



BPRC

Proefdierkundig Jaarverslag

2017



Inhoud

Inleiding

Onderzoeksonderwerpen binnen BPRC	4
Traject voorafgaand aan een dierproef.	4
Dierexperimenten Commissie (DEC) en Instantie voor Dierenwelzijn (IvD)	5
Trajecten onderzoeksaanvragen na de gewijzigde WoD	6
Aantallen projectvergunningaanvragen en werkprotocollen	8

Dierexperimenteel onderzoek

Huisvesting en verzorging	10
Diertraining en welzijn	11
Diergeneeskunde	11
Ethologie	12
Details dierexperimenteel onderzoek.	13
Immunobiologie	15
Virologie.	17
Parasitologie	21
Vergelijkende Genetica en Verfijning (CG&R).	27
Alternatieven	29

Openheid en communicatie.	33
--------------------------------	----



Coverfoto: twee witoorpenseelaapjes, marmosets, drinken gom uit de spuit. Dat is een plantensap dat zij heel lekker vinden. Ze hebben het ook nodig. Hun conditie gaat aanzienlijk achteruit als ze dit niet drinken.



Het Biomedical Primate Research Centre (BPRC) is een wetenschappelijk instituut, dat zowel verkennend als toegepast biomedisch onderzoek verricht in het belang van de volksgezondheid. Daarnaast levert BPRC een actieve bijdrage aan de ontwikkeling van alternatieven voor dierproeven.

Het doel van het verkennend onderzoek is het verkrijgen van kennis over het ontstaan en het verloop van chronische- en infectieziektes. Het doel van het toegepast onderzoek is een bijdrage leveren aan de ontwikkeling van nieuwe medicijnen of behandelingen voor ernstige ziektes.

Beide zijn langdurige processen die helaas - nog - niet mogelijk zijn zonder dierproeven. Zij gaan dan ook vergezeld van maatschappelijke zorg over het welzijn van de proefdieren. Naast onderzoek waarbij proefdieren ingezet worden, vindt bij BPRC ook onderzoek plaats om alternatieven voor het gebruik van proefdieren te ontwikkelen.



BPRC heeft een actief en uitgebreid programma voor het ontwikkelen van alternatieven volgens de principes van de 3V's: **V**ervanging, **V**ermindering en **V**erfijning. Onderzoek naar het ontwikkelen van alternatieven heeft BPRC deels ondergebracht in een specifieke, zelfstandige onderzoeksgroep. Daarnaast wordt instituut-breed in alle andere onderzoeksafdelingen het ontwikkelen en het gebruik van alternatieven actief ondersteund en gestimuleerd.

BPRC onderkent de verantwoordelijkheid die de inzet van dieren voor de menselijke gezondheid met zich meebrengt. In het kader van maatschappelijk verantwoord ondernemen (MVO) streven wij ernaar – mede met dit proefdierkundig jaarverslag - het publiek te informeren en openheid te verschaffen over:

- de projecten waarvoor dieren worden ingezet (Code Openheid Dierproeven),
- de rol van de Dierexperimenten Commissie en de Instantie voor Dierenwelzijn,
- het aantal dieren dat is ingezet in 2017,
- de ontwikkelingen op het gebied van alternatieven voor dierproeven.

Onderzoeksonderwerpen binnen BPRC

De gezondheid van mensen in grote delen van de wereld is de afgelopen honderd jaar aanzienlijk verbeterd. Dit komt deels door de toegenomen hygiënische omstandigheden, maar is ook voor een groot deel te danken aan geneesmiddelen en vaccins die in deze periode zijn ontwikkeld, vaak mede dankzij proefdieronderzoek. Uitbreiding van onze kennis is noodzakelijk voor een succesvolle strijd tegen ziektes die nog niet zijn te voorkomen of te genezen. Biomedisch onderzoek vormt de basis voor de ontwikkeling van nieuwe en veilige medicijnen en therapieën.



BPRC is het grootste niet-commerciële primatencentrum van Europa en speelt een centrale rol bij het biomedisch onderzoek naar ernstige menselijke ziektes. BPRC verricht geen onderzoek voor de ontwikkeling van cosmetica (bij wet verboden), recreatieve drugs of wapens. Het onderzoek bij BPRC richt zich op de bestrijding van ziektes zoals aids, griep, het westnijlvirus, denguevirus, zikavirus, malaria, tuberculose, multiple sclerose, reumatoïde artritis en de ziektes van Parkinson en Alzheimer.



Ook werken we aan medische vraagstukken, zoals transplantaat-afstoting. De Nederlandse wet bepaalt dat de inzet van apen hierbij alleen is toegestaan wanneer er geen geschikte alternatieven zijn. Naast de incorporatie van de 3V-principes (vervanging, vermindering en verfijning) bij al het onderzoek waarbij we proefdieren inzetten, beschikt dit kenniscentrum

over een aparte, zelfstandige unit om onderzoek te doen naar het ontwikkelen van alternatieven voor het gebruik van proefdieren.

