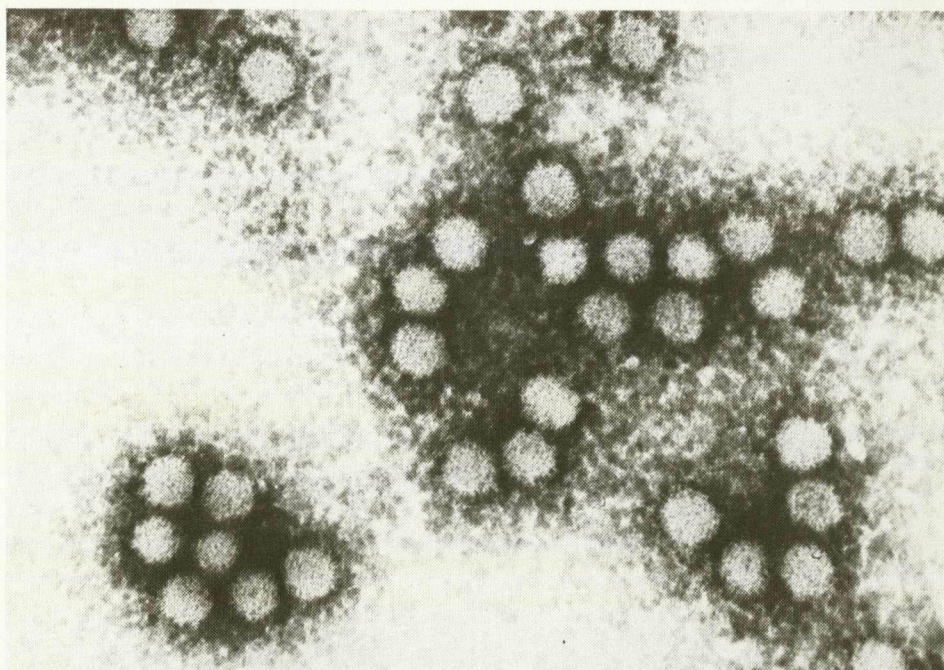


Fig. 5.3.5.4(f) – Dieselfde preparaat virus (BTV-tipe 4A) as in (c) en (d) na behandeling met heteroloë serum teen tipe 10A. Vergroting x100 000

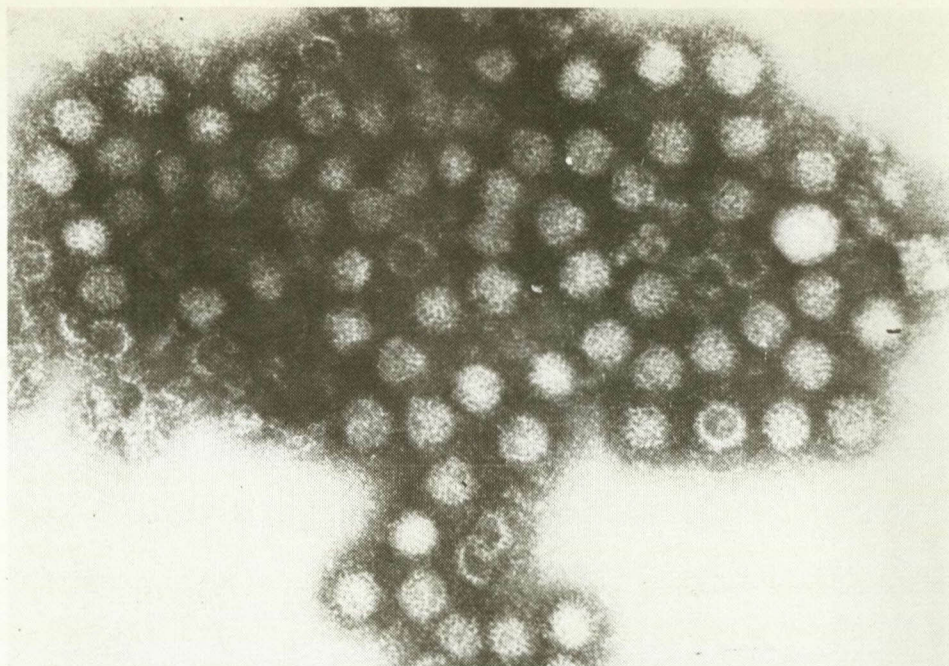


Fig. 5.3.5.4(g) — BTV-tipe 10A virus na behandeling met 'n homoloë anti-BTV-tipe 10A IgG-preparaat. Vergroting x100 000

