



Bio Services
www.bio-services.nl



de specialist
in
animal bedding



Eén adres voor kwaliteit, continuïteit en service



Bio Services
www.bio-services.nl

Postbus 29 5400 AA Uden
T +31 (0) 413 20 50 30 F +31 (0) 413 20 50 39
E info@bio-services.nl



Afbeelding 5
Konijn op 20 plaatsen i.d. geïmmuniseerd, vijf dagen na
immunisatie

Zijn de immunisatieprocedures bij konijnen in het CDL te verfijnen?

F.G.J. Poelma*, M.M. Zbinden, T. van der Donk

Centraal Dierenlaboratorium, UMC St Radboud, Radboud Universiteit Nijmegen

*correspondentieadres: f.g.j.poelma@uu.nl

Inleiding

Het doel van dit onderzoek was om de huidige (in 2004) immunisatieprocedures voor de productie van polyclonaal konijnenserum binnen het Centraal Dierenlaboratorium (CDL) te verfijnen. Uitgangspunt bij dit onderzoek was de Code of Practice voor het immuniseren van proefdieren (1). Dit is een richtlijn die bedoeld is de pijn en het ongerief veroorzaakt door de procedures (o.a. injecties) te beperken en tegelijkertijd wel een hoge titer aan antistoffen te krijgen.

In het CDL worden voor de productie van polyclonale antistoffen immunisaties gedaan die niet volledig de Code volgen. Dit wordt gedaan op grond van de ervaring dat de procedures de hoogste titers opleveren en onze indruk dat het ongerief als gevolg van meerdere intradermale toedieningen (o.a. met Freund Compleet Adjuvans [FCA]) beperkt is.

Dit vergelijkend onderzoek was er op gericht om de immunisatieprocedures verder te verfijnen en de onderzoeker een hulpmiddel te geven om een methode te kiezen die én de hoogste titer én het minste ongerief voor het dier oplevert.

Materiaal en methoden

Dit onderzoek was als volgt opgezet:

- Per antigeen en per immunisatieprocedure zijn twee konijnen ingezet. Dit is de gangbare procedure die is gebaseerd op benodigde hoeveelheid antistoffen en ter ondervanging van het risico van een konijn dat geen antistoffen produceert.
- Er werden bij lopende immunisatieprocedures extra konijnen ingezet om verschillende immunisatieprocedures te vergelijken. Ongeacht de uitkomst van dit onderzoek kwam de opbrengst in de vorm van sera met antistoffen ten goede aan het lopend onderzoek.

- Met elk van vier antigenen, die verschillen in immunogeniteit, werden twee immunisatieprocedures vergeleken (Tabel 1) die verschillen in het aantal injectieplaatsen (20 versus 4) bij de primaire immunisatie met FCA en in de route van toediening van de antigeen-FCA emulsie, namelijk subcutaan (s.c.) of intradermaal (i.d.). Bij het zeer zwak immunogene eiwit kallikreïne-13 werd het antigeen direct in de popliteale lymfeklier (in de knieholte) toegediend.
- Tijdens de proef werd het ongerief van de konijnen dagelijks gescoord op basis van het lichaamsgewicht en de voer- en wateropname; ook werd periodiek het gedrag van de konijnen geobserveerd.



Vari-stellingen



Compleet gamma aan
Macrodon kooien,
konijnenhuisvesting,
huisvesting grote dieren,
maatwerk en toebehoren.



Individueel geventileerde
kooien I.V.C. micro-as



Top Flow tweezijdig
kooiverschoningsstations
in hoogte verstelbaar

Eén adres voor kwaliteit, continuïteit en service



- De antistoftiters werden bepaald met behulp van immunoassays zoals met de enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

De resultaten (antistoftiters versus ongerief) van de verschillende immunisatieprocedures zijn geëvalueerd en die leidden tot een keuze van de immunisatieprocedure die voor het antigeen standaard zal worden toegepast.

