



# Kinkhoest en *in vitro* alternatieven

Marieke Hoonakker

Marieke Hoonakker, Intravacc Bilthoven, [marieke.hoonakker@intravacc.nl](mailto:marieke.hoonakker@intravacc.nl)

## Het immuunsysteem en vaccinatie

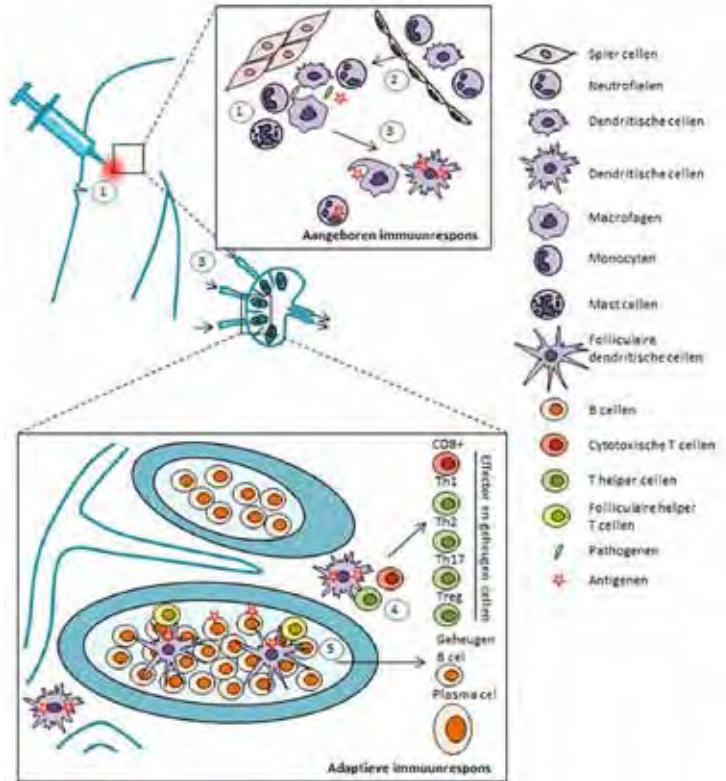
Het immuunsysteem van zoogdieren heeft als doel het individu te beschermen tegen pathogenen (ziekteverwekkers) zoals bacteriën, virussen, schimmels en parasieten. De eerste lijn is het niet-specifieke of aangeboren immuunsysteem, gevormd door cellen die een breed scala aan pathogenen herkennen en snel opruimen. Door middel van bepaalde receptoren (zoals TLR2 en TLR4) zijn deze cellen in staat bepaalde geconserveerde structuren te herkennen die alleen pathogenen bezitten, zoals bijvoorbeeld lipopolysaccharide. Indien het aangeboren immuunsysteem niet in staat is het pathogeen snel te verwijderen, wordt de tweede lijn - het adaptieve immuunsysteem - in werking gesteld. Het adaptieve immuunsysteem bestaat uit cellen die in staat zijn specifieke onderdelen van een pathogeen te identificeren en onschadelijk te maken. Hierbij zijn T-helpercellen, cytotoxische T-cellen en B-cellen (en antilichamen) betrokken. Om effectief te zijn, moeten de cellen van het adaptieve immuunsysteem zich klonaal vermenigvuldigen en daarom duurt het enige tijd voordat een adaptieve immunrespons zich voldoende ontwikkeld heeft. Een belangrijke eigenschap van het adaptieve immuunsysteem is de ontwikkeling van een immunologisch geheugen tegen al herkende pathogenen. Hierdoor kan sneller een specifieke afweer ontwikkeld worden bij herhaalde blootstelling aan hetzelfde pathogeen. Dit kenmerk wordt gebruikt bij vaccinatie, waarbij het immuunsysteem blootgesteld wordt aan een onschadelijk gemaakt pathogeen of aan onderdelen van het pathogeen. Hiermee wordt een infectie nagebootst met als doel een immunologisch geheugen op te bouwen tegen dit pathogeen. Dit proces is gevisualiseerd en nader uitgelegd in afb. 1.