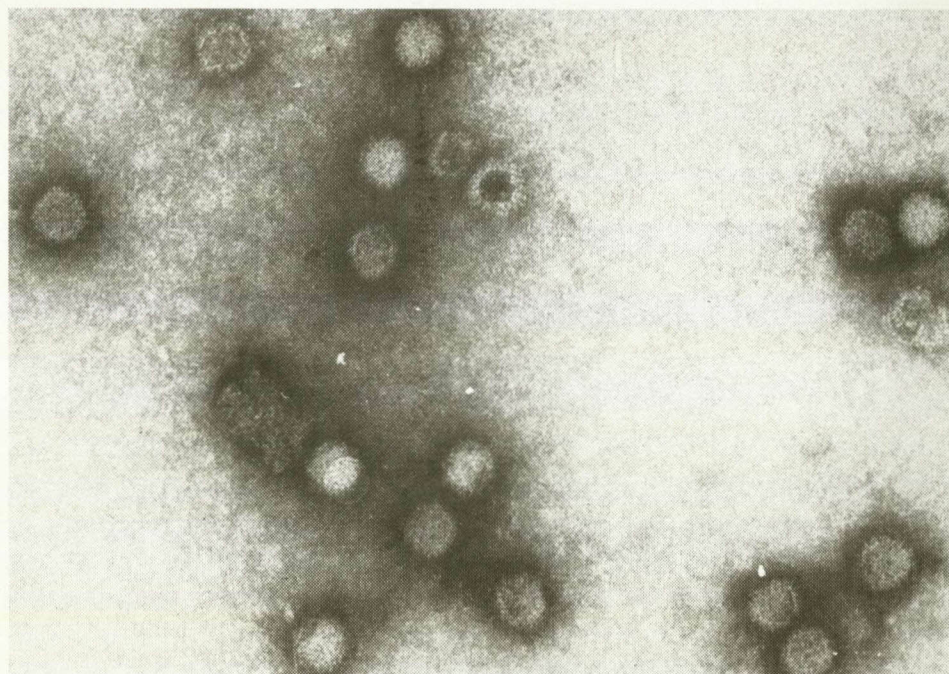


Fig. 5.3.5.4(h) — BTV-tipe 4A virus na behandeling met 'n heteroloë anti-BTV-tipe 10A IgG-preparaat. Vergroting x100 000

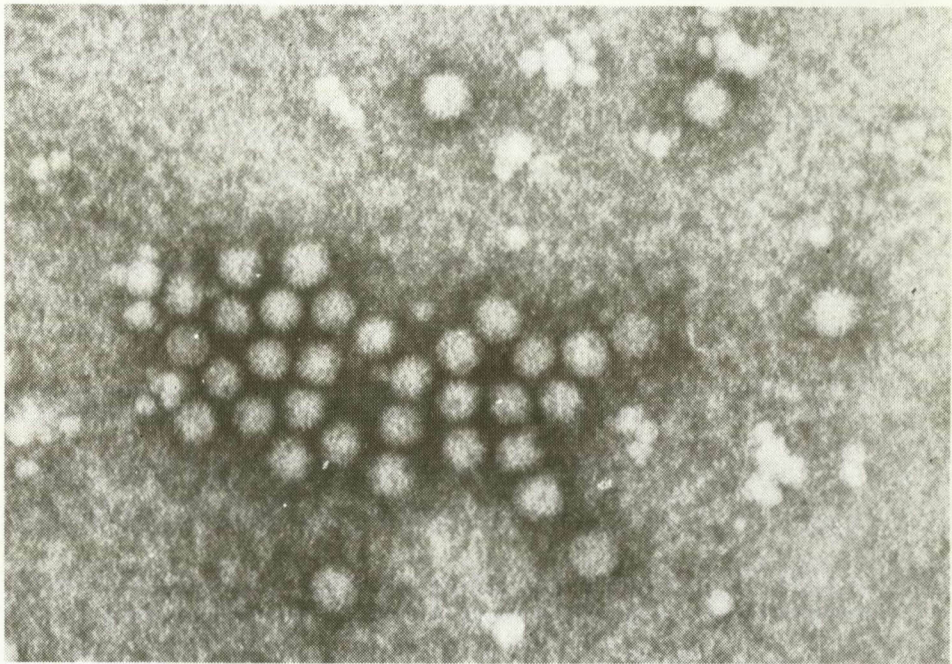


Fig. 5.3.5.4(i) – 'n BTV-tipe 10A preparaat wat behandel is met antiserum wat gekry is 2 dae na BTV stimulasie. Vergroting x100 000

## 5.5 Bespreking

'n Hele aantal aspekte van die immuunreaksie teen BTV is reeds vroeër ondersoek. In hierdie studie is veral gelet op die effek wat verskillende immuniseringsprosedures het op die vlak van die immuunreaksie wat uitgelok word. Die roete van immunisering speel skynbaar nie 'n baie groot rol nie, maar die reaksies in die geval van intraveneuse immunisering is tog hoër as enige ander. Dit is dan verder moontlik om die roetes te klassifiseer volgens die vlak van die reaksie wat verkry word wanneer immunisering deur hul plaasvind. Howell (1969) het gevind dat in skape geen verskil in die doeltreffendheid van polivalente immunisering aangetoon kon word na onderhuidse of binnespieerse inspuiting nie, maar die patroon van viremie het wel verskil.

Die suiwerheid van die virus speel ook skynbaar nie 'n groot rol op die vlak van die immuunreaksie nie. Dit lyk egter tog of die ongesuiwerde virus 'n groter reaksie uitlok, veral as in ag geneem word dat in die vergelyking 'n laer titer ongesuiwerde virus gebruik is. Die gebruik van gesuiwerde virus word egter verkies in eksperimente waar spesifieke antigene en teenliggame ondersoek word om sodoende onderlinge inmenging tussen die antigene te beperk. Gelyktydige inspuiting van 'n groot aantal antigene kan ook 'n groot verskeidenheid teenliggame uitlok wat kruisreaksies kan veroorsaak en die resultate verwar.

