



Syrische hamsters als preklinisch diermodel voor SARS-CoV-2-onderzoek

Door het ontstaan van de Corona-pandemie kwam er vraag naar onderzoek om middelen te testen tegen SARS-CoV-2. Voor dit nieuwe onderzoeksveld moest er een diermodel worden opgezet. De diersoortkeuze, de randvoorwaarden, de toegepaste methoden, de resultaten maar ook verbeterpunten binnen het diermodel komen terug in dit artikel, dat wij hebben geschreven naar aanleiding van onze presentatie op de Biotechnische Dagen 2021.

Wilfred Hamstra, Nora M. Gerhards

Wageningen Bioveterinary Research (WBVR), Lelystad. Contact: nora.gerhards@wur.nl

Inleiding

Eind 2019 werd er in China een nieuw respiratoirvirus aangetroffen dat daarna snel wereldwijd onder de aandacht kwam. Dit virus veroorzaakt de ziekte COVID-19 in mensen. Binnen een paar weken was de genetische samenstelling van het nieuwe virus bekend. Hieruit bleek dat het virus een grote overeenkomst had met het Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus (SARS-CoV) dat twee decennia geleden in 2003 actief was, daarom werd het nieuwe virus SARS-CoV-2 genoemd. Om COVID-19 te behandelen en zo mogelijk te voorkomen, is het van belang om onderzoek uit te voeren naar de werkzaamheid van bijvoorbeeld vaccins en antivirale middelen. Een groot deel van dit onderzoek kan *in vitro* plaatsvinden, maar de beschermende effectiviteit van een nieuw middel kan alleen in dieren of mensen worden onderzocht. Echter, voordat een nieuw middel in een klinische studie in mensen kan worden getest, zijn uitgebreide preklinische studies in dieren noodzakelijk. In dit artikel beschrijven wij ons diermodel en hoe dit is toegepast in onderzoeken die zijn uitgevoerd naar SARS-CoV-2 bij Wageningen Bioveterinary Research (WBVR).

Ten eerste moest er een keus gemaakt worden voor een diersoort. De keuze is hierbij gevallen op de Syrische hamster omdat de Syrische hamster voor SARS-CoV vatbaar is. Vanwege de gelijkenis tussen SARS-CoV en SARS-CoV-2 was het aannemelijk dat hamsters ook gevoelig zouden zijn voor SARS-CoV-2. Daarnaast waren hamsters op dat moment beschikbaar, in tegenstelling tot de genetisch gemodificeerde muizen die ook gebruikt worden voor het SARS-CoV-onderzoek.

Qua voortplanting hebben de hamsters, net zoals muizen, een korte draagtijd en de jongen zijn speenklaar binnen vier weken, wat de beschikbaarheid ten goede komt.

De genetisch gemodificeerde muizen zijn op een later moment wel ingezet voor SARS-CoV-2-onderzoek bij WBVR. Later zijn ook katten ingezet bij WBVR, met name om de overdracht van SARS-CoV-2 tussen katten te onderzoeken.

Materiaal en methoden

Alle dierexperimenten zijn uitgevoerd onder CCD-vergunningnummer AVD4010020209446 en zijn goedgekeurd door de Instantie voor Dierenwelzijn van Wageningen University and Research (WUR). Voor onze experimenten gebruiken wij zowel mannelijke als vrouwelijke Specific Pathogen Free Syrische hamsters met een leeftijd van ongeveer twee maanden bij binnenkomst.



Afbeelding 1. Hanteren en fixeren van een hamster.

Om te hanteren is enige voorzichtigheid geboden omdat de hamster minder toegankelijk kan zijn. Belangrijk hierbij is dat de hamster weet dat hij/zij benaderd wordt en daarmee vertrouwen krijgt. Dit zorgt ervoor dat de hamsters verder in het experiment bij het hanteren rustig blijven.