## Vaccins, proefdierkundig onderzoek en de Consistency Benadering

Vaccins en dierexperimenten zijn onlosmakelijk met elkaar verbonden. Tijdens hun ontwikkeling worden vaccins uitvoerig getest op de capaciteit om een beschermende immunrespons (werkzaamheid) te induceren en op mogelijke schadelijke effecten (veiligheid). Echter ook iedere geproduceerde partij vaccin wordt getest op nagenoeg dezelfde aspecten. Veelal wordt hiervoor gebruik gemaakt van diertesten, met name voor vaccins als difterie-, teta- >>

**Afbeelding 1. Aangeboren en adaptieve immunresponse als gevolg van infectie of vaccinatie.**

Ten gevolg van een infectie of vaccinatie, reageren lokale cellen (1) door cytokines uit te scheiden. Dit trekt cellen van het aangeboren immuunsysteem aan (2), die gespecialiseerd zijn in het opruimen van pathogenen. Ook zijn er aangeboren immuun cellen (antigeen presenterende cellen: APCs) gespecialiseerd in het opnemen van pathogenen. Deze APC knippen vervolgens het pathofoon in kleine stukjes, die gepresenteerd worden op het celoppervlak. De APCs kunnen naar nabijgelegen lymfknoopen migreren (3). Dit is de plek waar APC gescand worden door helper T cellen van het adaptieve immuunsysteem (4). Deze cellen kunnen specifiek één stukje van één pathofoon herkennen, maar enkel indien dit stukje gepresenteerd wordt door een APC. Daarnaast kunnen de B cellen van het adaptieve immuunsysteem één stukje van één pathofoon herkennen indien deze vrij in de lymfknoop aanwezig is (5). Indien de aangeboren immunresponse niet in staat is om het pathofoon volledig op te ruimen, zijn de T en B cellen essentieel om de infectie te kunnen klaren. Ook zijn het deze cellen die een immunologisch geheugen kunnen worden en het mogelijk maken om bij een tweede infectie sneller te reageren. Doordat vaccins een infectie nabootsen resulteert een injectie met een vaccin in een immunologisch geheugen.



nus-, kinkhoest- en polio-vaccins. Deze diertesten zijn vaak gestandaardiseerd en worden uitgevoerd volgens specifieke wet- en regelgeving. Deze diertesten staan tegenwoordig ter discussie omdat er veelal grote spreiding zit in de testresultaten, maar ook vanwege de hoge mate van ongerief voor de proefdieren en de immunologische verschillen tussen het proefdier en de mens of – in geval van veterinaire vaccins - het proefdier en het doeldier in het geval dat deze van elkaar verschillen. Vanwege de complexiteit van een immunrespons en de biologische aard van een vaccin, is het echter moeilijk om de huidige diertesten te vervangen door één proefdiervrije methode die de werkzaamheid en veiligheid van het vaccin aantoonst. Een andere benadering is gebaseerd op het leveren van bewijs dat een vaccin op consistente wijze wordt geproduceerd en niet verschilt van een voorgaande partij met bewezen kwaliteit. Dit kan door aannemelijk te maken dat het productieproces reproduceerbaar verloopt (procesinformatie), én door met een aantal analytische en in vitro technieken een 'vingerafdruk' van het product te maken (productinformatie). Voor deze Consistency Benadering (1) zijn een aantal fysisch-chemische en immuno-chemische technieken ontwikkeld of in ontwikkeling die toegepast kunnen worden voor de karakterisatie van difterie en tetanus vaccins. Alhoewel deze technieken inzicht verschaffen in de samenstelling, vorm en structuur van de eiwitten en andere moleculen in een vaccin, geven ze geen informatie over functionele aspecten, dat wil zeggen, de immuun stimulerende capaciteit van een vaccin. In het hierover beschreven onderzoek is gekeken of het met cellulaire methoden mogelijk is om dergelijke functionele aspecten te meten.

## Kinkhoestvaccins

Voor de evaluatie van de cellulaire modellen zijn kinkhoestvaccins als model gebruikt, omdat a) er een substantieel aantal proefdieren ingezet wordt voor de bepaling van de werkzaamheid en veiligheid van deze vaccins, b) de diermodellen die op dit moment gebruikt worden, gepaard kunnen gaan met een hoge mate van ongerief, c) er veel variatie is in de resultaten van deze dierexperimenten, d) kinkhoest een ernstige ziekte is die blijft circuleren waardoor vaccinatie noodzakelijk is, en e) het vaccin aantrekkelijk is vanuit een wetenschappelijk oogpunt, zoals hieronder bediscussieerd.