Dit lyk asof 'n effense swakker reaksie gekry word wanneer 'n laer titer virus ingespuut word. So 'n verskil sou verwagte wees as die twee titers baie verskil. As die virus egter vermeerder in die proefdier, sou verwag word dat dit egter nie 'n belangrike faktor sal wees nie. Dit moet ook in ag geneem word dat die bepaling nie eksak is nie aangesien 'n redelike groot verskil tussen hierdie eksperimente verkry word.

Die genetiese verskille tussen individue wat deur Howell (1969) in skape gevind is, kon nie in die konyne in die huidige studie aangetoon word nie. Dit is ook te verwagte aangesien die konyne wat gebruik is, tot 'n baie groot mate ingeteel is.

Wat die ondersoek na die kwalitatiewe aspek van die immuunreaksie betref is die resultate in ooreenstemming met die tipiese bifasiese patroon beskryf deur Cowan (1973). IgM speel die belangrikste rol vroeg in die reaksie terwyl IgG later

die belangrikste rol speel. Hoewel die metode wat gebruik is, aangetoon is as die beste metode vir hierdie tipe studies (Jorghani *et al.*, 1973), kom sekere gebreke in die resultate na vore. Die eerste is dat 'n aansienlike verdunning van die serum plaasvind tydens gradient sentrifugering wat die sensitiwiteit van die toetsing verlaag. Verder bemoeilik die verloop van die prosedure steriele werk en die resultate word soms moeilik leesbaar as gevolg van besmetting van die bakkies in die neutralisasie toets.

Die moontlike gebruik van immuunelektronmikroskopie in die studie van die immuunreaksie teen BTV is bevestig. Duidelike aggregasie van virus vind plaas wanneer 'n bepaalde tipe met sy homoloë antiserum geïnkubeer word. Deur 'n kontroleserum ook te toets is die moontlikheid van 'n nie spesifieke aggregasie uitgeskakel. Die aggregasie is skynbaar serotipe spesifiek. Die metode hou baie moontlikhede in aangesien dit 'n baie vinnige en goedkoop metode is om teenliggaam teen BTV te bepaal. Die neutralisasie toets duur 4–5 dae voordat betroubare resultate verkry kan word, terwyl die immuunelektronmikroskopie bepaling, binne 45 minute afgehandel kan word. Dit is dus duidelik dat die moontlike gebruike van immuunelektronmikroskopie ten opsigte van 'n studie van virusantigene soos deur Almeida en Waterson (1969) aangedui ook gebruik in die BTV sisteem het. Om die moontlikheid te ondersoek dat die tegniek teenliggaam kan aantoon in gevalle waar die neutralisasie toets nie kan nie, soos bv. vroeg na toediening van antigeen, het geblyk dat dit nie moontlik is nie.

## HOOFSTUK VI

## OPSOMMING EN SLOTSOM

## 6.1 Opsomming

Die biologiese stabiliteit van die virus wat gedefinieer is as sy vermoë om sy infektiwiteit te behou is onder verskillende toestande bepaal. Die virus is aan 'n bepaalde toestand onderwerp en dan is na verskillende tussenposes bepaal hoeveel infektiwiteit behoue gebly het. Die bepaling verskil van vorige werk veral in die tegniek wat gebruik is en deur die gebruik van onsuiver virus. Dit is gevind dat die virus stabielste in 'n pH gebied van 8-10 is. Die grense vir stabiliteit by verskillende temperature is redelik wyd, nl. van 4C tot 32C. By 37C is die virus egter relatief onstabiel. Molariteite van 2 mM tot 150 mM beïnvloed nie die infektiwiteit van die virus nie, maar by 200 mM tot 1 000 mM word laer titers gemeet, wat dui op moontlike aggregasie.

Die stabiliteit van die virus is belangrik wanneer die invloed van verskillende kontakondisies op die neutralisasie reaksie ondersoek word. Dit is vervolgens gedoen. Meer neutralisasie vind plaas by pH 7,0 as by pH 8 - pH 10. Alhoewel die verskil klein is, bevorder 'n soutkonsentrasie van 150 mM neutralisasie in vergelyking met 10 mM, 50 mM en 100 mM. 'n Vergelyking van die hoeveelheid neutralisasie wat plaasvind by 4C en 28C toon dat temperatuur geen invloed het op die hoeveelheid neutralisasie nie. Neutralisasie het ook ewe vinnig by albei temperature plaasgevind. Deur verskillende kontakondisies te vergelyk is gepoog om die neutralisasie toets meer sensitief te maak. Die neutralisasie toets is belangrik aangesien dit baie algemeen in studies oor die immuunreaksie gebruik word. In hierdie studie oor die immuunreaksie is dit ook meesal gebruik.

Verskillende aspekte van die immuunreaksie is ondersoek. Eerstens is gekyk in watter mate die manier van toediening van antigeen die immuunreaksie wat daarop volg beïnvloed. Dit is gevind dat die roete van toediening die grootte van die reaksie wat daarop volg beïnvloed. 'n Binne-aarse inspuiting het 'n hoër reaksie uitgeloek as 'n onderhuidse inspuiting. Die suiwerheid van die virus skyn nie belangrik te wees ten opsigte van die hoogte van die reaksie wat uitgeloek word nie en ook nie die titer van die inokulum nie.