Dieren

Het witte Nieuw Zeelander-konijn (NZW) wordt veel gebruikt voor het opwekken van polyclonale antistoffen en is dan ook hier gekozen. Per antigeen en per immunisatieprocedure werden twee vrouwelijke konijnen gebruikt (conventioneel, 2,5–3,0 kg, temperatuur/relatieve vochtigheid dierverblijf: 21°C / 55%).

Antigenen

Immunisaties zijn uitgevoerd met vier antigenen:

- 1 glyfosfaat gekoppeld aan bovine serum albumine (BSA);
- 2 dystroglycan (muis) gekoppeld aan Keyhole Lymphet Hemocyanin (KLH);
- 3 een recombinant humaan kallikreïne-13 eiwit (hK13) en
- 4 het HIV kern eiwit HIV-p24.

BSA en KLH zijn eiwitten die een sterke immuunrespons opwekken in NZW-konijnen en er voor zorgen dat de immuunrespons tegen het gekoppelde molecuul versterkt wordt. BSA heeft een moleculaire massa van ongeveer 67 kDa en KLH van >200 kDa.

Glyfosfaat is een veel toegepast herbicide (o.a. relevant in verband met genetisch gemodificeerde gewassen).

Dystroglycan is een extracellulair glycoproteïne dat een rol speelt in het binden van verschillende extracellulaire matrix-moleculen. De aminozuurvolgorde van dystroglycan is binnen het dierenrijk sterk geconserveerd, met andere woorden, de moleculen lijken zeer sterk op elkaar: hierdoor worden ze niet goed als lichaamsvreemd herkend en is de productie van antilichamen moeilijk.

Kallikreïne-13 is een serineprotease met een

moleculaire massa van ongeveer 28 kDa. Het eiwit komt tot expressie in endocriene weefsels. Humaan kallikreïne-13 lijkt zeer sterk op het konijnen kallikreïne-13 en is daarom niet sterk immunogeen.

HIV-p24 is een HIV-kerneiwit van ongeveer 26 kDa. Aantonen van het p24 antigeen wordt gebruikt als diagnose voor besmetting met het HIV. Een recombinant p24 eiwit is gebruikt om polykloonaal anti-p24 serum te verkrijgen.

Immunisatieprocedures

De Code of Practice (1) schrijft voor de primaire immunisatie en de boosters subcutaan te injecteren, om het aantal injecties te beperken tot vier zolang de volumina niet te groot worden (tot 0,5 ml) en deze bij voorkeur op de rug van het dier te geven.

Bij de tot voor kort toegepaste immunisaties in het CDL werd antigeen bij primaire immunisatie via de intradermale (i.d.) route, verdeeld over zoveel mogelijk locaties (meestal 20) op de rug van het konijn gegeven. De boosters werden s.c. gegeven op dag 21, 49 en 70 na primaire immunisatie. De immunisatieprocedures in dit onderzoek staan in Tabel 1.

Bij immunisatie met hK13 werd het antigeen ook direct in de popliteale lymfeklier toegediend. Bij de dieren werd 1-2 uur voor de inspuiting subcutaan de kleurstof Evans blue (1%) toegediend en werd onder volledige O₂/N₂O/isofluraan-anesthesie een incisie gemaakt net proximaal van de hak. Daarna werd de popliteale lymfeklier vrij geprepareerd (deze is zichtbaar door opname van de kleurstof) en werd 50-100µl van het antigeen/FCA-mengsel ingespoten. Vervolgens werd de huid gesloten met los geknoopte 2-0 Vicryl hechtingen.

Kwantificering immuunrespons (titerbepaling)

De hoeveelheid antistoffen na immunisatie is in de meeste sera gemeten met ELISA's.

