

# Kansen voor kalveren en kinderen, een uniek RSV diermodel



Adriaan F.G. Antonis en Rineke de Jong

*Adriaan F.G. Antonis en Rineke de Jong, Wageningen Bioveterinary Research. Rineke.jong@wur.nl*

## Samenvatting

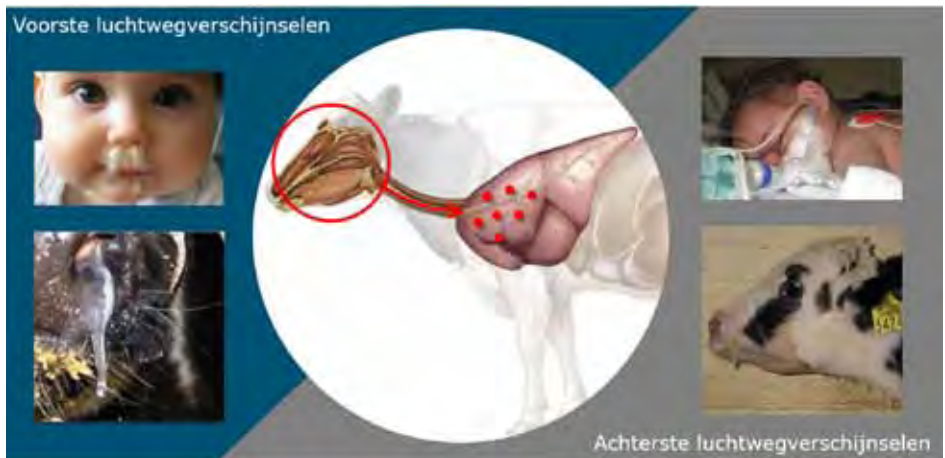
**Respiratoir Syncytieel virus, is een virus wat epitheelcellen in de luchtwegen binnendringt, doet samensmelten en voor klinische problemen kan zorgen. Onderzoek in een kalveren draagt in belangrijke mate bij aan de ontwikkeling van kennis over het verloop van de infectie voor zowel mens als dier. Met die kennis worden nieuwe vaccins en behandelmethoden ontwikkeld en kan het lijden van kinderen en kalveren in de toekomst beperkt worden.**

## Inleiding

Wie kent dat niet, het gevoel dat je je niet lekker voelt: lamlendig, snotterig, een heel vervelende hoest, misschien wat warm en dan weer koud, een gezwollen gevoel achter in de keel en misschien wel wat pijn in je borst. Al deze signalen, ook wel klinische verschijnselen genoemd, wijzen op een luchtweginfectie. Een micro-organisme (bacterie) of een lichaamsvreemd virus heeft zich in je lichaam genesteld, vermenigvuldigt zich daar en zorgt direct of indirect voor bovengenoemde klinische verschijnselen. Naast de veroorzaker van de problemen bepalen ook je lichamelijke en fysieke gesteldheid hoe deze infectie afloopt. In dit artikel beperken we ons tot luchtweginfecties veroorzaakt door een specifiek virus: het Respiratoir Syncytieel (RS) virus.

## Het virus

Het Respiratoir Syncytieel (RS) virus is het meest voorkomende verkoudheidsvirus bij kinderen en bij kalveren. Hoewel er op moleculair niveau verschillen zijn tussen de RS virussen die voor problemen zorgen bij kinderen en die bij kalveren, zijn er wat betreft het infectieverloop veel overeenkomsten. Vanwege de verschillen op genetisch niveau, spreekt mijn bij mensen van een humaan RS virus (hRSV) en bij koeien van een bovien RS virus (bRSV). Beide virussen, hRSV en bRSV, zijn zogenaamde negatiefstrengs RNA virussen en worden ingedeeld in de



Afbeelding 1. Het luchtwegstelsel van zowel kinderen als kalveren begint bij de neus en eindigt diep in de luchtwegen. Het lichaam maakt, in een poging om het virus uit de luchtwegen te verdrijven, extra slijm aan en voert het slijm versneld af (snotneus). De afscheiding van eventueel aangetaste en dode cellen verandert de neusuitvoeiing van helder slijm, naar pusachtig. Bij een toenemende aantasting in de diepere luchtwegen, wordt de patiënt steeds benauwder en gaat hij of zij sneller ademhalen.

familie van de Pneumovirussen (genus orthopneumovirus).