Er zijn twee verschillende soorten kinkhoestvaccins. Het whole cell kinkhoestvaccin (wP) is in de jaren 1950-1960 geïntroduceerd en is gebaseerd op kinkhoest bacteriën die onschadelijk gemaakt worden door verhitting en behandeling met formaldehyde. Deze vaccins bevatten veel verschillende eiwitten en andere bacterie fragmenten (tezamen antigenen genoemd) die een bijdrage leveren aan de beschermende werking. Alhoewel het vaccin effectief is, gaan inenting met dit vaccin regelmatig gepaard met bijwerkingen zoals zwelling en roodheid op de plek van injectie en koorts. De zoektocht naar veiliger vaccins heeft geresulteerd in de ontwikkeling van acellulaire kinkhoestvaccins (aP vaccins). aP vaccins bevatten het geïnactiveerde pertussis toxine (PTx), pertussis toxoid genaamd, aangevuld met één tot vier andere gezuiverde eiwitten van de kinkhoestbacterie. aP vaccins worden met name toegepast in westerse landen, terwijl ontwikkelingslanden meestal gebruik maken van wP vaccins, omdat de kosten voor aP vaccins relatief hoog zijn. In Nederlands is tot 2005 het wP vaccin toegepast, waarna het vervangen is door een aP vaccin gebaseerd op drie eiwitten (2).

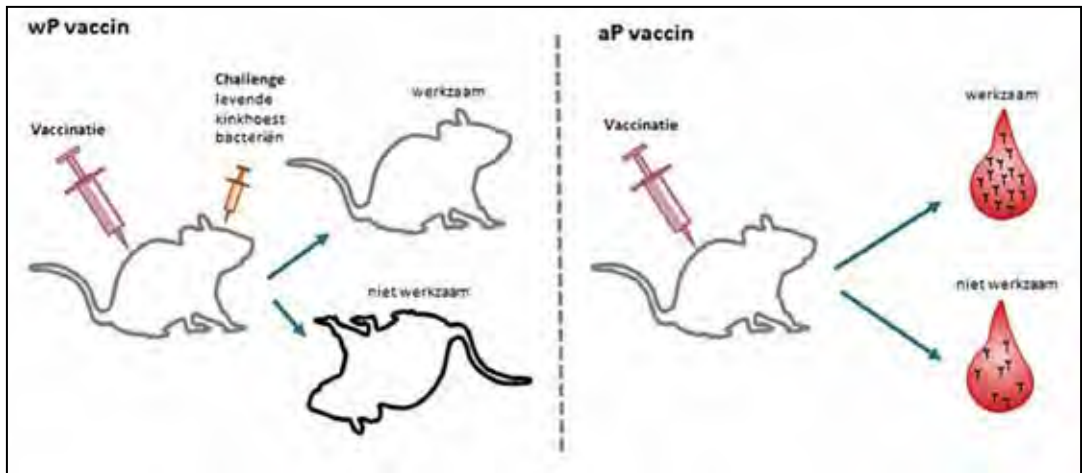
Tabel 1. Overzicht werkzaamheids- en veiligheidstesten wP en aP vaccins.

<b>werkzaamheid</b>	<b>veiligheid</b>
<b>wP vaccin</b>	
Kendrick of muisbeschermingstest minimaal~150 muizen ernstig ongerief	Mouse weight gain test minimaal~10 muizen licht ongerief
<b>aP vaccin</b>	
Serologie minimaal~110 muizen licht ongerief	Histamine Sensitatie test minimaal~40 muizen matig/ernstig ongerief

## Diertesten

Voordat een nieuwe partij wP of aP vaccin toegepast mag worden in de mens, wordt de werkzaamheid en veiligheid bepaald door middel van gestandaardiseerde diertesten (Tabel 1). De werkzaamheid van wP vaccins wordt bepaald met behulp van de zogenaamde Kendrick test, ook wel de muisbeschermingstest genoemd. Muizen worden gevaccineerd met verschillende concentraties van het vaccin. Vervolgens wordt de mate van bescherming bepaald door de hersenen te infecteren met virulente kinkhoestbacteriën (afb. 2). Indien de muizen niet of onvolledig beschermd zijn zullen ze overlijden als gevolg van de infectie, met als gevolg dat deze dieren een hoge mate van ongerief ondervinden. De werkzaamheid van aP vaccins wordt bepaald door dieren te vaccineren met verschillende concentraties van het vaccin. Daarna wordt aan de hand van de antilichaamniveaus in het bloed bepaald of het vaccin voldoende effectief is (afb. 2). Het dier hoeft hiervoor niet geïnfecteerd te worden, waardoor het ongerief veel lager is.