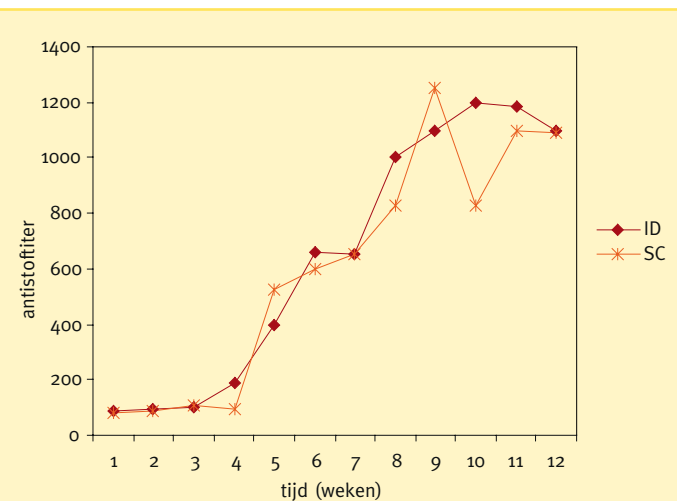
Na immunisatie met glyfosfaat-BSA werd er geen specifieke reactie waargenomen tegen glyfosfaat. Daarom is de antistoftiter tegen BSA gemeten.

Er zijn verschillende methoden gebruikt om de titers te bepalen. Een veel gebruikte methode is het

Tabel 1. Immunisatieprocedures

	procedure volgens CDL Nijmegen	procedure volgens Code of Practice	extra
route	i.d.	s.c./i.d.	in popliteale lymfeklier
plaats	rug	rug	proximaal van de hak
aantal injecties bij primaire immunisatie	20	1-4	1
aantal boosters	3-4	1-3*	3-4
tijdstip 1 ^e booster / periode tussen boosters	3 weken na primaire immunisatie / 2-3 weken	? *	3 weken na primaire immunisatie / 2-3 weken
volume per injectie	50 µl	250 µl / 50 µl	100 µl

* In de eerste versie van de Code (1993) werd nog geadviseerd om een booster te geven vier weken na de primaire immunisatie; dit wordt in de tweede versie van de Code niet meer vermeld. Het aantal boosters wordt bepaald op basis van de titer gevormde antistoffen.



Afbeelding 1
Antistof titer (ELASA extinctie) tegen HIV-p24 na i.d. en s.c. immunisatie

bepalen van de serumverduunning waarbij de extinctie nog maar de helft is van het maximale bereik: OD50%. Deze methode is gebruikt voor het kwantificeren van antistoffen tegen dystroglycan en BSA. Om antistoffen tegen het p24 antigeen te kwantificeren werd de OD bepaald bij een vaste verduunning.

De antistoftiters tegen kallikreïne-13 werden bepaald met behulp van een immunoprecipitatie waarbij het kallikreïne-13 gelabeld was met het radioactieve jodium (I 125).

Kwantificering ongerief

Het ongerief is geschat op basis van de voer- en wateropname, het lichaamsgewicht, de ernst van de ontstekingsreactie en op gedragsobservaties. Alle metingen en observaties werden dagelijks per konijn

Tabel 2. Ongerijscores voor ontstekingen bij immunisaties

De scores van de verschillende aspecten worden opgeteld en de totaalscore geeft een indruk van de ernst van de ontstekingsreactie.

aantal bevindingen	score
geen	0
tot 2 ontstekingen	1
>2 ontstekingen	2
grootte bevindingen	score
geen	0
tot 1 cm2	1
> 1 cm2	2
uiterlijk bevindingen	score
geen	0
roodheid	1
extreme roodheid of ulceraties	2
gevoeligheid bevindingen	score
geen	0
matig	1
ernstig	2

vastgelegd op een 'scoreformulier ongerief'. Naast genoemde parameters werden de consistentie van de feces, de conditie van de vacht en eventuele andere bijzonderheden geregistreerd.