Traject voorafgaand aan een dierproef

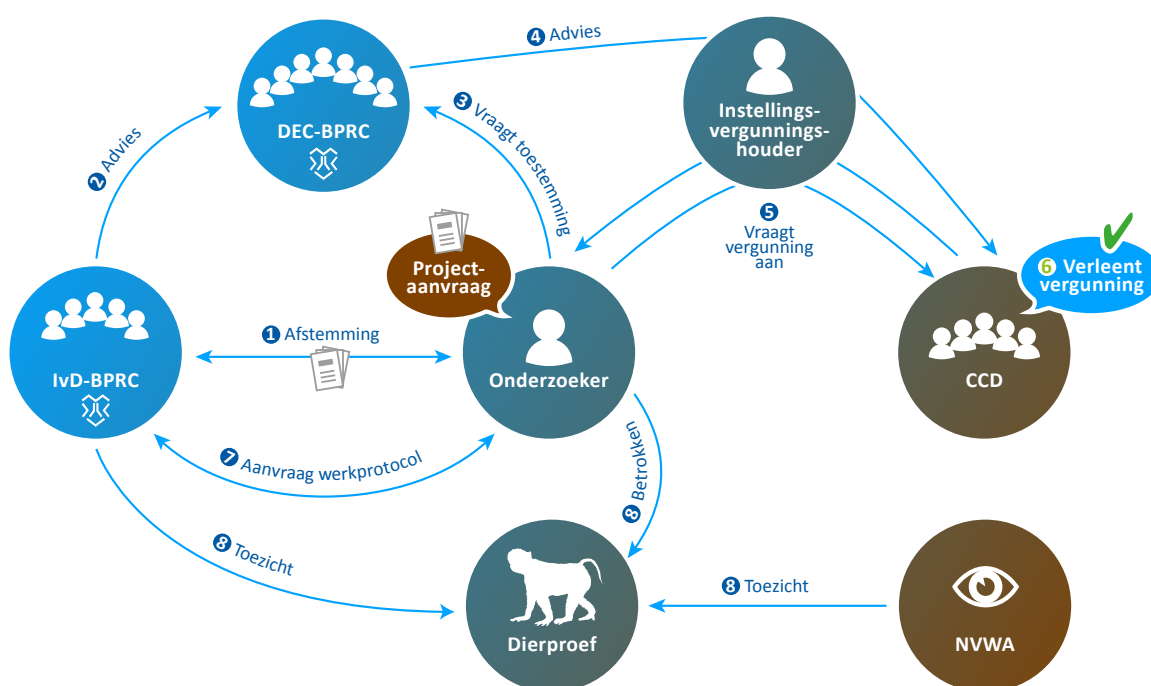
Aan de daadwerkelijke uitvoering van een dierproef gaat een lange weg vooraf. De eerste selectie van kandidaat-geneesmiddelen of -vaccins vindt altijd plaats in het laboratorium, door middel van zogeheten '*in vitro*-technologie'. Hierbij vinden proeven plaats in het lab (bijvoorbeeld weefselkweektechnieken) zonder proefdieren. Hoe beter deze technologie de situatie in levende mensen of dieren (*in vivo*) benadert, des te beter de voorspellende waarde voor de eventuele werking in de mens. Na een *in vitro*-testfase komen mogelijk interessante kandidaat-geneesmiddelen of therapeutische benaderingen in aanmerking voor *in vivo*-testen. Deze geneesmiddelen of therapieën kunnen ontwikkeld zijn binnen BPRC, maar ook binnen andere onderzoekscentra, universiteiten of kenniscentra.

Belangrijk is dat, ondanks al het verrichte voorwerk, we in geen geval een dierproef kunnen starten zonder een positief advies van de centrale commissie dierproeven.

Dierexperimenten Commissie (DEC) en Instantie voor Dierenwelzijn (IvD)

De Dierexperimenten Commissie (DEC) heeft als taak een ethische afweging te maken tussen de gevolgen voor de gezondheid en het welzijn van het proefdier en het wetenschappelijk en maatschappelijk belang van de voorgestelde dierproef. Een belangrijk onderdeel van die ethische afweging is de taak om het voorstel om proefdieren in te zetten nauwgezet te toetsen op de mogelijkheid van het gebruik van alternatieve methoden. Als de beoogde antwoorden ook zonder inzet van proefdieren (vervanging), of met de inzet van minder proefdieren (vermindering), of met een andere proefopzet, waarbij de proefdieren minder ongerief ondervinden (verfijning), zijn te verkrijgen, dan zal de DEC negatief adviseren en vindt de voorgenoemde dierproef niet plaats.

Op 18 december 2014 is de gewijzigde Wet op de Dierproeven (WoD) in werking getreden. Hierdoor zijn de procedures voor het verkrijgen van toestemming voor het uitvoeren van een dierproef sterk gewijzigd. Er zijn nieuwe instellingen opgericht, namelijk de Centrale Commissie Dierproeven (CCD) op landelijk niveau, en de Instantie voor Dierenwelzijn (IvD) op instituutsniveau.



De IvD is een belangrijke schakel tussen de DEC/CCD en de onderzoeker. De IvD van BPRC is in 2017 uitgebreid met een tweede wetenschapper en bestaat nu uit: de beheerder van de fokkolonie, twee wetenschappers, een dierenarts en een biotechnicus, allen werkzaam bij BPRC. Verder betrokken als adviseurs zijn een dierenarts met kennis van proefdiergeneeskunde, ook werkzaam bij BPRC, en een externe proefdierdeskundige.

De missie van de IvD-BPRC is om in alle opzichten te streven naar een optimaal welzijn van onze proefdieren. Op basis van de principes van de 3V's (Vervanging, Vermindering en Verfijning), de intrinsieke waarde van de dieren en de actuele wettelijke bepalingen. Verder bewaakt de IvD-BPRC de correcte, praktische uitvoering van de dierexperimenten op de werkvloer.

De gewijzigde WoD schrijft voor dat een experiment waarbij proefdieren ingezet worden pas mag worden uitgevoerd wanneer de CCD hiervoor een "projectvergunning" aan de vergunninghouder heeft afgegeven. Deze gewijzigde procedure geldt voor alle nieuwe aanvragen. Nu zijn er echter ook nog aanvragen waarvoor vóór het in werking treden van de gewijzigde WoD al toestemming was verleend. Deze konden we nog uitvoeren tot uiterlijk 31 december 2017, waardoor er tot die tijd sprake was van een overgangssituatie.