Virussen zijn voor hun vermenigvuldiging (replicatie) afhankelijk van replicatiemechanismen in gastheercellen. Het is dus belangrijk dat ze in die cellen terecht komen. RS virussen hebben hiervoor praktische tools ontwikkeld in de vorm van specifieke eiwitten in de mantel van het virus. Een zwaar geglycocylerd eiwit (zogenaamde G-eiwit) wordt ingezet om door de slijmlaag (mucus) van de luchtwegen heen te dringen en met het fusie-eiwit (F-eiwit) koppelt het virus zich aan de gastheercel en versmelt deze. Virus en cel worden even één. De gastheercel zal nieuwe virusdeeltjes aanmaken en uiteindelijk sterven. Nieuwe virusdeeltjes treden uit de cellen, of maken dat aangrenzende cellen versmelten met de reeds geïnfecteerde cel. Een microscopisch beeld laat dan meerkernige reuscellen (syncytia) zien. Virusdeeltjes die uit de cellen treden, verspreiden zich met in- of uitgeademde lucht, respectievelijk dieper de luchtwegen in of richting de buitenwereld.

## De luchtwegen

Het luchtwegstelsel van zowel kinderen als kalveren begint bij de neus en eindigt diep in de luchtwegen in de zogenaamde longblaasjes (alveoli). Grofweg kunnen de luchtwegen onderverdeeld worden in bovenste en onderste luchtwegen bij kinderen en voorste- en achterste luchtwegen bij kalveren.

De bovenste of voorste luchtwegen bestaan uit de neus, de keelholte, de luchtpijp en eindigen bij de splitsing van de luchtpijp in de twee hoofdvertakkingen (bronchiën) die naar de linker en de rechter longhelft gaan.

De onderste of achterste luchtwegen bestaan dan uit de steeds kleiner wordende aftakkingen van de bronchiën, die we uiteindelijk bronchioliën noemen en die eindigen in de longblaasjes. In de longblaasjes vindt gasuitwisseling plaats tussen ingeademde lucht en de kleine bloedvaatjes die in nauw contact met de alveoli aangelegd zijn. Met name de opname van zuurstof ( $O_2$ ) uit de ingeademde lucht en de afgifte van koolstofdioxide ( $CO_2$ ) uit de bloedvaatjes naar de alveoli zijn belangrijk. Vanuit de kleine bloedvaatjes in de longen wordt de opgenomen zuurstof verspreid door het lichaam. De zuurstof wordt gebruikt om energie vrij te maken (aerobe verbranding). De koolstofdioxide die bij de verbranding vrij komt, wordt weer afgevoerd via bloed naar de longen en uitgeademd. Dat de functie van de longen van »

levensbelang is, is hiermee duidelijk gemaakt.

De functie van de bovenste- of voorste luchtwegen is (1) verwarmen, (2) reinigen en (3) bevochtigen van de binnenkomende lucht. Idealiter komt alle ingeademde lucht via de neus het lichaam binnen. Mensen ademen doorgaans ook wel via de mond, maar missen dan bovenstaande voordelen van door de neus ademen. Kalveren ademen alleen door de bek als ze heel benauwd zijn.

- Omdat de buitentemperatuur doorgaans lager is dan de lichaamstemperatuur, is het belangrijk dat de binnengekomen koude lucht wordt opgewarmd. Bij koud weer zal het lichaam de extremiteiten, waaronder de neus, van extra bloedtoevoer moeten voorzien, vandaar de rode neuzen. Met name in de neusgangen wordt de lucht opgewarmd.
- Neusharen en dieper in de luchtwegen: kleinere, naar buitengerichte, trilharen voorzien van een slijm (mucus) laagje zorgen dat stofdeeltjes en andere ongerechtigheden worden tegengehouden (neusharen) en naar buiten worden gewerkt (trilharen en mucus).
- Omdat een droge lucht irriteert in de luchtwegen, wordt de binnengekomen lucht bevochtigt. Als dat onvoldoende gebeurt, kan een irritante kriebelhoest het gevolg zijn.

## Luchtwegproblemen

In de loop van de evolutie heeft het lichaam zich aangepast en zich steeds beter voorbereid op de regelmatige blootstelling aan potentieel ziekteverwekkende micro-organismen en virussen. Bij de luchtwegen is geschetst hoe dat anatomisch (door de opbouw van de luchtwegen) en functioneel (met neusharen, trilharen met slijm en een hoestmechanisme) is geregeld. Daarnaast beschikt ieder individu over een afweersysteem, wat specifieke afweercellen kan inzetten om ziekteverwekkers te bestrijden. Dat afweersysteem wordt tijdens de zwangerschap (humaan) of dracht (veterinair) in de basis aangelegd, maar moet zich na de geboorte verder ontwikkelen. De verdere ontwikkeling van het afweersysteem is een kritische fase in de ontwikkeling van het pasgeboren kind en kalf, maar ook in de periode die daarop volgt. De juiste voeding speelt daarbij een cruciale rol.