De konijnen werden voor het bepalen van de opname van water en voer in andere kooien geplaatst. De metingen begonnen rond 10.00 uur en duurden 24 uur. Rond 16.00 uur werd gecontroleerd hoeveel water de dieren nog hadden, zodat er eventueel bijgegeven kon worden. De dieren kregen 100g voer (Ssniff, type K-H 4 mm, onderhoudsvoer voor konijnen) en 600 of 800 ml water. Onder de waterfles zit een drinkgootje, waaronder een opvangbakje werd gehangen zodat zoveel mogelijk 'geknoeid' water kon worden opgevangen. Na de meting werden de dieren terug in hun 'eigen' kooi gezet.

De konijnen werden 's middags op een vast tijdstip gewogen (ca. 15.00 u).

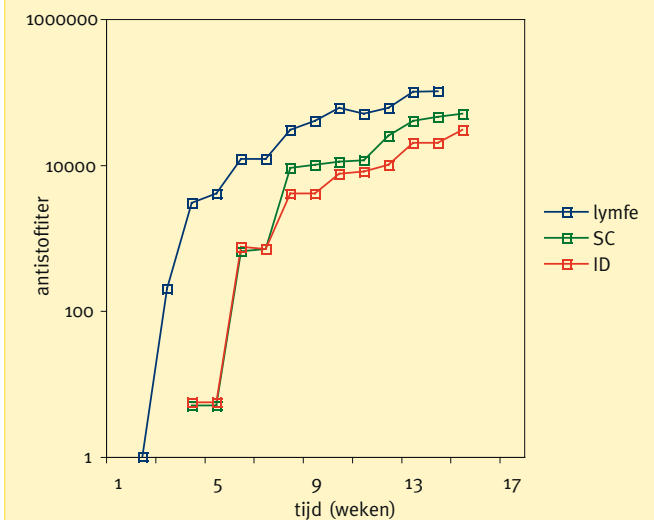
In Tabel 2 staan de gebruikte scores voor de ontstekingen. Er is gescoord op het aantal ontstekingen, de grootte er van, het uiterlijk en de gevoeligheid van de ontstekingen. Dit bij elkaar opgeteld gaf een score voor de ernst van de ontstekingen.

Het gedrag van individuele konijnen werd op dag 0, 1, 2, 4, 14, 21 na start van de immunisatie geobserveerd en op video vastgelegd. Vervolgens werd het gedrag op een aantal specifieke gedragingen geanalyseerd, zoals locomotie (huppelen), rust (staan/liggen), exploratie, comfortgedrag (poetsen/krabben). Gedragsobservaties werden in een aparte ruimte gedaan, gedurende een half uur, om ca. 13.00 uur.

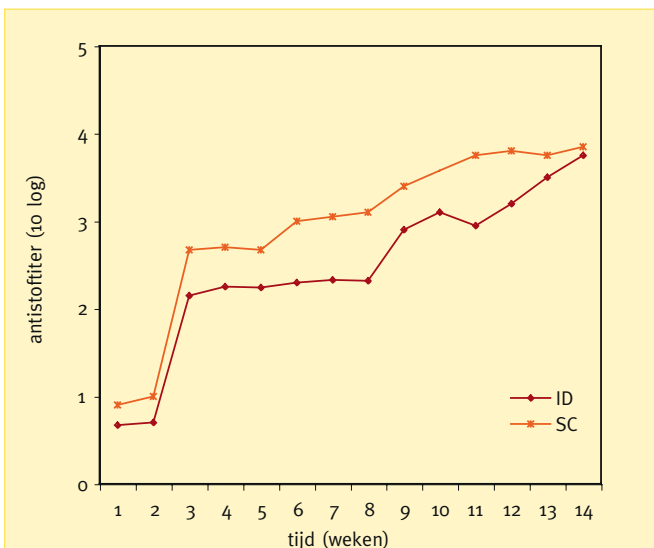
Resultaten

Antistoftiters

- 1 glyfosfaat gekoppeld aan BSA. Na s.c.-immunisatie (Afb. 1) was de titer van antistoffen tegen BSA in het begin wat hoger dan na i.d.-immunisatie