Dit is verder gevind dat daar min verskil is tussen die reaksie van individuele konyne in hul reaksie teenoor BTV. Konyne en marmotte is ook vergelyk ten opsigte van hul reaksies teen BTV. Dit het geblyk dat hul reaksies van dieselfde grootte orde is.

Ondersoek is ook ingestel na die rolle van IgM en IgG in die immuunreaksie teen BTV. Dit is gevind dat ten opsigte van neutralisasie IgM vroeg in die reaksie die belangrikste rol speel, maar later IgG.

Ten einde teenliggaamaktiwiteit te kan bepaal, anders as deur die virusneutralisasie toets, is 'n tegniek van immuunelektronmikroskopie ontwikkel. Dit is suksesvol op die BTV-teenliggaam sisteem toegepas en daar is gevind dat die reaksie serotipe spesifiek is. Daarna is gepoog om die tegniek te gebruik om teenliggame vroeg na BTV toediening aan te dui, aangesien die neutralisasie toets nie kon nie. Geen teenliggaam aktiwiteit kon egter aangedui word op hierdie wyse nie.

## 6.2 Slotsom

Nuwe inligting aangaande BTV is ingewin. Dit sluit inligting in oor sy stabiliteit onder bepaalde toestande en sy gedrag in die neutralisasie reaksie onder verskillende toestande. Sekere kwalitatiewe en kwantitatiewe aspekte aangaande die immuunreaksie teen BTV is ook ondersoek. Die studie bring meer perspektief in die probleem van polivalente immunisering en bepaalde probleme en moontlike oplossings is aangedui.

**BEDANKINGS**

Ek wil graag die volgende bedank:

Dr. R.A. Oellermann, Prof. P.M. Lategan en Dr. D.W. Verwoerd vir leiding en ondersteuning.

Die direkteur van die Navorsingsinstituut vir Vecartsenykunde, Onderstepoort vir gebruik van die resultate.

Mev. C.H. Bresele vir uitstekende tegniese hulp.

Die personeel van die Afdelings Biochemie en Molekulêre Biologie vir hulp en ondersteuning.

Familie en vriende vir hul belangstelling.

## LITERATUURVERWYSINGS

- ALMEIDA, J.D. en WATERSON, A.P. (1969). The morphology of virus-antibody interaction. *Adv. in virus research.* 15 : 307-338.
- ALEXANDER, R.A. (1947). The propagation of bluetongue virus in the developing chick embryo with particular reference to the temperature of incubation. *Onderstepoort. J. Vet. Sci. Anim. Ind.* 22 : 7-26.
- ALLISON, A.C. (1972). Immunity against viruses. *Sci. Basis. Med. Ann. Rev.* : 49-73.
- AMERICAN Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland, V.S.A., 20852.
- ARNON, R. (1972). Synthetic vaccines - a dream or reality. *Adv. in exp. med. and biol.* 31 : 209-222.
- BEARE, A.S. (1975). Live viruses for immunization against influenza. *Progr. Med. Virol.* 20 : 49-83.
- BECKMAN Instruments (Eiendoms) Beperk, Posbus 8468, Johannesburg.
- BELLANTI, J.A., RUSS, S.B., HOLMES, G.E. en BUESCHER, E.L. (1965). The nature of antibodies following experimental arbovirus infection in guinea pigs. *J. Immunol.* 94 : 1-11.
- BENACERRAF, B., OVARY, Z., BLOCH, K.J. en FRANKLIN, E.C. (1963). *J. Exp. Med.* 117 : 937-949.
- BLANK, S.E., LESLIE, G.A. en CLEM, L.W. (1972). Antibody affinity and valence in viral neutralization. *J. Immunol.* 108 : 665-673.
- BLOCH, K.J., KOURILSKY, F.M., OVARY, Z. en BENACERRAF, B. (1963). Properties of guinea pig 75 antibodies. III. Identification of antibodies involved in complement fixation and hemolysis. *J. Exp. Med.* 117 : 965-981.
- BREINDL, M. (1974): VP<sub>4</sub> The D-Reactive part of poliovirus. *Virology* 46 : 962-964.
- BROWN, A. en OFFICER, J.E. (1975). An attenuated variant of eastern encephalitis virus : Biological properties and protection induced in mice. *Arch. of Virol* 47 : 123-138.
- BROWN, F. en SMALE, C.J. (1970). Demonstration of three specific sites on the surface of foot and mouth disease virus by antibody complexing. *J. Gen. Virol* 17 : 115-127.
- BURROUGHS, J.N., ROWLANDS, D.J., SANGER, D.V., RALBOT, P. en BROWN, F. (1971). Further evidence for multiple proteins in the Foot and Mouth disease virus particle. *J. Gen. Virol.* 13 : 73-84.
- CABASSO, U.T., ROBERTS, G.I., DOUGLAS, J.M., ZARZI, R., STEBBINS, M.R. en COX, H.R. (1955). Bluetongue : 1. Propagation of bluetongue virus of sheep in suckling hamsters. *Proc. Soc. Exp. Biol. (N.Y.).* 88 : 678-681.

CAPPEL Laboratories, Downington PA 19335, V.S.A.

COMPANS, R.W., KLENK, H. CALIGUJIRI, L.A. en CHOPPIN, P.W. (1970).

I. Influenza virus proteins. Analysis of polypeptides of the virion and identification of spike glyco-proteins. *Virology* 42 : 880-889.