Gezien de complexiteit van de overgangssituatie hebben we de diverse procedures in een apart kader weergegeven.

Trajecten onderzoeksaanvragen na de gewijzigde WoD

Paraplu-aanvragen waarover voor 18 december 2014 al positief geadviseerd was

1. Werk-protocollen worden voorgelegd aan de **IvD** => bij een positief advies van de IvD kan de aanvrager overgaan tot uitvoering van het experiment.

Mochten er aanpassingen nodig zijn in de bestaande paraplu-aanvraag, dan beoordeelt de IvD die. Wanneer deze aanpassingen betekenen dat de mate van ongerief of het aantal dieren toeneemt, dan beoordeelt de DEC de aanpassingen. Hetzelfde geldt wanneer het niet duidelijk is of de aanpassingen binnen het kader van het project vallen.

Nieuwe aanvragen (situatie per 18-12-2014 tot 31-12-2017)

1. Aanvraag voorleggen aan de **IvD** ter beoordeling op helderheid en technische uitvoerbaarheid.
2. Na verwerking van de feedback de aanvraag indienen bij de **DEC**.
3. DEC brengt advies uit aan de **CCD**.
4. Vergunninghouder dient de aanvraag samen met het DEC-advies in bij de CCD.
5. **CCD** besluit over het afgeven van een “projectvergunning”.

Na een eventueel positief besluit is het mogelijk aanvragen voor afzonderlijke dierproeven (“werkprotocollen”) in te dienen bij de IvD => als de IvD positief adviseert, kan de aanvrager overgaan tot uitvoering van het experiment.

Nieuwe aanvragen (situatie per 01-01-2018)

1. Aanvraag voorleggen aan de **IvD** ter beoordeling op helderheid en technische uitvoerbaarheid.
2. Na verwerking van de feedback de aanvraag indienen bij de **CCD**.
3. CCD kiest een **DEC** en legt de aanvraag daar voor ter advies.
4. DEC brengt advies uit aan de CCD.
5. **CCD** besluit over het afgeven van een “projectvergunning”.

Na een eventueel positief besluit is het mogelijk aanvragen voor afzonderlijke dierproeven (“werkprotocollen”) in te dienen bij de IvD => als de IvD positief adviseert, kan de aanvrager overgaan tot uitvoering van het experiment.

Aantallen projectvergunningaanvragen en werkprotocollen

7

Nieuwe aanvragen voor een projectvergunning ingediend bij CCD.

1

Aanvraag voor een aanpassing in een al eerder goedgekeurde paraplu-aanvraag ingediend bij CCD.

13

De IvD heeft in 2017 dertien werkprotocollen voor studies met experimentele handelingen ontvangen.

In 2017 heeft BPRC zeven nieuwe aanvragen voor een projectvergunning ingediend bij de CCD. De IvD was intensief betrokken bij het schrijven van deze aanvragen, waarna ze werden ingediend bij de DEC. In alle gevallen heeft de DEC diverse vragen gesteld aan de onderzoekers en is de aanvraag daarop aangepast.

De DEC-BPRC heeft na deze aanpassingen over alle aanvragen een positief advies uitgebracht aan de CCD. De CCD heeft vervolgens voor deze zeven aanvragen een projectvergunning afgegeven. In 2017 werd één aanvraag ingediend voor een aanpassing in een al eerder (voor 18-12-2014) goedgekeurde paraplu-aanvraag. Na vragen van de DEC is deze aanvraag teruggetrokken.

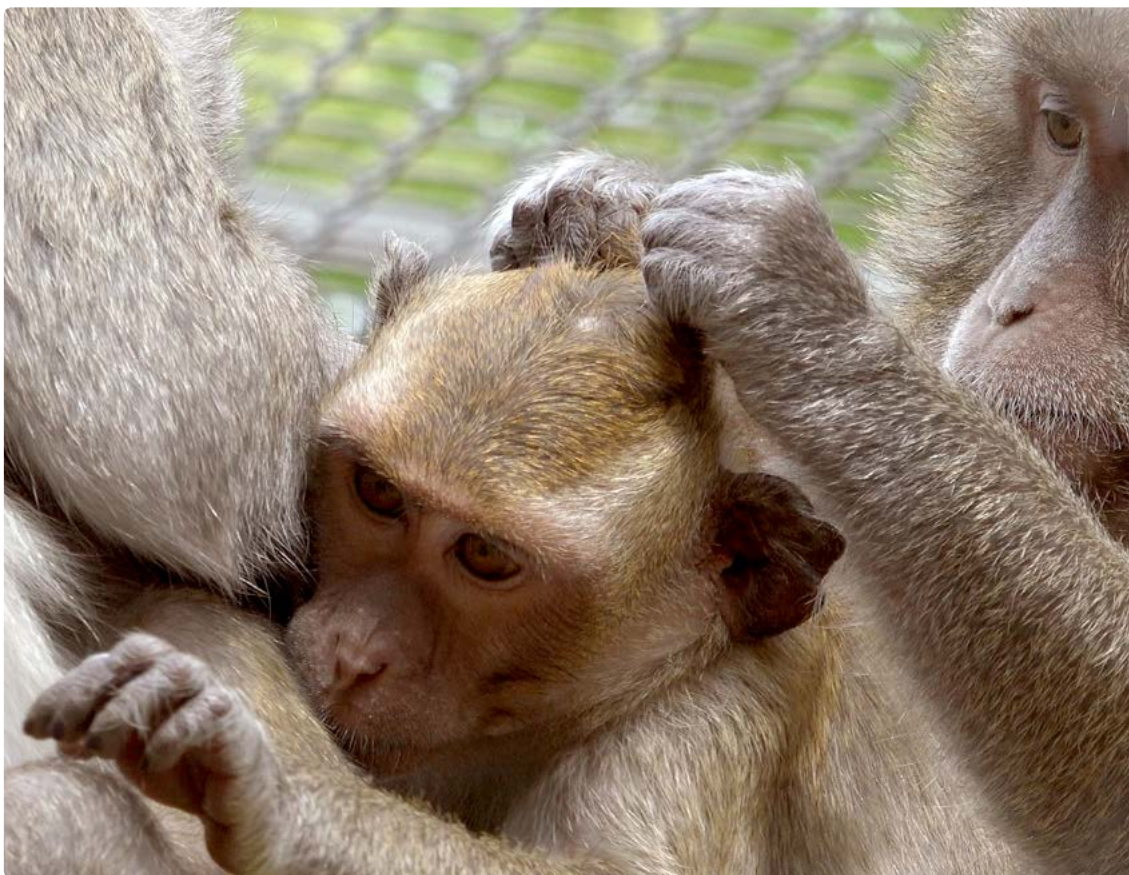
Er was één aanpassing nodig op een goedgekeurde CCD-vergunning. Deze aanpassing is beoordeeld door de IvD als zijnde zonder gevolgen voor het ongerief of het aantal dieren. De aanpassing is gemeld aan de CCD.