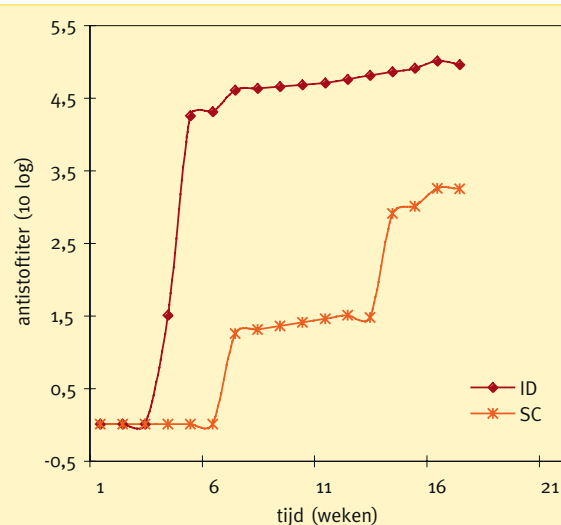
Afbeelding 2
Antistof titer tegen kallikreïne 13 na immunisatie



Afbeelding 3
Antistof titer tegen BSA na immunisatie

methode, maar op week 12 en 13 waren de antistoftiters vrijwel gelijk.

- 2 dystroglycan-KLH. Na i.d.-immunisatie (Afb. 2) kwam de titer sneller op dan na s.c.-immunisatie en de titer was op het eind ook veel hoger (een 2 log verschil is bijna 100x zo veel).
- 3 humaan kallikreïne-13 eiwit (hK13). Hier (Afb. 3) was tussen de s.c.- en de i.d.-immunisatie vrijwel geen verschil te zien in antistof titer. Opvallend was de snelle respons na immunisatie in de



Afbeelding 4
Antistoftiter tegen dystroglycan na immunisatie

popliteale lymfeklier en op deze manier werd ook de hoogste titer bereikt.

4 HIV-p24. Hier waren geen verschillen in antistofrespons tussen de i.d.- en de s.c.-immunisatie (Afb. 4).

Ongerief

Er werden geen verschillen in de voer- en wateropnames geconstateerd tussen de verschillende procedures.

Er werd geen verschil in gewichtsverloop geconstateerd.

Na i.d.-immunisatie ontstonden na gemiddeld één a twee dagen ontstekingen (Afb. 5) die na ongeveer drie weken verdwenen.

Uit de verschillende gedragsobservaties van de konijnen konden geen verschillen tussen de verschillende behandelingsgroepen worden waargenomen.

Discussie en advies

S.c. versus i.d.

Alleen bij dystroglycan bleek na i.d.-immunisatie een duidelijk veel beter resultaat dan na s.c.-toediening. Bij de drie andere antigenen waren geen grote verschillen in snelheid en hoogte van de an-

tistofrespons, en hier zouden i.d.-immunisaties en dus ontstekingen kunnen worden vermeden. Het betreft hier antigenen met een verschillend immunogeen karakter, wat suggereert dat dat wellicht met meer andere antigenen mogelijk is.

De intradermale injectie op 20 plaatsen bleek niet nodig, want er werd ook een acceptabel resultaat behaald met spuiten op 1-4 plaatsen. Ook hier lijkt dus enige winst te behalen.

Bij dystroglycan werd na s.c.-toediening echter een veel minder goed resultaat dan na i.d.-toediening gezien.

Als zeer veel serum nodig is, betekent dit dat moet worden gekozen tussen veel konijnen met weinig ongerief, of weinig konijnen, maar dan wel met ontstekingen.

De reden voor het verschil in respons op dystroglycan is mogelijk het andere fysisch-chemische karakter van het antigeen (o.a. de grootte en vorm van het molecuul) in vergelijking met de andere antigenen.