Naast de werkzaamheid, dient ook de veiligheid van kinkhoestvaccins bepaald te worden door middel van gestandaardiseerde diertesten. Voor wP vaccins wordt de zogenaamde Mouse >>



Afbeelding 2. Regulatorisch vereiste werkzaamheidstesten voor whole cell (wP) en acellular (aP) kinkhoestvaccin.

Weight Gain test voorgeschreven. In deze test worden muizen geïnjecteerd met het te onderzoeken vaccin en vervolgens wordt het gewicht van de dieren nauwkeurig gemonitord. Een vertraagde groei duidt op de aanwezigheid van toxines of andere ongewenste componenten. De relatief eenvoudige samenstelling van aP vaccins maakt dat voor dit vaccin alleen eventuele resten niet geïnactiveerd pertussis toxine (PTx) bepaald hoeven te worden, omdat gedacht wordt dat dit toxine de belangrijkste oorzaak is van bijwerkingen. De voorgeschreven diertest is gebaseerd op het mechanisme dat PTx muizen gevoeliger maakt voor histamine; dat wil zeggen dat een te hoge dosis PTx (in een aP vaccin) gevolgd door een blootstelling aan histamine dodelijk is. Deze diertest wordt de Histamine Sensitiseringsdiertest genoemd en kan gepaard gaan met een hoge mate van ongerief. Daarnaast wordt de test bekritiseerd vanwege de grote variatie in testresultaten (3) en het beperkte begrip van het mechanisme dat te grondslag ligt aan de toxine-geïnduceerde gevoeligheid voor histamine.

In een reeks experimenten hebben we onderzocht of cellulaire methoden in staat zijn om de kwaliteit en veiligheid van kinkhoestvaccins te meten en een functionele aanvulling kunnen vormen voor de Consistency Benadering.

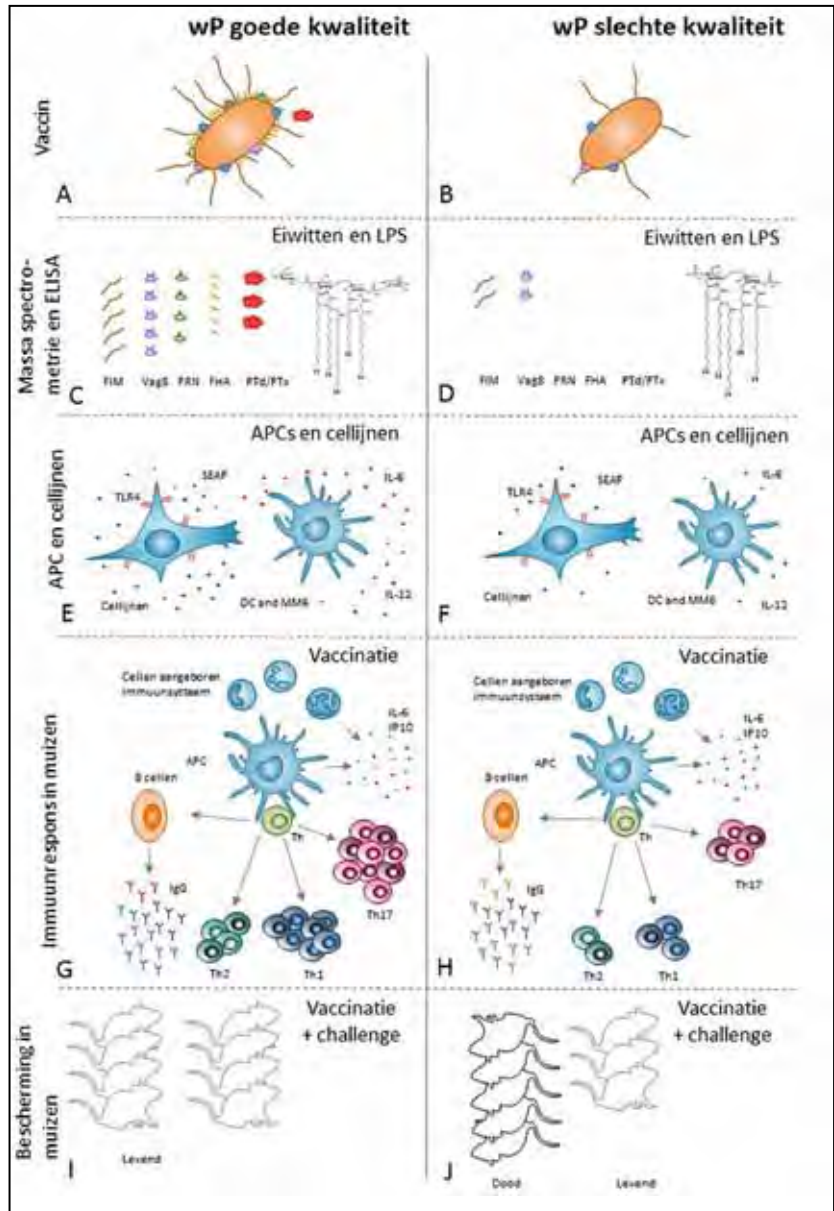
### Cellulaire methoden om kwaliteit van vaccins te bepalen