De IvD heeft in 2017 dertien werkprotocollen voor studies met experimentele handelingen ontvangen. Over alle werkprotocollen is uitvoerig met de onderzoekers gediscussieerd, voordat goedkeuring werd verleend. Zeven werkprotocollen vielen onder paraplu-aanvragen die waren goedgekeurd voor 18 december 2014 en zes werkprotocollen vielen onder CCD-projectvergunningen van BPRC.

Binnen BPRC vindt ook veel gedragsonderzoek plaats, onder te verdelen in gedragsobservatiestudies en gedragstesten, en soms een combinatie daarvan. De IvD heeft naar aanleiding van het CCD-stuk “Herziene Wet op de dierproeven: Wanneer is er sprake van een dierproef in de zin van de wet?” (oktober 2016), in overleg met betrokken onderzoekers, dierenartsen en de vergunninghouder een leidraad opgesteld met daarin de voorwaarden voor het uitvoeren van gedragsonderzoek (gedragsobservaties, diertraining en gedrags testen) bij BPRC.

Wanneer het gedragsonderzoek zich afspeelt binnen de kaders van de leidraad, dan overschrijdt BPRC niet de drempel van wat als dierproef moet worden aangemerkt; het gedragsonderzoek is dan dus geen dierproef. De IvD beoordeelt vooraf of het aannemelijk is dat deze studies inderdaad onder de drempel van een dierproef blijven. Achteraf evalueren we het welzijn van de dieren met onderzoekers, dierverzorgers, veterinaire personeel en de IvD. Samen beoordelen zij of er sprake is geweest van ongerief en of het onderzoek ook achteraf kan worden beschouwd als geen dierproef.

In 2017 heeft de IvD goedkeuring verleend aan tien (deel)onderzoeken naar gedrag. Het resultaat van de evaluatie achteraf is dat die onderzoeken geen ongerief hebben opgeleverd dat de drempel van een dierproef overschrijdt, en daarom dus ook geen dierproeven waren.



Java-ape die elkaar vlooien. Dit is vriendelijk gedrag en versterkt de onderlinge band.

Huisvesting en verzorging

Voor het onderzoeksprogramma heeft BPRC eigen fokkolonies van resusapen (*Macaca mulatta*), Java-apen (*Macaca fascicularis*) en marmoset-apen (*Callithrix jacchus*).



Resusaap



Java-aap



Marmoset-aap

In 2017 zijn in deze fokkolonies 124 resusapen geboren, 33 Java-apen en 46 marmosets. BPRC heeft een stabiele kolonie, waarvan de grootte is afgestemd op het onderzoeksprogramma. Animal Science Department, de verantwoordelijke afdeling voor het huisvesten en verzorgen van de dieren, en de diverse onderzoeksgroepen van BPRC voeren nauw overleg om het fokbeleid goed vast te leggen. De kolonie Java-apen beheren we grotendeels voor het wetenschappelijk onderzoek naar gedragsaspecten in samenwerking met de afdeling Animale Ecologie van de Universiteit van Utrecht.

De nauwe samenwerking tussen kolonimanager (gedragsdeskundige), dierenartsen en genetici kent drie speerpunten: de fok optimaal laten verlopen, inteelt voorkomen en de best mogelijke selectie van dieren voor het onderzoek waarborgen. In de fok zijn de dieren gehuisvest in grote, natuurgetrouwe groepen. De dieren blijven in principe minimaal gedurende de eerste anderhalf (voor de marmosets) of vier (voor de beide makaaksoorten) jaar van hun leven in hun geboortegroep. Op deze manier probeert BPRC de natuurlijke patronen zo veel mogelijk na te bootsen. Een aantal dieren blijft gedurende het hele leven in de fokgroep. Zodra dieren zijn geselecteerd voor studies, verhuizen ze naar daartoe geschikte faciliteiten.

Alle dieren bij BPRC zijn sociaal gehuisvest. We hebben veel aandacht voor verrijking van de leefomgeving. Daarnaast besteden we specifieke aandacht aan diertraining. Daartoe heeft BPRC twee ervaren diertrainers in dienst.

Het optimaal verzorgen van deze grote groepen apen, met een grote diversiteit aan leeftijden, vereist specifieke expertise. De dieren worden verzorgd door gediplomeerde diervverzorgers. Zij hebben een meerjarige opleiding voltooid, gevolgd door een interne opleiding om de specifieke kenmerken van apengedrag en verzorging te leren.