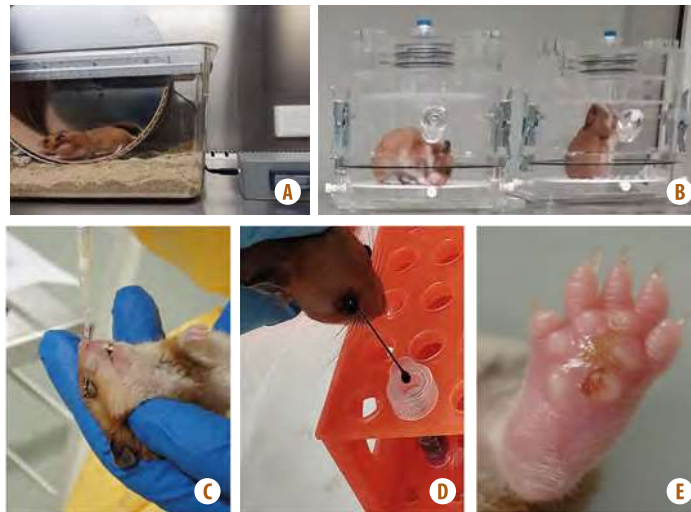
Voor het fixeren is het belangrijk dat de hamster goed in het nekvel wordt vastgepakt en zo dicht mogelijk achter de kop wordt vastgehouden. De hamster zit erg ruim in het vel en zet dit in om te proberen los te komen. Afhankelijk van de handeling kan er naast nekvel ook rugvel worden vastgepakt, bijvoorbeeld bij het uitvoeren van een i.p.- of s.c.-injectie die op deze manier zelfstandig kan worden uitgevoerd.

Huisvesting en hanteren

Hamsters zijn solitaire dieren en worden individueel in macrolon type 3-bakken gehuisvest met een loopwiel, nestlet (nestmateriaal; Bio Services), houtblokje en hooi als kooiverrijking. Het voer (Altromin 1314 IRR.) wordt zowel via het rooster als direct in de bak aangeboden om tegemoet te komen aan de behoefte van de dieren om voedsel te hamsteren. Bij hanteren en fixeren van de Syrische hamster is voorzichtigheid geboden (Afb. 1). We benaderen de hamsters heel rustig omdat ze gemakkelijk gestrest raken. Wanneer ze wennen aan een rustige benadering helpt dat ook bij het hanteren in het verdere verloop van de dierstudie. Door de hamster uit de kooi te nemen en vervolgens op bijvoorbeeld een rooster te plaatsen, is de hamster goed te fixeren. Hamsters zitten ruim in hun vel en kunnen hun hoofd gemakkelijk draaien wanneer er onvoldoende huid is gepakt tijdens het fixeren. Het is daarom van belang de hamster zo dicht mogelijk achter de kop vast te houden. Afhankelijk van de handeling, kan er ook rugvel worden vastgepakt. Tijdens de fixatie kunnen handelingen worden uitgevoerd zoals bijvoorbeeld een i.p.-injectie of een keelwabafname.

Activiteit en lichaamsgewicht

Na binnenkomst hebben de dieren een acclimatisatieperiode van minimaal een week. Dit betekent dat, er los van het aanbrengen van identificatie (s.c. transponder), geen andere invasieve handelingen worden uitgevoerd. Er vindt dan al wel registratie plaats van activiteit en lichaamsgewicht. De activiteit van de hamsters wordt weergegeven door een pulsteller, welke gekoppeld is aan een magneetopnemer waar het loopwiel (Afb. 2a), met daaraan magneten, langs roteert (Technilab). De activiteit wordt dagelijks genoteerd en de tellers worden daarna gereset. Door het gebruik van loopwielen ontstaan er voetlaesies (Afb. 2e) omdat de hamsters bij de leverancier geen loopwielen hebben en er eerst eeltvorming plaats moet vinden (later in het artikel hierover meer). Voor het scoren van de pootlaesies hebben wij graderingen bepaald voor zwelling teen, zwelling poot, wondje voetzool en aanwezigheid pus.



Afbeelding 2.

- (a) Het metalen activiteitswiel (met kurk-inlay) en LCD-pulsteller.
- (b) Meting van verschillende ademhalingsparameters wordt gedaan met behulp van Whole Body Plethysmography.
- (c) De intranasale inoculatie van SARS-CoV-2 m.b.v. een pipet.
- (d) De bloedafname middels orbitapunctie.
- (e) Voetlaesie waarbij verdikking van gehele voet, wondje en pus op voetzool is waar te nemen.

Bij binnenkomst worden de hamsters gewogen en tot aan de inoculatie met SARS-CoV-2 vindt er, afhankelijk van de opzet van de dierstudie, meestal driemaal per week een weging plaats. Na de inoculatie worden de dieren dagelijks gewogen omdat lichaamsgewicht een belangrijke vergelijking is tussen de verschillende behandelgroepen. Het gewicht is ook belangrijk voor de bepaling van het humane eindpunt.