Om te bepalen of cellulaire methoden in staat zijn om een functionele indicatie te geven van vaccin kwaliteit is het noodzakelijk te beschikken over vaccins van verschillende kwaliteiten, immers een test moet een onderscheid kunnen maken tussen een vaccin van een goede en van een slechte kwaliteit. Omdat dergelijke vaccins niet commercieel verkrijgbaar zijn, hebben we gebruik gemaakt van vijf experimentele wP vaccins, geproduceerd door ons instituut, waarvan het productieproces doelbewust gemanipuleerd is. Dit heeft geresulteerd in een set aan vaccins met een kwaliteit die uiteenliep van goed tot slecht (zie ook afb. 3A en B).

Eerst is de samenstelling van de vijf experimentele wP vaccins onderzocht door middel van massaspectrometrie en ELISA. Met deze technieken hebben we laten zien dat manipulatie van het productieproces resulteert in een geleidelijke vermindering van de hoeveelheid virulente eiwitten (dit zijn eiwitten die van belang zijn voor het induceren van een protectieve immunerespons), en effect heeft op de vorm van het lipopolysaccharide in de vaccins (4,5). Om deze resultaten in perspectief te kunnen plaatsen is onderzocht wat de werkzaamheid van drie van onze experimentele wP vaccins is door middel van de muisbeschermingstest (4). Deze diertest heeft uitgewezen dat het vaccin met het hoogste niveau aan virulente eiwitten in staat >>

**Afbeelding 3. Schematische weergave van de experimenten en resultaten met de vaccins van een goede (A) en slechte (B) kwaliteit.**

De samenstelling van deze vaccins is bepaald door middel van massa spectrometrie en ELISA (C en D). Ook is met zijn de vaccins onderzocht met behulp van een cellijn die TLR4 tot expressie brengt en verschillende APCs (E en F). Naast de in de hiervoor beschreven *in vitro* karakterisatie is zowel de immuunrespons (G en H) als de bescherming (I en J) *in vivo* bestudeerd.



is om muizen te beschermen en dat dit vaccin voldoet aan de regulator gestelde eisen voor werkzaamheid, terwijl het vaccin met het laagste niveau aan virulente eiwitten in mindere mate bescherming biedt en niet voldoet aan de wettelijk gestelde eisen (zie afb 3I en J). Voor het vaccin met het tussenliggende niveau aan virulente eiwitten, voldeed de werkzaamheid net aan de eisen. Op basis van deze resultaten hebben we geconcludeerd dat deze vaccins een kwaliteit hebben die stapsgewijs verloopt van goed naar slecht (zie afb. 3C en D).