Het al dan niet ontstaan van luchtwegproblemen wordt bepaald door een balans: de infectiedruk enerzijds en de kracht van het afweersysteem anderzijds. Als de infectiedruk te hoog is of het afweersysteem het af laat weten, betekent dat ziekteverwekkende pathogenen hun kans pakken.

Afbeelding 2. Het virus kan via de neus (intra-nasale inoculatie) tot een infectie leiden. Op vier niveaus kan de infectie worden gemonitord: klinische problemen, cellulaire- en humorale immuun responsen, macroscopische- en microscopische afwijkingen op orgaaniveau en virusrepletie in gastheercellen.





Afbeelding 3. Kalveren worden aanvankelijk individueel en later in groepen gehuisvest onder laboratoriumomstandigheden.

Ons RS virus is binnengedrongen in de epitheelcellen van de luchtwegen. Het virus wordt onvoldoende geremd in zijn proces van vermenigvuldiging. Steeds meer cellen worden geïnfecteerd, versmelten aangrenzende cellen en sterven. Met het sterven van de cellen, gaat ook de functionaliteit verloren. Zo vallen de eerder genoemde trilhaarcellen (cilia) uit en verdwijnt het slijmlaagje wat de luchtwegen moet beschermen. Problemen zullen steeds groter worden. Bijvoorbeeld doordat nu ook bacteriën de kans krijgen binnen te dringen. In een verwoede poging het virus uit de luchtwegen te verdrijven, wordt extra slijm aangemaakt en versneld afgevoerd. De snotneus is hiermee geboren. De afscheiding van eventueel aangetaste en dode cellen doet het aspect van de neusuitvloeiing veranderen van helder slijm, naar pusachtig. Wanneer ook bloedvatjes beschadigen kan de neusuitvloeiing rood (door toevoeging van bloed) worden.

Nut en noodzaak van het opwekken van een hoestreflex is uitgelegd. Bij een serieuze infectie zal het lichaam de temperatuur omhoog brengen, om te proberen de replicatie van het virus op die manier te remmen, en ook specifieke afweercellen naar de aangetaste gebieden sturen. Het lichaam wordt in opperste paraatheid gebracht, ten koste van allerlei andere lichaamsprocessen.

Een onderste of achterste luchtweginfectie wordt pijnlijk wanneer longvliezen (pleura)

>>

**DORSET ID**  
IDENTIFICATION

**Fabrikant van RFID systemen**

- RFID Tags
- draagbare scanners
- stationaire decoders + antennes
- klantspecifieke software
- sensoren tbv monitoring temperatuur & RV in ruimtes

tel. 0543 477119 - Email: id@dorset.nu

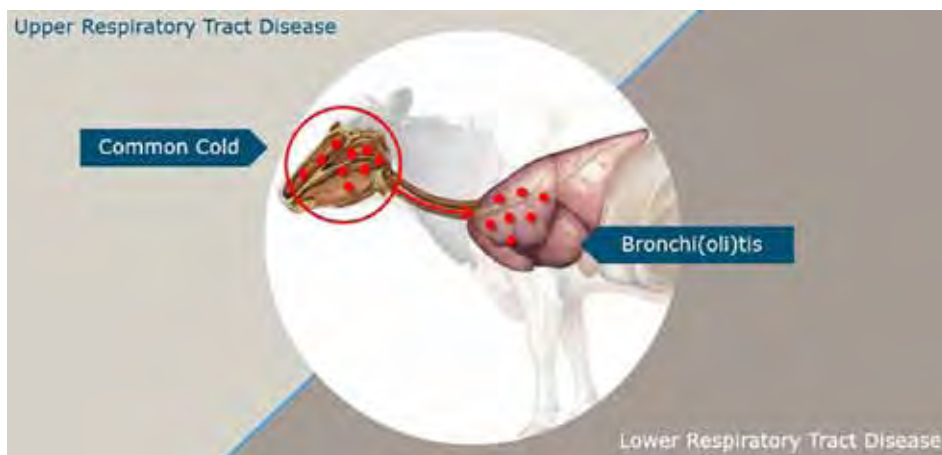
geïnfecteerd raken (pleuritis), maar kan zich ook beperken tot een ontsteking in de grotere luchtwegen (bronchitis) of kleinere vertakkingen (bronchiolitis) of zelfs de longblaasjes (alveolitis). De mate van de ontsteking in de longen, bepaalt wat we aan de buitenkant van de patiënt kunnen waarnemen. Bij een pleuritis, zal de ademhaling heel pijnlijk en daardoor oppervlakkig en snel worden. Bij een toenemende aantasting in de diepere luchtwegen, wordt de patiënt steeds benauwder en gaat hij of zij sneller ademen. Kalveren gaan uiteindelijk ook door de bek ademen, maar alle patiënten (kinderen en kalveren) zullen alle zeilen bij moeten zetten om de zuurstofvoorziening in het lichaam op pijl te houden.