Diertraining en welzijn

BPRC houdt zich al een aantal jaren bezig met diertraining gericht op het zo veel mogelijk vrijwillig laten meewerken van de dieren aan een aantal handelingen. De diertrainers van BPRC ontwikkelen continu methoden om die handelingen zo optimaal mogelijk te laten verlopen. In internationaal verband zijn ze ook betrokken bij het verder ontwikkelen van die trainingen. Ze delen hun kennis met andere instituten, onder andere door het geven van lezingen of workshops.



Links: de huisvesting voor de fok. Rechts: een aap in experimentele huisvesting krijgt limonade uit de spuit als beloning na het vrijwillig aanbieden van een hand of voet.

Diergeneeskunde

De groep diergeneeskundige zorg is verantwoordelijk voor de controle op de gezondheid van alle dieren, zowel in de fok als in studies. Deze groep bestaat uit vier dierenartsen, een veterinaire patholoog en vijf ondersteunende medewerkers. Om gezondheids- en gedragsproblemen bij de dieren beter te monitoren, werken de dierenartsen, kolonimanagers en diertrainers nauw samen. BPRC beschikt over een gedegen handleiding voor ziektemeldingen om deze optimaal te registreren en waar nodig op te volgen.



Samenstelling groep diergeneeskundige zorg:

- 4 dierenartsen
- 1 veterinaire patholoog
- 5 ondersteunende medewerkers

BPRC streeft naar een continue verbetering op het gebied van veterinaire zorgen het houden van apen. In 2017 is een van de dierenartsen gepromoveerd op een meerjarig onderzoek naar het verbeteren van het welzijn en de veterinaire zorg van marmosets. Mede dankzij dit onderzoek zijn aanpassingen doorgevoerd op het gebied van anesthesie en pijnbestrijding bij marmosets. Het diergeneeskundige team werkt, naast de reguliere diergeneeskundige aspecten in de kolonie, voortdurend aan verdere verfijning van methoden.

Naast de aandacht voor het welzijn van de dieren doet BPRC ook veel onderzoek naar verschillende aspecten die effect kunnen hebben op de gezondheid van de dieren. In 2017 hebben we een groot onderzoek afgerond naar de aanwezigheid van een specifieke bacteriestam (*Helicobacter*) in de magen van makaken. Andere onderzoeken gingen over het voorkomen van diabetes in Java-apen, het vaststellen van gezonde gewichten bij resus- en Java-apen en over de effecten van het dieet in marmosets.

Ethologie

BPRC voert ethologisch onderzoek uit in nauwe samenwerking met de Universiteit van Utrecht. Dit (niet-invasieve) fundamentele onderzoek richt zich op de evolutie van sociaal gedrag van primaten, ook in vergelijking met dat van de mens. Belangrijke onderzoekslijnen hierbij zijn seksueel gedrag, vriendschapsbanden, samenwerking, intelligentie en communicatie.

Bij dit onderzoek speelt de sociale capaciteit van de onderzochte soorten een belangrijke rol. Het kunnen omgaan met verschillende niveaus van complexiteit van deze sociale settings is een belangrijke determinant in de evolutie van de intelligentie van primaten. In 2017 hebben we verder gewerkt aan de specifieke aspecten van introducties van nieuwe fokmannen bij de resus- en Java-apen. Kennis over introducties draagt bij aan het verbeteren van het houden en fokken van deze dieren.

Details dierexperimenteel onderzoek

In 2017 heeft BPRC **21** studies verricht, waarbij we in totaal **315** proefdieren hebben ingezet.



Meer specifiek zijn er 232 resusapen ingezet in zestien studies, 42 Java-apen in twee studies, en 41 marmosets (ook bekend als witoorpenseelaapjes) in drie studies.

De experimenten binnen BPRC dienen de volgende doelen: toegepast translationeel onderzoek (preklinisch onderzoek, zoals de ontwikkeling van vaccins en geneesmiddelen) en fundamenteel wetenschappelijk onderzoek (met als doel een antwoord te krijgen op wetenschappelijke vragen). Tabel 1 geeft weer hoeveel dieren we voor de verschillende onderzoeksdoelen hebben ingezet.

Doelen	Resusapen	Java-apen	Marmosets
Toegepast translationeel onderzoek	172	16	11
Fundamenteel wetenschappelijk onderzoek	60	26	30

Tabel 1. Aantallen ingezette dieren per doel.

Een belangrijke factor voor het advies dat de IvD en de CCD/DEC geven, is het te verwachten ongerief voor de ingezette proefdieren (zie: *Dierexperimenten Commissie*). Daarnaast houden de IvD en de CCD/DEC bij het bepalen van het advies ook rekening met de duur van het ongerief.

Beide factoren zijn afhankelijk van de aard van het experiment. Hoe hoger en langer het te verwachten ongerief, des te zwaarwegender moeten de wetenschappelijke en volksgezondheidsbelangen zijn om het experiment te mogen uitvoeren. Ondanks dat ongerief moeilijk te kwantificeren is, gebruiken we de volgende categorieën (Annex VIII van directive 2010/63/EU):

Licht

zoals enkele bloedafnames,
maar ook onnatuurlijke
huisvesting

Matig

zoals vaccinaties,
PET/CT scan, meerdere
bloedafnames en milde
ziekteverschijnselen

Ernstig

zoals ernstige
ziekteverschijnselen van
aids of tuberculose

In tabel 2 is per diersoort het ontvangen ongerief gespecificeerd.