Longfunctie

Het meten van de longfunctie in dit diermodel is een belangrijke uitleesparameter omdat het een respiratoire ziekte betreft. De longfunctie is klinisch lastig te beoordelen en te meten, maar m.b.v. Whole Body Plethysmography (WBP; EMKA) kunnen er kwantitatieve metingen gedaan worden. In de WBP-kamers worden stromings- en drukverschillen gemeten terwijl het dier ademt, verschillen ontstaan door het inademen van koude lucht en uitademen van opgewarmde lucht. Wij meten o.a. ademfrequentie, ademvolume en longweerstand. Zie Afbeelding 2b voor de opstelling van de WBP.

Anesthesie, virusinoculatie en bloedafname

Anesthesie wordt gebruikt voor bloedafnames en inoculatie met het SARS-CoV-2-virus. De algehele anesthesie wordt toegepast middels een i.p.-injectie met medetomidine (0,15 mg/kg) en ketamine (100 mg/kg). De inoculatie (100 µL) wordt intranasaal (verdeeld over beide neusgaten) synchroon met de ademhaling uitgevoerd (Afb. 2c). De bloedafname (serum) wordt uitgevoerd d.m.v. een orbitapunctie (Afb. 2d): een capillair (Hirschmann, 10 µL) wordt aan de voorkant van het oog binnengebracht onder een hoek van 45 graden tot achter het oog. Door de beschadiging ontstaat er vaatstuwning, de capillair zuigt bloed aan wat vervolgens wordt opgevangen.

Na afloop van de handelingen wordt de anesthesie s.c. geantagoneerd met atipamezole (0,75 mg/kg). Zowel anesthesie als antagonist worden m.b.v. fysiologische zoutoplossing verdund om nauwkeurig te kunnen doseren. Om de uitscheiding van de anesthesiemiddelen te ondersteunen wordt er 1 ml fysiologisch zout s.c. toegediend (opgewarmd op 37 °C). Verder wordt er nog oogzalf toegediend tijdens anesthesie tegen uitdroging van de ogen.

De huidige injectieanesthesie heeft een lange werkingsduur en een negatieve invloed op het lichaamsgewicht. De vragenronde na afloop van onze presentatie op de Biotechnische Dagen 2021 was voor ons ook aanleiding om de wijze van anesthesie nader te bekijken (later in het artikel hier meer over).

Keelwab

Om tijdens het experiment virusuitscheiding te meten worden er keelwabs genomen. De keelwabafname wordt uitgevoerd door draaiende bewegingen in de keelholte te maken met een droge swab met een kleine tip (MW100 Dryswab, MWE). Na afname wordt de swab bewaard in kweekmedium op ijs.

Pathologie

Secties worden uitgevoerd op verschillende tijdstippen na de inoculatie met SARS-CoV-2. De longen worden gewogen en het longgewicht in relatie met het lichaamsgewicht wordt als indicatie voor de ernst van de longontsteking gebruikt. Tevens wordt het percentage aangetast longweefsel bepaald door een veterinaire patholoog (macroscopische score). Van de neusschelpen en de longen wordt weefsel gefixeerd in 10% gebufferd formaline. Dit materiaal wordt later verwerkt tot histologische coupes, waarin de patholoog de ernst van de weefselschade op celniveau onder de microscoop bepaalt. Ook tonen wij microscopisch SARS-CoV-2-eiwitten aan in long- en neusweefsel middels immunohistochemie. Alle pathologische veranderingen (macroscopie en histologie) worden middels een vastgesteld semi-kwantitatief graderingsschema in scores uitgedrukt.

Virologische en serologische parameters

De keelwabs worden in het laboratorium opgewerkt om viraal nucleïnezuur aan te tonen middels Polymerase Chain Reaction (PCR). Tijdens sectie worden longen en neusschelpen verzameld om ook virus in het weefsel aan te tonen middels virusisolatie en PCR. Sera worden gebruikt om antistoffen aan te tonen tegen het SARS-CoV-2-virus of eiwitten middels virus-neutralisatietest of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). Voor details betreffende de laboratoriumanalyses verwijzen wij naar de Engelstalige publicatie [1].