COWAN, K.M. (1973). Antibody response to viral antigens. *Adv. in immunology* 17 : 195-253.

COWAN, K.M. en TRAUTMAN, R. (1965). Antibodies produced by guinea pigs infected with foot and mouth disease antigen. *J. Immunol.* 92 : 501-506.

DARNELL, J.E. en SAWYER, T.K. (1960). The basis for variation in susceptibility to poliovirus in He La cells. *Virology* 11 : 665-675.

DAVENPORT, F.M., ROTT, R. en SCHEFER, W. (1960). Physical and biological properties of influenza virus components after ether treatment. *J. Exp. Med.* 112 : 765-782.

DAVIS, B.D., DULBECCO, R., EISEN, H.N., GINSBERG, H.S. en WOOD, W.B. (1967). Principles of Microbiology and immunology. Harper and Row, London.

DALES, S. en KAJIOKA, R. (1964). The cycle of multiplication of vaccinia virus in Earle's strain h cells. I. Uptake and penetration. *Virology* 24 : 278-294.

DE VILLIERS, E.M. (1974a). Karakterisering van die polipeptiede van serologies verskillende tipes van bloutongvirus. M.Sc.-tesis in die fakulteit Wis- en Natuurkunde, Universiteit, Pretoria.

DE VILLIERS, ETHEL-MICHELE (1974b). Comparison of the capsid polypeptides of various bluetongue virus serotypes. *Intervirology*. 3 : 47-53.

DUESBERG, P.H. (1968). The RNA's of influenza virus. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* 59 : 930-937.

DULBECCO, R. (1952). Production of plaques in monolayer tissue cultures by single particles of an animal virus. *Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.* 38 : 747-752.

DULBECCO, R., VOGT, M. en STRICKLAND, A.G.R. (1956). A study of the basic aspects of neutralization of two animal viruses, Western equine encephalitis virus and poliomyelitis virus. *Virology*. 2 : 162-205.

DU TOIT, P.J. (1929). The nature and duration of the immunity against blue-tongue in sheep. 15th Anm. Rep. Dir. Vet. Services. Union of S. Africa : 69-78.

ELS, H.J. en VERWOERD, D.W. (1969). Morphology of bluetongue virus. *Virology*. 38 : 213-219.

- FAZEKAS DE ST. GROTH, S. (1962). The neutralization of virus. *Adv. Virus. Res.* 9 : 1-125.
- FINKELSTEIN, M.S. en UHR, J.W. (1966). The avidity of  $\gamma$ M and  $\gamma$ G guinea pig antibodies to bacteriophage  $\phi$  x 174. *J. immunol.* 97 : 565-576.
- FENNER, F. (1968). The biology of animal viruses. Molecular and cellular biology, vol. 1. (Academic Press, N.Y.).
- FENNER, F. (1972a). Viruses and the immune response. *Adv. in Exp. Med. and Biol.* 31 : 7-17.
- FENNER, F. (1972b). The possible use of temperature sensitive conditional lethal mutants for immunization in viral infections. *Adv. in Exp. Med. and Biol.* 31 : 131-143.
- FINE, D.L., ALLEN, W.P. en WILKENS, L.B. (1974). Features of cross protection between Sindbis and Venezuelan equine encephalitis virus in mice - relationship of route of immunization to protection. *J. Gen. Virol.* 24 : 401-408.
- FORGHANI, B., SCHMIDT, N.J. en LENNETTE, E.H. (1973). Demonstration of Rubella IgM antibody by indirect fluorescent antibody staining, sucrose density gradient centrifugation and mercapto-ethanol reduction. *Intervirology.* 1 : 48-59.
- FREEMAN, M.J. en STAVITSKY, A.B. (1965). Radio-immunoelectrophoretic study of rabbit anti-protein antibodies during the primary response. *J. Immunol.* 95 : 981-990.
- GANGULY, R. en WALDMAN, R.H. (1974). Rubella virus immunization of preschool children via respiratory tract. *Ann. J. Dis. Child.* 128 : 821-823.
- GARDNER, I., BROWN, N.A., BLANDEN, R.V. (1974). Cell mediated ectromelia virus infected target cells. I. Specificity and kinetics. *Eur. J. Immunol.* 4/2 : 63-67.
- GOLDBLUM, N. RAVID, R., HANOCH AMALIA en PORATH JOEL (1972). Structural and immunological characteristics of subviral components of Sindbis, Eastern equine and western equine encephalitis viruses. *Adv. exp. med. and biol.* 31 : 71-85.
- GOLDSMITH, L. en BARZILAI, E. (1965). Isolation and propagation of a bluetongue virus strain in embryonating chicken eggs by the intravenous route of inoculation-preliminary report. *Refuah. Vet.* 22 : 285-279.