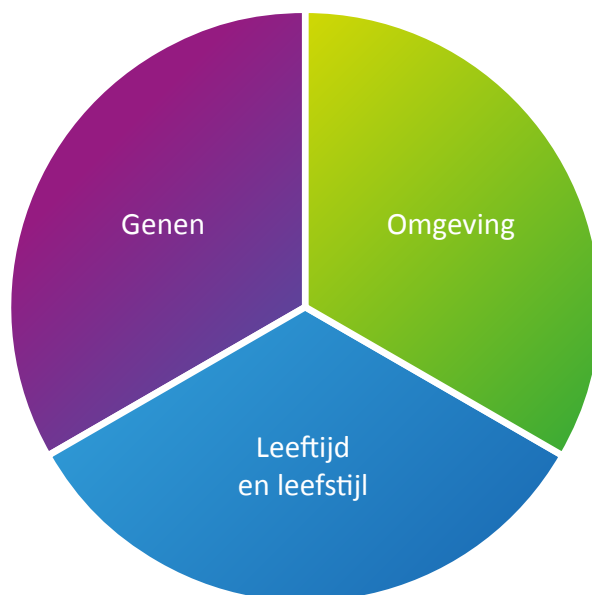
Ontvangen ongerief	Resusapen	Java-apen	Marmosets
Licht	103	26	38
Matig	128	16	3
Ernstig	1	0	0

Tabel 2. Ingeschat ongerief ondergaan door ingezette dieren.

Immunobiologie

Binnen de afdeling Immunobiologie werken we aan multiple sclerose (MS). MS is een chronische ziekte, waarbij het centrale zenuwstelsel (hersenen en ruggenmerg) wordt aangetast, wat uiteindelijk kan leiden tot blijvende invaliditeit. In Nederland komt MS voor bij één op de duizend mensen. Wereldwijd lijden ongeveer 2,5 miljoen mensen aan deze ziekte.

MS komt voor in een aantal varianten. De meest voorkomende vorm van MS is de relapsing-remitting-variant, die voorkomt in ongeveer 80% van de patiënten. Kenmerkend voor deze vorm zijn de aanvallen die komen en ook weer verdwijnen. In een groot deel van deze patiënten gaat de ziekte in de loop der tijd over in een progressieve variant. Ongeveer 15% van de patiënten hebben vanaf het begin progressieve MS. De oorzaak van MS is nog steeds onbekend en daardoor kan de ziekte nog niet worden genezen. Wel komen er steeds meer medicijnen beschikbaar, maar die werken niet voor alle patiënten en soms hebben ze ernstige bijwerkingen. De beschikbare medicijnen kunnen de uiteindelijke progressie van de ziekte alleen vertragen en niet voorkomen.



MS is een complexe ziekte, vermoedelijk veroorzaakt door de interactie tussen genetische factoren en omgevingsinvloeden. Hierdoor is het niet mogelijk de ziekte compleet na te bootsen in kweeksystemen. Proefdieren zijn nodig om onderzoek te doen naar het ontstaan en de progressie van MS, en om nieuwe behandelingen te testen. Een van de meest gebruikte diermodellen voor MS is EAE. Knaagdieren en apen zijn vatbaar voor deze ziekte.



EAE staat voor
Experimental
autoimmune
encephalomyelitis

Op de afdeling Immunobiologie doen we onderzoek naar mechanismes die betrokken zijn bij de progressie van de ziekte. Ook test deze afdeling nieuwe behandelingen voor MS op hun werkzaamheid en worden de werkingsmechanismes van bestaande medicatie onderzocht. Het EAE-model in de marmoset vertoont belangrijke overeenkomsten met MS, meer dan de gebruikte EAE-modellen in muizen of ratten.

Om het diermodel voor MS zo optimaal mogelijk in te zetten en te verfijnen, blijven we onderzoek doen naar de overeenkomsten en verschillen. In 2017 hebben we vooral onderzoek gedaan naar hoe de schade in de hersenen van marmosets met EAE overeenkomt met die van mensen met MS. Om dit te onderzoeken, maakten we gebruik van gearriveerd weefsel afkomstig uit vorige studies, zodat geen extra dieren nodig waren.

In 2017 heeft deze afdeling een EAE-studie gedaan met twintig marmosets, waarin een mogelijk nieuw medicijn voor MS is getest. We hebben onderzocht of het medicijn in staat is de klinische symptomen van EAE en de pathologie in het centrale zenuwstelsel te remmen of te stoppen. Daarnaast volgden we ook het effect van de behandeling op het immuunsysteem, door elke twee weken het bloed te onderzoeken en aan het eind van de studie ook de organen te analyseren.

Meer kennis van het werkingsmechanisme van nieuwe medicijnen kan bijdragen aan 1) het optimaliseren van de bestaande medicatie voor MS en 2) aan de ontwikkeling van nieuwe therapieën. In patiënten is dit onderzoek alleen mogelijk in bloed, maar in marmosets kunnen we ook andere organen van het immuunsysteem onderzoeken. In 2017 hebben we een bestaand medicijn voor MS getest in acht marmosets (zonder EAE). Het effect van dit medicijn op het immuunsysteem is twaalf weken lang gevolgd in het bloed. Aan het eind van de studie hebben we het resultaat in bloed vergeleken met de milt en lymfeklieren, die bij mensen dus niet beschikbaar zijn. Dit was een eerste stap in het onderzoek naar het werkingsmechanisme. In de toekomst doen we mogelijk een soortgelijke studie in dieren met EAE, omdat die meer lijken op mensen met MS.

Virologie

Binnen de afdeling Virologie vindt onderzoek plaats met als doel ontwikkeling van geneesmiddelen en vaccins voor verschillende voor de mens gevaarlijke virale infecties. Hierbij maken we onderscheid tussen seksueel overdraagbare (chronische) virale infecties (HIV), respiratoire virale infecties (Influenza) en virussen die door insecten - zoals vliegen, teken en muggen - worden



overgedragen. Deze laatste groep virussen (zgn. Arbo virussen) bevat klinisch belangrijke virussen, zoals *gele koorts virus*, *chikungunya-virus*, *Rift Valley Fever-virus*, *Japanse encefalitis-virus*, *westnijlvirus*, *denguevirus* en het recent veelbesproken *zikavirus*.