Research & development

Bij WBVR hebben wij in de afgelopen twee jaar veel onderzoek verricht met hamsters. Omdat de hamster een nieuw proefdiermodel voor ons instituut was, werd er in de beginfase veel onderzoek gedaan naar de optimale uitvoering van biotechnische handelingen. In een later stadium zijn we het diermodel gaan verfijnen, waarbij dierwelzijn en relevante resultaten centraal staan. De loopwielen en de anesthesiemethode zijn hiervan voorbeelden.

Resultaten en discussie

Activiteit en lichaamsgewicht

In de eerste week na inoculatie met SARS-CoV-2 verliezen hamsters gemiddeld tussen 10-15% van hun lichaamsgewicht (vergeleken met de dag van inoculatie) en maken zij nauwelijks gebruik van het loopwiel (Afb. 3a en b). Ook kunnen zij klinische verschijnselen vertonen, zoals traag/sloom; afwijkende ademhaling of ruwe vacht. Echter is de mate van het verlies in lichaamsgewicht en van de klinische verschijnselen afhankelijk van de SARS-CoV-2-variant en dosis. In de tweede week na inoculatie herstellen de verschijnselen, het lichaamsgewicht en de activiteit.

Om het natuurlijke loopgedrag van hamsters tegemoet te komen, hebben zij de beschikking over een loopwiel. Er zijn verschillende maten loopwielen beschikbaar, en wij hebben twee verschillende types vergeleken: een plastic loopwiel zoals ze te koop zijn in een huisdierwinkel (omtrek ongeveer 52 cm), en een metalen loopwielen van Technilab (omtrek ongeveer 105 cm). Wij hebben de plastic loopwielen ook van magneten voorzien en met video-opnames en tellingen hebben wij vergeleken waar de hamsters voorkeur aan geven. De hamsters in de grotere loopwielen leggen langere afstanden af en lopen een langere tijd in het loopwiel (Tabel 1). Door de lange afstanden die de hamsters lopen, ontwikkelen zij zwellingen en kleine wondjes aan de voetzool. Deze laesies zijn bij beide types loopwielen te vinden, ze zijn echter sterker aanwezig bij de hamsters die meer kilometers lopen. Door het aanbrengen van een kurk-inlay aan de binnenkant van de metalen loopwielen kunnen de pootlaesies worden verminderd. De hamsters met een kurk-inlay lopen ten gevolge hiervan zelfs meer kilometers per dag/nacht interval.

Tabel 1. Per type loopwiel gelopen kilometers in relatie tot de pootlaesie scores.

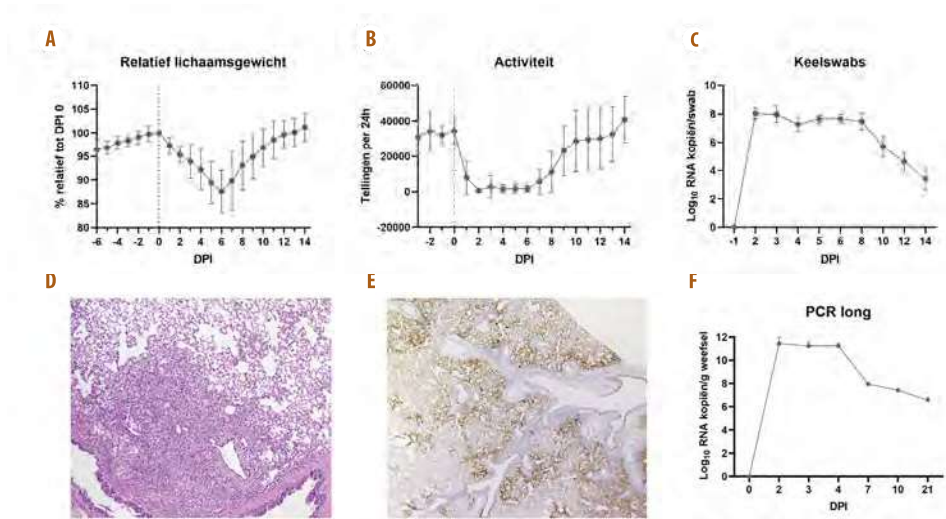
Longfunctie

	Kilometers per dag/nacht interval (gemiddeld met standard deviatie)	Score pootlaesie (gemiddeld). Maximaal waarde = 44
Metalen loopwiel	10,72 ± 2,55	9,1
Plastic loopwiel	5,67 ± 2,20	0,9
Metalen loopwiel met kurk-inlay	12,91 ± 2,78	3,7

Middels Whole Body Plethysmography kunnen wij de ademhaling van hamsters meten. Deze methode is zeer gevoelig en moet nog verder geoptimaliseerd worden, maar de eerste resultaten zijn veelbelovend. Een uitdaging is bijvoorbeeld om tijdens de meting het snuffelgedrag en de beweging van de hamster in de WBP-kamer te onderscheiden van de ademhaling.