- GRAVES, J.H., COWAN, K.M. en TRAUTMAN, R. (1964). Characterization of antibodies produced by guinea pigs inoculated with inactivated foot-and-mouth disease antigen. *J. immunol.* 92 : 501-506.
- HAIG, D.A., McKERCHER, D.G. en ALEXANDER, R.A. (1956). The cytopathogenic action of bluetongue virus on tissue cultures and its application to the detection of antibodies in the serum of sheep. Onderstepoort. *J. Vet. Res.* 27 : 171-177.
- HAIMOVICH, J. en SELA, M. (1969). Inactivation of bacteriophage T<sub>4</sub>, of poly-D-alanyl bacteriophage and of penicilloye bacteriophage by immuno specifically isolated IgM and IgG antibodies. *J. Immunol.* 103 : 45-55.
- HERBERT, G.A., PELHAM, P.L. en PITTMAN, B. (1973). Determination of the optimal ammonium sulphate concentration for the fractionation of rabbit, sheep, horse and goat antisera. *Appl. Microbiol.* 25 : 26-36.
- HILLEMANN, R.M. (1972). Respectives in the control of virol diseases including cancer. *Adv. in exp. med and biol.* 31 : 167-178.
- HOWELL, P.G. (1960). A preliminary antigenic classification of strains of bluetongue virus. Onderstepoort. *J. Vet. Res.* 28 : 357-363.
- HOWELL, P.G. (1969). The antigenic classification of strains of bluetongue virus, their significance and use of prophylactic immunization. DVSc Thesis : Faculty of veterinary science, University of Pretoria.
- HOWELL, P.G., VERWOERD, D.W. en OELLERMANN, R.A. (1967). Plaque formation by bluetongue virus. Onderstepoort. *J. Vet. Res.* 34 : 317-332.
- HOWELL, P.G. en VERWOERD, D.W. (1971). Bluetongue Virus. Virology monographs 9 : 35-74.
- HOWELL, P.G., VERWOERD, D.W. en OELLERMANN, R.A. (1967). Plaque formation by bluetongue virus. Onderstepoort. *J. Vet. Res.* 34 : 317-332.
- HUISMANS, H. (1970). Macromolecular synthesis in bluetongue virus infected cells. I. Virus specific ribonucleic acid synthesis. Onderstepoort. *J. Vet. Res.* 37 : 191-198.
- HUISMANS, H. en HOWELL, P.G. (1973). Molecular hybridization studies on the relationship between different serotypes of bluetongue virus and on the difference between the virulent and attenuated strains of the same serotype. Onderstepoort. *J. Vet. Res.* 40 : 93-104.

- HUMMELER, K., ANDERSON, T.F. en BROWN, R.A. (1962). Identification of poliovirus particles of different antigenicity of specific agglutination as seen in the electron microscope. *Virology* 16 : 84-90.
- JOCHIM, M.M., LUEDKE, A.J. en BOWNE, J.G. (1965). The clinical and immunogenic response of sheep to oval and intradermal administrations of bluetongue virus. *Amer. J. Vet. Res.* 26 : 1254-1260.
- JONES, R.H. en FOSTER, N.M. (1974). Oval infection of *Culicoides vaiipennis* with bluetongue virus development of susceptible and resistant lines from a colony population. *J. med. Entomol.* 11 : 316-323.
- KERBEL, R.S. en DAVIS, A.J.S. (1974). The possible biological significance of Fc receptors on mammalian lymphocytes and tumor cells. *Cell* 3 : 105-112.
- KIPPS, A. (1958). A study of the soluble antigen of the bluetongue viruses. Unversity of Cape Town (Thesis).
- KLONTZ, E.W., SVEHAG, S.E., GORHAM, J.R. (1962). A study by the agar diffusion technique of precipitating antibody directed against bluetongue virus and its relation to homotypic neutralizing antibody. *Arch. ges. Virusforsch.* 12 : 259-268.
- KNIGHT, C.A. (1944). A sedimentable component of allantoic fluid and its relationship to influenza viruses. *J. Exp. Med.* 80 : 83-100.
- KOSZINOWSKI, U. en BANDLOW, G. (1975). Induction and *in vitro* demonstration of cellular immunity to DNA and RNA viruses in guinea pigs. *Clin. exp. immunology.* 20 : 143-154.
- LAVER, W.G. en VALENTINE, R.G. (1969). Morphology of the isolated hemagglutinin and neuramimidase subunits of influenza virus. *Virology* 38 : 105-119.
- LEONARD, L.L., SCHMIDT, N.J. en LENNETTE, E.H. (1970). Demonstration of viral antibody activity in two immunoglobulin G subclasses in patients with varicella-zoster virus infection. *J. immunol.* 104 : 23-27.
- LOENING, N.E. (1967). The fractionation of high molecular-weight ribonucleic acid by polyacrylamide gel-electrophoresis. *Biochem. J.* 102 : 251-259.
- MACARIO, A.J.C. en DE MACARIO, E.C. (1975). Sequential changes and persistence of antibody molecules during the immune response with special reference to the binding properties of the antigen combining site. *Immunochemistry* 12 : 249-262.
- MANDEL, B. (1967a). The interaction of neutralized poliovirus with He ha cells. I. Adsorption. *Virology.* 31 : 238-247.