Vervolgens zijn zes verschillende cellulaire modellen onder de loep genomen en is bestudeerd of en in hoeverre deze modellen in staat waren om vaccins van verschillende kwaliteit van elkaar te onderscheiden. De modellen zouden een indicatie kunnen geven van activatie van de aangeboren immuunrespons of een gedeelte daarvan. Van deze zes modellen zijn er twee »

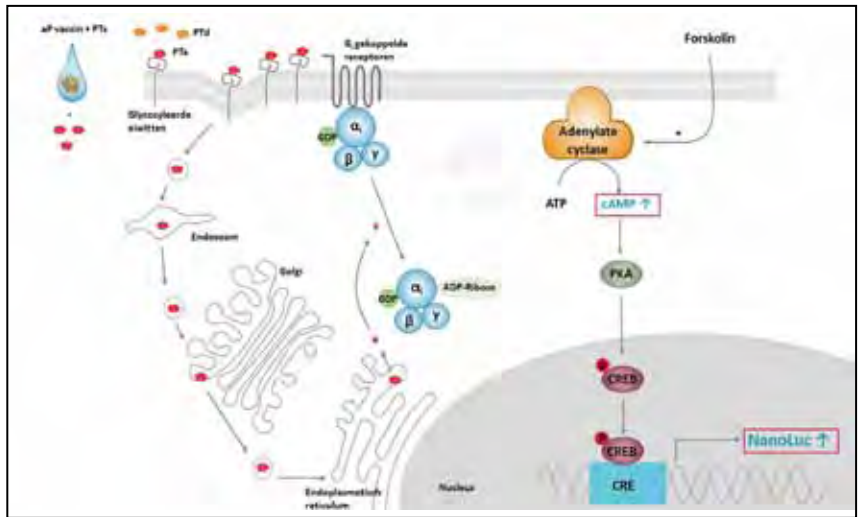
cellijnen die elk één type receptor tot expressie brengen (of humaan TLR2 of humaan TLR4). Dit zijn receptoren die betrokken zijn bij de herkenning van geconserveerde structuren in de kinkhoestbacterie. De vier andere celtypen zijn antigeen presenterende cellen (APC's); cellen die betrokken zijn bij de aangeboren immuunrespons. Deze cellen presenteren delen van een pathogeen (zogenaamde antigenen) aan het adaptieve immuunsysteem (zie ook afb. 1). Twee van de onderzochte celtypen hebben we geïsoleerd uit het bloed van donoren (zogenaamde primaire cellen), de andere twee zijn cellijnen die geïsoleerd zijn uit patiënten met een vorm van bloedkanker. Alle zes de celmodellen werden geactiveerd door onze wP vaccins en dit resulteerde in de secretie van cytokines zoals IL-6 en IL-12 (APCs) of secretie van SEAP als een maat van activatie van TLR4 (humane TLR2 en TLR4 cellijn). Drie van deze celmodellen – de cellijn die humaan TLR4 tot expressie brengt, monocyte derived dendritic cells (een primaire APC) en de MonoMac 6 cellijn (een APC cellijn) - reageerden sterker op het vaccin van een goede kwaliteit in vergelijking met het vaccin van een slechte kwaliteit (5,6). Deze drie celmodellen zijn dus in staat een wP vaccin van een goede kwaliteit te onderscheiden van een wP vaccin van een slechte kwaliteit (zie afb. 3E en F). Deze resultaten geven dus aan dat het onderscheidend vermogen van de drie celtypen en de muisbeschermingstest vergelijkbaar is en dat de drie celmodellen een veelbelovende en functionele aanvulling kunnen zijn voor de kwaliteitsbepaling van wP vaccins.

Naast deze cellulaire modellen, is ook de in vivo immuunrespons die onze wP vaccins induceren onderzocht in muizen. Hiertoe zijn muizen geïmmuniseerd met dezelfde drie vaccins (7) als eerder onderzocht in de muisbeschermingstest, echter zijn de muizen niet geïnfecteerd met virulente kinkhoestbacteriën. Deze studie heeft uitgewezen dat de vaccinkwaliteit geen meetbaar effect heeft op de aangeboren immuunrespons in muizen, maar wel effect heeft op de adaptieve immuunrespons. Immunisatie met het vaccin van een goede kwaliteit heeft in het algemeen een hogere T-helpercelrespons tot gevolg van een type (Th17/Th1). Dit type T-helpercelrespons is in muizen en in mensen geassocieerd met een betere bescherming. Naast T-cellen, hebben we ook de wP vaccin geïnduceerde antilichaam responsen bestudeerd. Opmerkelijk is dat de kwaliteit van het vaccin geen effect heeft op het antilichaam niveau gericht tegen de hele bacterie, maar wel op het antilichaam niveau gericht tegen bepaalde eiwitten in de bacterie. Ook het patroon aan eiwitten herkend door antilichamen is afhankelijk van het vaccin waarmee geïmmuniseerd is. Beide parameters, T-helpercelrespons en antilichaamresponsen gericht tegen specifieke eiwitten, bieden de mogelijkheid om in een muismodel vaccinkwaliteit te bepalen, zonder dat infectie van de muis en het daarmee gepaarde gaande hoge ongerief (zoals het geval in de muisbeschermingstest) noodzakelijk is.