Anesthesie

In de afgelopen twee jaar hebben wij injectieanesthesie toegepast. De narcosediepte is voldoende voor bloedafname en intranasale inoculatie. Wij zien echter een lange recovery van deze anesthesie, ondanks het antagoneren. De anesthesie heeft verder ook een nadelig effect op het lichaamsgewicht en de activiteit. In het begin van de COVID-19-pandemie hebben wij sevofluraan inhalatieanesthesie getest in hamsters. Helaas bleek toen dat de hamsters te snel bijkomen uit de sevofluraannarcose voor inoculatie en/of bloedafname. Onlangs hebben wij inhalatieanesthesie met isofluraan getest. Isofluraan heeft een hogere bloed-gas-coëfficiënt dan sevofluraan, wat betekent dat de hamsters een langere tijd nodig hebben om weer wakker te worden. Met isofluraan is er voldoende tijd om intranasaal virus (of een behandeling) toe te dienen zonder dat de hamster continu aan het narcosegas blootgesteld hoeft te zijn.



Afbeelding 3.

- (a) Het lichaamsgewicht van hamsters daalt in de eerste week na inoculatie met SARS-CoV2. (b) Hamsters maken minder gebruik van het loopwiel in de eerste week na inoculatie.
- (c) Er is veel viraal nucleïnezuur in keelwabs aanwezig in de eerste week na inoculatie, gemeten met PCR. (d) Het longweefsel is aangetast en geïnfilteerd door ontstekingscellen. Vergroting 100x.
- (e) Viraal antigeen kan als bruine kleuring zichtbaar worden gemaakt middels immunohistochemie. Vergroting 100x.
- (f) Viraal nucleïnezuur is in grote hoeveelheden aanwezig in de long van geëuthanaseerde hamsters. DPI = days post infection. De rode gestippelde lijn in grafiek a en b laat de dag van inoculatie (DPI 0) zien.

Sommige biotechnische handelingen moeten onder algehele anesthesie plaats vinden, waarvoor wij tot nu toe injectieanesthesie hebben gebruikt. In de toekomst willen wij de overstap maken naar inhalatieanesthesie met isofluraan, als verfijning en verbetering van het dierenwelzijn.

Bloedafname

Hamsters maken door de inoculatie met SARS-CoV-2 antistoffen aan, welke wij kunnen meten in bloedmonsters. De antistoffen beschermen tegen ziekte na een herhaaldelijke blootstelling aan SARS-CoV-2. Om analyses op serummonsters te kunnen uitvoeren was er behoefte aan een bloedafnametechniek waarmee voldoende bloed kan worden verzameld (200-800 µL per bloedtapmoment). Naast de orbitapunctie hebben wij andere bloedafnamelocaties geprobeerd die ook in de literatuur beschreven staan, namelijk de vena saphena, vena cephalica, sublinguale vene, gingivale vene en de vena jugularis/vena cava. De meeste bloedafnamelocaties waren niet geschikt omdat er of niet voldoende bloed kan worden verzameld (saphena, cephalica en sublinguale vene) of het risico op inwendige beschadigingen groot is (vena jugularis/vena cava). De gingivale vene (tussen de snijtanden van de onderkaak) is een geschikte locatie voornamelijk voor intraveneuze toediening, en voor kleinere volumina bloed. Echter, voor de biotechnici is het veiliger om met een capillaire te werken dan met een spuit en naald onder humaan biosafety level 3.

De orbitale bloedafname in dit diermodel wordt nu ruim twee jaar toegepast. Wij hebben tot op heden een paar hamsters gezien die iets met hun oog knepen daags na de bloedafname maar wij hebben geen beschadigingen van de ogen geconstateerd. Begin 2022 is er overleg geweest met collega's in Engeland over de bloedafname d.m.v. het aanprikken van de gingivale vene. Ondanks dat de huidige bloedafname meer dan prima verloopt is de gingivale vene ook een optie om te trainen en mogelijk toe te passen in de toekomst.