Seksueel overdraagbare virussen

Ondanks de sterk verbeterde medicijnen zijn in 2017 naar schatting rond de één miljoen mensen overleden aan de gevolgen van een HIV-infectie. Een vaccin dat beschermt tegen HIV-infectie zou een enorme stap vooruit zijn.

In 2016 heeft BPRC een tweetal HIV-vaccinstudies gestart, die doorliepen tot in 2017. In de eerste studie hebben we - in samenwerking met onderzoekers van het Academisch Medisch Centrum in Amsterdam - een experimenteel HIV-vaccin getest. Dit is een zogenaamde effectiviteitsstudie. Naast het in kaart brengen van de immuunresponsen, keken we ook naar de effectiviteit van de opgewekte immuunresponsen. Dit was mogelijk door de dieren een HIV-achtig virus toe te dienen en te analyseren of het vaccin beschermt tegen infectie. De resultaten van deze studie lieten zien dat het vaccin goede immuunresponsen kon opwekken, maar dat deze responsen toch geen bescherming blijken te bieden tegen het HIV-achtig virus. Alhoewel veelbelovend, dient het vaccin dus nog verder verbeterd te worden.

De tweede studie is een immunogeniciteitsstudie. Dit betekent de uitvoering van een zeer gedetailleerde analyse van de door een vaccin opgewekte immuunresponsen. Deze studie is uitgevoerd als onderdeel van een omvangrijk consortium, gesubsidieerd door de EU. In deze studie vergeleken we verschillende vaccinkandidaten met elkaar. De daaruit opgewekte immuunresponsen bleken zo goed dat één van de vaccinkandidaten verder zal worden getest in een klinische studie.

Respiratoir overdraagbare virussen

Infecties met het influenzavirus leiden wereldwijd jaarlijks tot zo'n drie tot vijf miljoen ernstige ziektegevallen. Tussen de 200.000 en 500.000 mensen overlijden jaarlijks ten gevolge van de infectie. Griepvaccinatie kan zowel het aantal ziektegevallen als de ernst van de infectie sterk terugdringen. Met nieuwe vaccins kunnen we naar verwachting nog betere resultaten behalen.

In 2016 zijn we gestart met een immunogeniciteits-/effectiviteitsstudie waarbij we nieuwe, potentiële influenzavaccins testen. De EU subsidieert deze studie, die BPRC uitvoert in samenwerking met meerdere Europese partners. Hoewel het nieuwe vaccin blijf gaf van goede immuunrespons tegen een breed scala aan influenzavirussen, was dit resultaat onvoldoende om bescherming te bieden tegen een sterk afwijkend pandemisch virus. Om beter inzicht te krijgen in welke typen immuunresponsen ontstaan na influenzavirus-infectie en -vaccinatie hebben we een aantal nieuwe laboratoriumtesten opgezet. Deze testen tonen aan dat er meerdere manieren zijn om een virusinfectie te remmen met de door infectie en vaccinatie opgewekte antistof-respons. Recent hebben we een AiO aangesteld om deze antistof-responsen nader te onderzoeken.

Muggen-overdraagbare virussen

De huid is het grootste orgaan en doorgaans een effectieve barrière tegen ziekteverwekkers uit onze leefomgeving. Muggen zijn echter in staat deze barrière te doorbreken. Voor een bloedmaaltijd maken zij een gaatje in de huid, zodat ze op zoek kunnen gaan naar een klein bloedvat. Om te voorkomen dat het bloed meteen stolt, spugen ze een kleine hoeveelheid speeksel uit. Dit speeksel kan verschillende ziekteverwekkende parasieten en virussen bevatten.



Tijgermug

Wereldwijd sterft één op de zeventien mensen aan de indirecte gevolgen van een muggenbeet. Het overgrote deel komt door de malariaparasiet (zie ook afdeling *Parasitologie*), maar muggen-overdraagbare virussen - zoals westnijl, dengue, gele koorts, chikungunya en zika - winnen snel terrein.

In de afgelopen jaren heeft de afdeling Virologie veel kennis opgedaan via experimentele infecties van makaken met het westnijlvirus - dat encefalitis (hersenontsteking) kan veroorzaken - en met het denguevirus, de veroorzaker van knokkelkoorts. Het denguevirus-infectiemodel in resusapen is in het afgelopen jaar verder ontwikkeld en zal worden gebruikt in het onderzoek naar antivirale middelen tegen dit virus.

De recente uitbraak van het zikavirus in Zuid-Amerika heeft laten zien hoe groot zowel de sociale als economische impact kan zijn. Dit was de aanleiding om ook een zika-infectiemodel in resusapen op te zetten. Een zestal dieren werd geïnfecteerd met het zikavirus. In het bloed van de dieren vonden wij een hoeveelheid virus vergelijkbaar met dat in geïnfecteerde personen. Na één tot twee weken was het virus weer uit de bloedcirculatie verdwenen. De apen vertoonden, net als bij de meeste geïnfecteerde personen, geen duidelijke klinische verschijnselen. Het verwerken en analyseren van verschillende verzamelde weefsels is recentelijk afgerond. Een zikavirus-vaccinstudie start eind 2018 of begin 2019. Daarnaast is dit zika-infectiemodel bruikbaar om potentiële zika-geneesmiddelen te testen op hun werkzaamheid.