- MANDEL, B. (1967b). The interaction of neutralized poliovirus with HeLa cells.  
II. Elution penetration, uncoating. *Virology*. 31 : 248-259.
- MAUTNER, V. en WILLCOX, H.N.A. (1974). Adenovirus antigens. A model system  
in mice for subunit vaccination. *J. Gen. Virol.* 25 : 325-336.
- McKERCHER, D.G., McGOWAN, B. en SAITO, J.K. (1954). Studies on bluetongue.  
I. Isolation, identification and typing of the bluetongue virus and a preliminary report  
on the serodiagnosis of the disease. *Proc. Book Amer. Vet. Med. Ass.* 91 : 167-177.
- McLAREN, L.C., HOLLAND, J.J. en SYVERTON, J.J. (1959). The mammalian cell-  
virus relationship. I. Attachment of poliovirus to cultivated cells of primate  
and non-primate origin. *J. Exp. Med.* 109 : 475-485.
- McPHERSON, I. en STOKER, M.P.G. (1962). Polyoma transformation of hamster cell  
clones - an investigation of genetic factors affecting cell competence. *Virology*.  
16 : 147-151.
- MERCK Chemicals, E. Merck, Darmstad, Duitsland.
- MILES Laboratories, Posbus 141, Goodwood, Kaapstad.
- MOZES, E., SHEARER, G.M. en SELA, M. (1972). Genetic control and immunity.  
*Adv. in exp. med. and biol.* 31 : 145-165.
- MOZES, L.W., HAVELL, E.A., GRADOVILLE, M.C. en VILCET, J. (1974). Increased inter-  
feron production in human cells irradiated with ultraviolet light. *Inf. & immunity* 10 :  
1189-1191.
- NEITZ, W.O. (1948). Immunological studies on bluetongue in sheep. Onderstepoort  
*J. Vet. Sci. Anim. Ind.* 23 : 93-136.
- NEURATH, A.R. en RUBIN, B.A. (1971). Viral structural components as immunogens  
prophylactic value. *Monographs in Virology* 4 : 1-87.
- NORRBY, E., SALMI, A.A., VANDVIK, B., HAMMARSKJOLD, B., PANELIUS, M.  
(1972). The antibody response to different measles virus antigens under various  
conditions of immunization. *Adv. in exp. med. and biol.* 31 : 49-69.
- OELLERMANN, R.A., Afdeling Biochemie, Navorsingsinstituut vir Veeartsenykunde,  
Onderstepoort, 0110.
- OLDSTONE, M.B.A. (1975). Virus neutralization and virus induced immune complex  
disease. *Progr. med. Virol.* 19 : 84-119.
- OLSON, L.C., SITHISARN, P. en DJINAVI, N.K. (1975). Role of macrophages in  
Wesselsbron en Germiston virus infections of mice. *J. inf. dis.* 131 : 119-128.
- OSLER, A.G., MULLIGAN, J.J. en RODRIQUEZ, E. (1966). Weight estimates of rabbit  
anti-human serum-albumin based on antigen-binding and precipitin analysis : specific  
hemagglutinating activities of 75 and 195 components. *J. Immunol.* 96 : 334-352.

- OVARY, Z., BENACERRAF, B. en BLOCH, K.J. (1963). Properties of guinea pig 75 antibodies. II Identification of antibodies involved in passive cutaneous and systemic anaphylaxis. *J. Exp. Med.* 117 : 951-964.
- OWEN, N.C. (1964). Investigation into the pH stability of bluetongue virus and its survival in mutton and beef. Onderstepoort. *J. Vet. Res.* 31 : 109-118.
- PERREIRA, H.G. (1972). Vaccination with purified viral proteins. *Adv. in exp. med. and biol.* 31 : 207-208.
- PHARMACIA Fine Chemicals, Uppsala, Sweden.
- PHILIPSON, L. en PETERSON, U. (1973). Structure and function of virion proteins of adenovirus. *Progr. in tumor research.* 18 : 1-55.
- POUS, M.W. en HIRST, G.K. (1968). Polyacrylamide gel electrophoresis of influenza virus RNA. *Virology* 34 : 385-390.
- ROTT, R., BECHT, H. en MICHAËLA ORLICH (1974). The significance of Influenza virus neuramidase immunity. *J. Gen. Virol.* 22 : 35-41.
- RUBIN, B.A. en TINT, H. (1975). The development and use of vaccines based on studies of virus substructures. *Progr. med. Virol.* 21 : 144-157.
- SCHMIDT, N.J., LENLETTE, E.H. en DENNIS, J. (1968). Characterization of antibodies produced in neutral and experimental coxsackie virus infections. *J. Immunol.* 100 : 99-106.
- SCHULMAN, J.L., KHAKPOUR, M. en KILBOURINE, E.D. (1968). Protective effects of specific immunity to viral neuramidase on influenza virus. *J. Virol.* 2 : 778-786.
- SCHULZE, I.T. (1970). The structure of Influenza virus. I. The polypeptides of the virion. *Virology.* 42 : 890-904.
- SCHULZE, I.T. (1972). The structure of Influenza virus. II. A model based on the morphology and composition of subviral particles. *Virology.* 47 : 181-196.
- SCHWARTZ, D.P., BUCKLEY, R.H. (1971). Serum IgE concentration and skin reactivity to anti-IgE antibody in IgA-deficient patients. *New. Engl. J. Med.* 284 : 513-517.
- SELGRADE, M.K., OSBORN, J.E. (1974). Role of macrophages in resistance to murine cytomegalovirus. *Inf. and Immunity.* 10 : 1383-1390.
- SHIPHAM, S.O. (1973). Studies on the *in vitro* synthesis of bluetongue virus. M.Sc. Thesis, Faculty of Science, University of Pretoria.
- SIGMA, 3500 de Kalbstraat, St. Louis, Missouri, V.S.A.
- SILVERSTEIN, S. (1970). Macrophages and viral immunity. *Sem. Hemat.* 7 : 185-214.