Keelwab

Virusuitscheiding kan worden gemeten in keelwabs, welke bijna dagelijks worden genomen na inoculatie met SARS-CoV-2. Gedurende de eerste week na inoculatie is er een stabiele hoeveelheid viraal nucleïnezuur, die kan worden aangetoond in de swabs, en pas in de tweede week na inoculatie neemt de hoeveelheid af (Afb. 3c).

Voor de virusuitscheiding hebben wij keelwabs en neusspoelingen getest. Voor het uitvoeren van de neusspoeling moeten de hamsters onder anesthesie worden gebracht maar voor de keelwabafname niet. De keus voor het gebruik van de keelwab in dit diermodel was hier een eenvoudige: de neusspoeling neemt meer tijd in beslag dan de keelwabafname en vereist anesthesie, waardoor de neusspoeling veel ingrijpender is dan een keelwab, terwijl beide vergelijkbare data opleveren.

Pathologie

Afhankelijk van de onderzoeksvraag worden hamsters op verschillende tijdstippen na SARS-CoV-2-inoculatie geëuthanaseerd om weefsel van de bovenste en diepere luchtwegen te verzamelen en te beoordelen. Bij de hamsters ontstaat er een longontsteking welke gemeten kan worden door een hoger relatief longgewicht (ten gevolge van vocht en ontstekingscellen in de long) en door macroscopische zichtbare veranderingen aan de longen. Deze laesies zijn op celniveau ook zichtbaar onder de microscoop (Afb. 3d). Daarnaast kunnen wij het virale nucleïnezuur en viraal eiwit in o.a. longen en neusschelpen aantonen (Afb. 3e). In overeenstemming met de keelwabs wordt er een grote hoeveelheid viraal nucleïnezuur gemeten in de eerste week na inoculatie.

Op latere tijdstippen na inoculatie wordt er minder viraal nucleïnezuur gemeten en is de longontsteking minder ernstig dan in de eerste week.

Conclusies

De Syrische hamster wordt niet alleen bij WBVR maar wereldwijd gebruikt als proefdier voor SARS-CoV-2-onderzoek [2,3]. Hamsters zijn gevoelig voor SARS-CoV-2 en ontwikkelen algemene en respiratoire verschijnselen na inoculatie, die meestal mild tot matig blijven. Door het meten van activiteit en lichaamsgewicht en de duidelijke longpathologie wordt het ziektebeeld kwantificeerbaar. Omdat hamsters heel gevoelig zijn voor SARS-CoV-2 en een succesvolle infectie makkelijk te herkennen is, zijn hamsters niet alleen geschikt voor het testen van vaccins en geneesmiddelen, maar ook voor het vergelijken van verschillende SARS-CoV-2-varianten en voor het bestuderen van virustransmissie. De afgelopen twee jaar zijn veel studies met SARS-CoV-2 in hamsters succesvol uitgevoerd binnen WBVR. Desondanks blijft het diermodel in ontwikkeling en zijn wij bezig met de 3V's. Zo is te zien dat het toepassen van een kurk-inlay in de metalen loopwielen een verfijning heeft gebracht, hebben wij de voor- en nadelen van verschillende bemonsteringstechnieken onderzocht en willen wij binnenkort overstappen op inhalatieanesthesie met isofluraan. Onze kennis en inzichten die wij binnen het SARS-CoV-2-hamstermodel hebben ontwikkeld, zijn uiteraard ook toepasbaar voor andere doeleinden waarvoor de Syrische hamster als proefdier geschikt is.

Dank

Het onderzoek is uitgevoerd in samenwerking met de onderzoeksafdelingen en de afdeling 'Department Experimental Animal Research' van WBVR. Het onderzoek is gefinancierd door de Coalition for Epidemic Preparedness Innovations (CEPI).

Bronnen

- Gerhards, N.M., et al., Predictive Value of Precision-Cut Lung Slices for the Susceptibility of Three Animal Species for SARS-CoV-2 and Validation in a Refined Hamster Model. *Pathogens*, 2021. 10(7).
- Sia, S.F., et al., Pathogenesis and transmission of SARS-CoV-2 in golden hamsters. *Nature*, 2020. 583(7818): p. 834-838.
- Chan, J.F., et al., Simulation of the Clinical and Pathological Manifestations of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) in a Golden Syrian Hamster Model: Implications for Disease Pathogenesis and Transmissibility. *Clin Infect Dis*, 2020. 71(9): p. 2428-2446.