## Luchtwegproblemen onderzoeken

Luchtwegproblemen onderzoek je het liefst in de patiënt zelf. Om wetenschappelijk verantwoorde uitspraken te kunnen doen, zouden patiënten vergeleken moeten worden met een groep vergelijkbare niet-patiënten. Hierbij loopt een onderzoeker al snel tegen praktische problemen aan, zoals onvoldoende beschikbaarheid van zieke kinderen of kalveren en een grote variatie in het verloop van de infectie, waardoor de onderzoeksgroep groot zal moeten zijn om conclusies te kunnen trekken. Praktischer is het om onder gecontroleerde (experimentele) omstandigheden onderzoek te doen. Dat maakt de kans op een waardevolle uitkomst van een onderzoek groter. Nut en noodzaak moeten echter van evident belang zijn en opwegen tegen ethische bezwaren en belemmeringen om het onderzoek uit te mogen voeren. Het humaan RS virus zorgt wereldwijd voor veel (ca. 30 miljoen) serieuze ziektegevallen, ziekenhuisopnames (ca. 3 miljoen) en leidt tot onnodig kindersterfte (ca. 200.000). In het bestrijden van een infectie is er sprake van een "unmet medical need, omdat er geen gerichte therapie beschikbaar is". Decennia wordt er al met man en macht gewerkt aan de ontwikkeling van humane RSV vaccins om de ernstige gevolgen van een infectie te kunnen voorkomen. Om de werkzaamheid en veiligheid van nieuwe kandidaat vaccins te kunnen evalueren voordat deze grootschalig bij kinderen worden ingezet, is een representatief diermodel van groot belang.

Het bovien RS virus zorgt wereldwijd eveneens voor veel serieuze luchtwegproblemen. Kalveren worden onnodig behandeld met antibiotica, ontwikkelen zich niet of suboptimaal en vallen vroegtijdig uit.

Diermodellen kunnen een significante bijdrage leveren in pathogenese onderzoek (begrijpen hoe en waarom een individu ziek en beter wordt), effectiviteitsonderzoek (de werkzaamheid



Afbeelding 4. Het luchtwegstelsel van zowel kinderen als kalveren begint bij de neus en eindigt diep in de luchtwegen. Infecties in de voorste luchtwegen uiten zich als "verkoudheid" en in de diepere luchtwegen als een bronchitis en/of bronchiolitis.

>>



Afbeelding 5. Om de gevolgen van een achterste luchtweginfectie te monitoren worden de diepere luchtwegen gespoeld: o.a. virus en ontstekingscellen kunnen in het longspoelmateriaal worden aangetoond.

van een vaccin of therapeuticum evalueren) en veiligheidsonderzoek (de kans op optreden van ernstige ongewenste bijwerkingen inschatten).

## Het model

Wageningen Bioveterinary Research (WBVR) ontwikkelde bijna 20 jaar geleden, begin deze eeuw, een diermodel om RSV infecties te bestuderen. Zij maken gebruik van een natuurlijk gastheermodel: het bovine RS virus en het kalf.

Wanneer een vaccin of therapie als doel heeft om een onderste of achterste luchtweginfectie te voorkomen of klinische verschijnselen te verminderen, zal de onderzoeker in het kalvermodel een infectie in de longen met bijkomende klinische verschijnselen moeten kunnen induceren. Het bovine RS virus dat hiervoor gebruikt wordt is van oorsprong een veldisolaat. De onderzoeker heeft ervaring met welke dosis hij of zij welke klinische verschijnselen bij kalveren kan veroorzaken. De klinische uitkomst van de infectie wordt mede bepaald door de gastheer, waarbij het type kalveren, de leeftijd van de kalveren en de herkomst van de kalveren een rol spelen. Voor een infectie-experiment arriveren kalveren in de daarvoor ingerichte dierfaciliteiten van WBVR. Het experiment begint met een acclimatisatieperiode om de kalveren te laten wennen aan hun nieuwe omgeving. Deze periode duurt idealiter minimaal 2-3 weken, maar wordt mede bepaald door de onderzoeksvraag.