- SPREULL, J. (1905). Malarial catarrhal fever (Bluetongue) of sheep in South Africa. *J. Comp. Path. Therap.* 18 : 321-337.
- STOHMAIER, K. en ADAM, K.H. (1974). Comparative Electrophoretic studies of foot-and-mouth disease virus proteins. *J. Gen. Virol.* 22 : 105-114.
- STURMAN, L.S. en TAMM, I. (1969). Formation of viral ribonucleic acid and virus in cells that are permissive or nonpermissive for murine encephalomyelitis virus. (G.D. VII). *J. Virol.* 3 : 8-16.
- SUMMERS, D.F., MAIZEL, J.V. en DARNELL, J.E., (1965). Evidence for non capsid proteins in poliovirus-infected HeLa cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 54 : 505-513.
- SVEHAG, S.E. (1963a). Effect of different "Contact conditions" on bluetongue virus antibody reaction and on the validity of the "Percentage Law". *Arch. Ges. Virusforsch.* 12 : 678-693.
- SVEHAG, S.E. (1963b). Thermal inactivation of Bluetongue virus. *Arch. Ges. Virusforsch.* 13 : 499-510.
- SVEHAG, S.E. (1964). The formation and properties of poliovirus neutralizing antibody. III. Sequential changes in electrophoretic mobility of 19S and 7S antibodies synthesized by rabbits after a single virus injection. *J. Exp. Med.* 119 : 225-240.
- SVEHAG, S.E. (1966). Quantal and graded dose-responses of bluetongue virus : a comparison of their sensitivity as assay methods for neutralizing antibody. *J. Hyg. Camb.* 64 : 231-244.
- SVEHAG, S.E. (1968). Formation and dissociation of virus antibody complexes with special reference to the neutralization process. *Progr. Med. Virol.* 10 : 1-63.
- SVEHAG, S.E., LEENDERSTEN, L., GORHAM, J.R. (1966). Sensitivity of bluetongue virus to lipid solvents, trypsin and pH changes and its serological relationship to arbo viruses. *J. Hyg. (Lond.)* 64 : 339-346.
- TAYLOR, J.M., HAMPSON, A.W. en WHITE, D.O. (1969). The polypeptides of Influenza virus. I. Cytoplasmic synthesis and nuclear accumulation. *Virology.* 39 : 419-425.
- THEILER, A. (1906). Bluetongue in Sheep. Ann. Rep. Dir. Agric. Transvaal for 1904-5: 110-121.

- THEILER, A. (1908). The inoculation of sheep against bluetongue and the results in practice. *Vet. J.* 64 : 600-607.
- TOKUMURU, T. (1967). The protective effective of different immunoglobulins against Herpetic Encephalitis and skin infections in Guinea Pigs. *Arch. Ges. Virusforsch.* 22 : 332-348.
- WALDMAN, R.H., GADOL, N., JURGENSEN, P.F., OLSEN, G.N. en JOHNSON, J.E. (1972). Secretary and systemic cell mediated and humoral response in humans and guinea pigs to the inactivated influenza virus vaccine. *Adv. Exp. Med. and Biol.* 31 : 87-95.
- WALL, R. en TAYLOR, M.W. (1970). Mengovirus RNA synthesis in productive and restrictive cell lines. *Virology.* 42 : 78-86.
- VOGEL, A.I. (1953). A text book of quantitative inorganic analysis. Second edition. Longmans, Green and Co., London, New York en Toronto.
- VERWOERD, D.W. (1969). Purification and characterization of bluetongue virus. *Virology.* 38 : 203-212.
- VERWOERD, D.W. (1969). Die biochemiese karakterisering van die bloutongvirus. D.V.Sc. tesis : Fakulteit van Veeartsenykunde, Pretoria.
- VERWOERD, D.W., ELS, H.J., DE VILLIERS, E., HUISMANS, H. (1972). Structure of the bluetongue virus capsid. *J. Virol.* 10 : 783-794.
- VERWOERD, D.W. en HUISMANS, H. (1972). Studies on the *in vitro* and the *in vivo* transcription of the bluetongue virus genome. *Onderstepoort. J. Vet. Res.* 39(4) : 185-192.
- WEBSTER, R.G., LAVER, W.G. en KILLBOURNE, E.D. (1968a). Reactions of antibodies with surface antigens of influenza virus. *J. Gen. Virol.* 3 : 315-326.
- WEBSTER, R.G. (1968b). The immune response to influenza virus. III Changes in the avidity and specificity of early IgM and IgG antibodies. *Immunology.* 14 : 39-52.
- WEBSTER, R.G. en DARLINGTON, R.G. (1969). Disruption of myxoviruses with Tween 20 and isolation of biologically active hemagglutimin and venraminidase subunits. *J. Virol.* 4 : 182-187.
- WHIPPLE, H.E. (Ed. (1964). Gel electrophoresis. *Annals. N.Y. Acad. Sci.* 121 : 305-650.
- WILLIAMS, C.A., CHASE, M.W. (1967a). Methods in immunology and immunology chemistry Vol. I.
- WILLIAMS, C.A. en CHASE, M.W. (1967b). Methods in immunology and immunology chemistry Vol. II.