## Cellulaire methoden om veiligheid van vaccins te bepalen

Naast werkzaamheid, wordt ook de veiligheid van vaccins bepaald met behulp van gestandaardiseerde diertesten. Omdat er een substantieel aantal proefdieren omgaat in dit type onderzoek, is onderzocht of het mogelijk is een functioneel en proefdiervrij alternatief te ontwikkelen voor één van deze veiligheidstesten, de Histamine Sensitisatie test (HIST), uitgevoerd voor het bepalen van PTx in aP vaccins. Eerder onderzoek naar het mechanisme van de HIST heeft uitgewezen dat PTx effect heeft op gladde spiercellen van bloedvaten, dusdanig dat deze cellen minder goed in staat zijn om samen te trekken indien dat nodig is. Op basis van dit en ander onderzoek, wordt gedacht dat gladde spiercellen een belangrijke rol spelen bij PTx geïnduceerde gevoeligheid voor histamine. Wij hebben daarom een proefdiervrije methode ontwikkeld, gebaseerd op A10 cellen (een gladde spiercellijn), waarbij het effect van PTx gemeten wordt als een verhoging van het moleculair cAMP in de cel (8). Deze methode is in staat PTx te meten, met een gevoeligheid die vergelijkbaar is met muizen. Vanwege de variatie in resultaten, maar ook vanwege technische en logistieke problemen met de cAMP detectie >>

**Afbeelding 4. Reporter cellen ontwikkeld voor de bepaling van PTx in aP vaccins.** PTx bindt aan geglycosyleerde eiwitten op de celmembraan, waarna het toxine de cel in gaat via het endosoom en het golgi om uiteindelijk in het endoplasmatisch reticulum terecht te komen. Daar gaat dissocieert het toxine en gaat een deel van het toxine (de S1 subunit) het cytosol in. Vervolgens ADP ribosyleert het S1 subunit de  $\alpha$ -subunit van Gi-gekoppelde receptoren, met als gevolg dat dit  $\alpha$ -subunit niet meer zijn normale functie uit kan oefenen. De normale functie van het  $\alpha$ -subunit is remming van adenylaat cyclase. Omdat deze remming als gevolg van PTx wegvalt is adenylaat cyclase overmatig actief. Dit heeft als gevolg dat er meer cAMP vorming is indien er PTx aanwezig is in een aP vaccine dan wanneer er geen of heel weinig PTx aanwezig is in aP vaccins. Het gevormde cAMP zorgt ervoor dat voor de vorming van het enzym NanoLuc, wat makkelijk gedetecteerd kan worden.



technieken, is er gezocht naar een alternatieve manier om de hoeveelheid cAMP te bepalen. Hiertoe hebben we de A10 cellijn, maar ook een tweede PTx gevoelige cellijn (de CHO cellijn) genetisch gemodificeerd. De genetische modificatie heeft als doel dat de vorming van cAMP in de cel leidt tot een automatisch productie van een bepaald enzym (NanoLuc) in diezelfde cel (zie afb. 4). Dit enzym kan vervolgens gemakkelijk gemeten worden. We hebben laten zien dat deze genetisch gemodificeerde cellen en met name de CHO cellen, erg gevoelig zijn voor PTx en in staat zijn residuen van PTx aan te tonen in aP vaccins, met een gevoeligheid die gelijk is of hoger is dan de Histamine Sensitatie test (9). Met name de genetisch gemodificeerde CHO cellen zijn daarmee een veel belovend alternatief voor de huidige diertest.