Intrapopliteaal versus s.c. dan wel i.d.

Na immunisatie in de popliteale lymfeklier werd de titer antistoffen sneller bereikt en was die hoger dan via de andere routes. De winst in de titer was echter niet erg groot. Omdat er maar één antigeen op deze manier werd toegediend is niet te zeggen of het in het algemeen zo is dat inspuiting in de lymfeklier het beste resultaat geeft.

Ongerief

Het ontbreken van duidelijke verschillen tussen de groepen in gewicht, voer- en wateropname en gedragsparameters is lastig te interpreteren. Het is denkbaar dat er werkelijk geen verschillen zijn, hoewel men wel zou verwachten dat intradermale toediening van antigeen op een groot aantal plaatsten, gevolgd door forse ontstekingsreacties wel tot meer ongerief moet leiden dan enkele s.c.-toedieningen. Het is ook mogelijk dat de gebruikte parameters niet erg geschikt zijn om ongerief goed te kwantificeren. Toediening via de lymfeklier in

de knieholte vergt een kleine operatieve ingreep onder anesthesie en geeft daarom wel wat ongerief.

Erg 'hard' kunnen onze uitspraken niet zijn omdat het aantal dieren per experimentele groep te klein was om significante verschillen aan te kunnen tonen. Hiertoef zouden veel grotere aantallen konijnen per experimentele groep nodig zijn.

Er was echter bij andere antigenen dan dystroglycan geen trend zichtbaar dat de intradermale route (procedure volgens cDL) bij de geteste antigenen een snellere en hogere titer antistoffen oplevert in vergelijking met de subcutane route (procedure volgens Code).

Dankwoord

Hierbij willen we Gijsbert Peelen en Eline Meulenberg (glyfosfaat/ELT1 support), Bert Timmers en Marc van Roosmalen (HIV-P24 en BSA/Biomerieux), Fred Sweep en Nicolai Grebenchtchikov (Kallikreïne 13/Afd. Chemische Endocrinologie, UMC St Radboud) en Nils Vogtländer (dystroglycan/Afd. Nierziekten, UMC St Radboud) bedanken voor het beschikbaar stellen van de antigenen en de assistentie bij de uitvoering van de assays.

Advies

Onze waarnemingen hebben geleid tot de volgende adviezen aan het cdl:

- **Stoppen met de intradermale toedieningsroute en 20 injecties bij de primaire immunisatie eveneens stoppen**
- **Overstappen op de subcutane route (volgens de Code of Practice: vier injecties bij de primaire immunisatie).**
- **Immunisatie via de popliteale lymfeklier (die afwijkt van de Code of Practice) alleen uit te voeren als daar duidelijk redenen voor zijn, bijvoorbeeld een slechte antistofrespons na toediening via de s.c.-route. Hierbij zal natuurlijk van belang zijn de vraag hoeveel antistoffen voor onderzoek werkelijk nodig zijn.**

Literatuur

Werkgroep immunisatieprocedures, Code of Practice voor het immuniseren van proefdieren, Keuringsdienst van Waren, aangepaste 2e versie, augustus 2000.

bliol

All it takes to operate

B BRAUN

AESCULAP

- Aesculap instrumentarium
- Hechtmateriaal en wondverzorging
- Desinfectie, hygiëne en overige bescherming
- Spuiten, naalden, I.V. canules en infuuspompen
- Producten voor bereiding en toediening infusie vloeistoffen
- Water voor injectie en andere infusie vloeistoffen in diverse presentaties



MÜLLER Micro-Instruments



Bio Services
www.bio-services.nl



Bio Services is uw dealer voor een groot assortiment B. Braun producten

hechtdraad voor alle diersoorten



hechtapparaat voor alle diersoorten

Eén adres voor kwaliteit, continuïteit en service

Postbus 29 5400 AA Uden
T +31 (0) 413 20 50 30 F +31 (0) 413 20 50 39
E info@bio-services.nl