Wanneer in het experiment een nieuw vaccin geëvalueerd wordt, wordt de acclimatisatieperiode gevolgd door een immunisatiefase waarin de kalveren gevaccineerd worden. Het vaccinatieprotocol van de producent bepaalt hoe de immunisatiefase eruit gaat zien. Na deze fase volgt een zogenaamde challenge.

In de challengefase worden de kalveren geïnoculeerd met infectieus virus. Voor en na de inoculatie worden klinische observaties uitgevoerd en worden monsters verzameld voor aanvullend laboratoriumonderzoek. Hierbij kan gedacht worden aan (1) bloedmonsters, (2) neus-keelwabs, (3) longspoelingen.

Gebruik aanvullende monsters.

- 1.. Het bloed kan onderzocht worden op specifieke afweerstoffen; dit zijn immuunstoffen die geproduceerd worden door het afweersysteem om het virus te kunnen labelen of te neutraliseren. Verder kunnen specifieke immuuncellen en infectiemarkers in het bloed aangetoond worden.
2. Hiermee kan een indruk verkregen worden van de virusuitscheiding.

»

3. Het longspoelingmateriaal kan gebruikt worden om de replicatie van het virus in de longen aan te tonen, het kwantificeren en typeren van ontstekingscellen en onderzoek te doen naar specifieke immunoreacties.

Het diermodel biedt een breed scala aan mogelijkheden om de ziekteproces en eventuele veranderingen in het ziekteverloop na een preventieve of therapeutische behandeling te monitoren. Dit proces kan door middel van klinische observaties, non-invasieve metingen en aanvullend laboratoriumonderzoek gemonitord worden.



*Afbeelding 6. Net als kinderen hebben kalveren, geïnfecteerd met een verkoudheid-virus, een snotneus.*

Ten slotte kan besloten worden na het einde van de in vivo fase, kalveren aan te bieden voor postmortaal onderzoek. Op de sectietafel worden longen gewogen, macroscopisch beoordeeld, samples verzameld voor microscopisch / histologisch en additioneel virologisch en eventueel bacterieel onderzoek.

### Alternatieve diermodellen

Het meest gebruikte alternatieve diermodel voor humaan pre-klinisch onderzoek is het muizenmodel waarin muizen geïnoculeerd worden met humaan RSV. Dat model lijkt relatief goedkoop, maar heeft veel beperkingen t.o.v. het kalvermodel. De omvang van het dier, maakt dat er maar een beperkt aantal samples verzameld kan worden. Het muizenmodel is geen volwaardig klinisch model. Een klinisch model vergelijkbaar met het kalvermodel lijkt het non-human primates (met humaan RSV), maar dat model kent ethische beperkingen en leent zich minder goed voor klinisch onderzoek. Ten slotte lijkt een lammermodel een mooi alternatief voor perinataal onderzoek. Dit model heeft soortgelijke voordelen als het kalvermodel t.o.v. muizenmodel. Het model zou iets voordeliger kunnen zijn dan het kalvermodel, omdat er meer lammeren op een vierkante meter stalruimte gehuisvest kunnen worden, dan kalveren. Het is niet duidelijk of het lammermodel ook geschikt is voor vaccinonderzoek. Het kalvermodel biedt ongelooflijk veel mogelijkheden, met name omdat het een natuurlijk-gastheer model betreft, maar ook vanwege de omvang van het diersoort. Het volume van de monsters is vele malen groter dan bij knaagdiermodellen en monsters kunnen ook herhaaldelijk verzameld worden van één dier gedurende het verloop van de infectie.

### Conclusie

Luchtweginfecties veroorzaakt door een RSV infectie, zijn een serieus probleem bij kinderen (met een zogenaamd 'unmet medical need', op jaarbasis 200.000 sterfgevallen wereldwijd), en kalveren (belangrijkste reden om antibioticabehandelingen in te zetten en doodsoorzaak nummer één in de periode van 2 tot 8 weken). De ontwikkeling van goede vaccins voor zowel kinderen als kalveren lijkt een absolute noodzaak. Om de werkzaamheid en veiligheid te kunnen beoordelen is een valide diermodel noodzakelijk. WBVR heeft bijna 20 jaar ervaring met zo'n diermodel. Dankzij dit diermodel worden grote stappen gezet in de ontwikkeling van nieuwe behandelmethoden van RSV infecties. Met die kennis kan het lijden van kinderen en kalveren in de toekomst beperkt worden.

«