## Impact

Om te bepalen wat de impact zou zijn indien een alternatief voor de HIST geïmplementeerd zou worden, is onderzocht hoeveel HIST testen er jaarlijks op mondiale schaal uitgevoerd worden en is berekend hoeveel muizen hiervoor ongeveer gebruikt worden. Daartoe zijn de voornaamste fabrikanten van aP vaccin en betrokken controleautoriteiten benaderd. Deze inventarisatie laat zien dat ongeveer 640 Histamine Sensitatie testen op jaarlijkse basis uitgevoerd worden, waarbij ongeveer 65000 muizen worden gebruikt (Hoonakker et al., in preparation). Alhoewel de uitvoering van deze testen gegarandeerd heeft dat een groot deel van de wereld populatie gevaccineerd is met veilige aP vaccins, maakt de inventarisatie duidelijk dat implementatie van een alternatieve methode voor de HIST een substantiële reductie in dierproeven teweeg kan brengen.

## Conclusie

Dit werk levert een belangrijke aanwijzing dat functionele cellulaire methoden in staat zijn om zowel de kwaliteit als de veiligheid van kinkhoestvaccins te bepalen. Mogelijk zijn deze methoden een goede aanvulling voor de Consistency Benadering. Omdat verwacht wordt dat kinkhoestvaccinatie noodzakelijk blijft, is het van belang om deze benadering in het algemeen en functionele cellulaire methoden in het bijzonder, verder te ontwikkelen en te valideren zodat het proefdiergebruik voor de kwaliteitscontrole van deze vaccins kan worden afgebouwd.

## Literatuur

- 1 Hendriksen, CF (2009) *Replacement, reduction and refinement alternatives to animal use in vaccine potency measurement*. Expert Review of Vaccines 8(3): 313-322.
- 2 van der Maas NA, Mooi FR, de Greeff SC et al. (2013) *Pertussis in the Netherlands, is the current vaccination strategy sufficient to reduce disease burden in young infants?* Vaccine 31: 4541-4547.
- 3 van Straaten-van de Kappelle I, van der Gun JW, Marsman FR et al. (1997) *Collaborative study on test systems to assess toxicity of whole cell pertussis vaccine*. Biologicals 25(1): 41-57.
- 4 Metz B, Hoonakker M, Uittenbogaard JP et al. (2016) *Proteome Analysis Is a Valuable Tool to Monitor Antigen Expression during Upstream Processing of Whole-Cell Pertussis Vaccines*. Journal of Proteome Research doi: 10.1021/acs.jproteome.6b00668.
- 5 Hoonakker ME, Verhagen LM, Pupo E et al. (2016) *Vaccine-Mediated Activation of Human TLR4 Is Affected by Modulation of Culture Conditions during Whole-Cell Pertussis Vaccine Preparation*. PLoS one 11:e0161428.
- 6 Hoonakker ME, Verhagen LM, Hendriksen CF et al. (2015) *In vitro innate immune cell based models to assess whole cell Bordetella pertussis vaccine quality: a proof of principle*. Biologicals 43: 100-109.
- 7 Hoonakker ME, Verhagen LM, van der Maas L et al. (2016) *Adaptive immune response to whole cell pertussis vaccine reflects vaccine quality: A possible complementation to the Pertussis Serological Potency test*. Vaccine 34: 4429-4436.
- 8 Hoonakker ME, Ruitkamp N, Hendriksen CF (2010) *The cAMP assay: a functional in vitro alternative to the in vivo Histamine Sensitization test*. Vaccine 28: 1347-1352.
- 9 Hoonakker ME, Verhagen LM, Van der Maas L et al. (2017) *Reporter cell lines for detection of pertussis toxin in acellular pertussis vaccines as a functional animal-free alternative to the in vivo Histamine Sensitization test*. Vaccine, In press.

«

# Triple A Trading

Since 1992 your reliable supplier for Solid Drink® water replacements.

- All irradiated at a minimum dose of 10 kGy
- Irradiation certificate available with irradiation data
- Sterile packed, inside and out
- Produced in The Netherlands
- Low volumes per bucket to avoid spilling
- Non sticky gel to prevent easy mixing up with bedding material
- Long seal lip for easy stapling
- Pure biological ingredients
- No conserving agents / shelf life 12 months
- Proven quality
- Each batch tested by an independent laboratory: reliable and safe



[www.tripleatrading.nl](http://www.tripleatrading.nl)