Onderzoek naar nieuwe manier van vaccineren

Vaccineren is de meest doeltreffende en kosteneffectieve manier om mens en dier te beschermen tegen infectieziekten. Soms wordt hiervoor een verzwakte vorm van de ziekteverwekker gebruikt. In andere gevallen een eiwit dat van de buitenkant van het virus of bacterie afkomstig is. Beide manieren bieden veel voordelen, maar hebben ook een aantal nadelen. Zo moeten deze vaccins bijvoorbeeld altijd koel bewaard blijven. In de westerse wereld geen probleem, maar in andere delen van de wereld wel. Daarom wordt wereldwijd gezocht naar nieuwe manieren om te vaccineren zonder dat die 'koude-lijn' nodig is. Een van de mogelijkheden is DNA te gebruiken in plaats van, bijvoorbeeld, eiwit.

In samenwerking met verschillende Europese partners zet de afdeling virologie zich in om dit type vaccins te ontwikkelen en te optimaliseren. In 2017 hebben we daarvoor een experiment uitgevoerd met een nieuw vaccin voor het gele koortsvirus. De resultaten van dit experiment lieten zien dat het vaccin kan werken, maar dat verdere ontwikkeling nog nodig is. Dit onderzoek loopt door in 2018.

***In vitro* onderzoek muggen-overdraagbare virussen**

Kenmerkend voor infecties met muggen-overdraagbare virussen is een grote variatie in ziekteverloop. De meeste mensen hebben geen klinische klachten, zo'n twintig procent van de geïnfekteerde personen krijgt milde klachten, en een klein deel van de geïnfekteerde mensen vertoont zeer ernstige ziekteverschijnselen met soms dodelijke afloop. Tot nu toe is er weinig bekend over de gecompliceerde interactie tussen de mug, het virus en de mens. Vroege gebeurtenissen na infectie kunnen een belangrijke rol spelen in de verspreiding van het virus van de huid naar andere organen, en zo het ziekteverloop beïnvloeden.



Meer weten over
in vivo en *in vitro*?
lees meer op
pagina 4 onderaan.

Bij de eerdergenoemde *in vivo*-onderzoeken lag de focus op hoe het virus zich via het bloed door het lichaam verspreidt. Daarnaast is de interactie onderzocht tussen het virus en het zogenaamde systemische immuunsysteem, de afweercellen in het bloed. In 2016 heeft de afdeling Virologie geïnvesteerd in het opzetten van een zogenaamd huid-explant-model.

Wat speelt zich direct na de muggenbeet af in de huid? Door middel van *in vitro*-kweektechnieken hebben we in 2016 een begin gemaakt met het beantwoorden van deze vraag; door huidbiopten van donorapen te infecteren met muggen-overdraagbare virussen. Moderne immunohistochemische kleuringen en moleculaire technieken maken de vroege voortgang van de infectie zichtbaar.

Momenteel zijn we bezig deze technieken te optimaliseren en te standaardiseren. Hiermee hopen we inzicht te krijgen in het ziekteverloop van muggen-overdraagbare infecties, waarmee nieuwe behandelmethoden ontwikkeld zouden kunnen worden. Een recent aangestelde AiO is begonnen met het opzetten van hersenweefselkweken om te onderzoeken 1) hoe verschillende muggen-overdraagbare virussen in staat zijn hersencellen te infecteren en 2) of er verschillen zijn in infectie tussen de verschillende virussen.

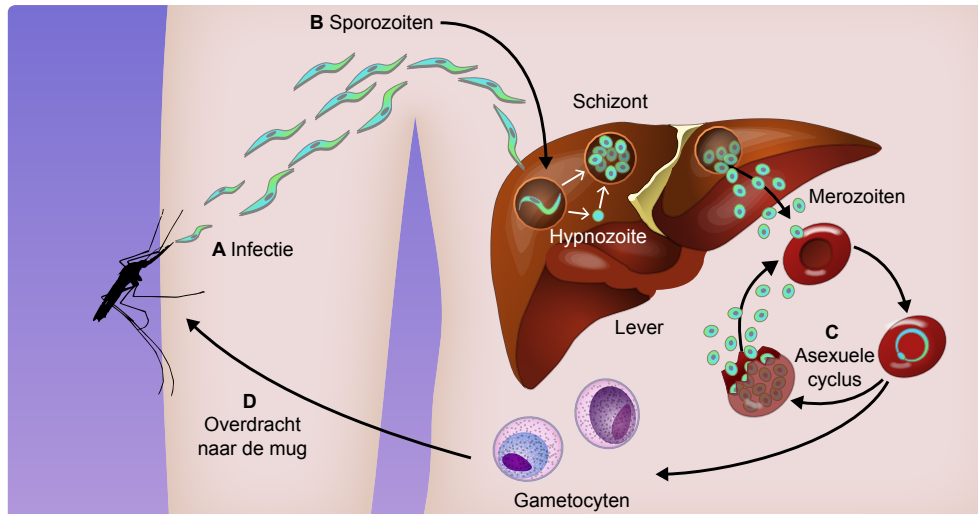
Virale diagnostiek

Bij de afdeling Virologie komen ieder jaar opnieuw meer aanvragen binnen voor onze diagnostische service unit. Dierentuinen, opvangcentra en onderzoekscentra uit binnen- en buitenland doen een beroep op deze unit voor virusbepalingen in bloedmonsters van hun apen. Onze expertise op dit gebied wordt wereldwijd erkend, en wij hopen zo bij te kunnen blijven dragen aan een goede gezondheid van apen wereldwijd. Onze medewerkers verspreiden onze kennis hierover op diverse bijeenkomsten in zowel binnen- als buitenland.

Parasitologie

Binnen de afdeling Parasitologie wordt gewerkt aan malaria en tuberculose. Malaria is een groot probleem in vele landen. De malariaparasiet, die wordt overgebracht door muggen, maakt voornamelijk slachtoffers in de minder ontwikkelde landen in de tropen en subtropen en eist tot wel 500.000 dodelijke slachtoffers per jaar.

De behoefte aan vaccins en nieuwe geneesmiddelen is sterk. BPRC doet onderzoek naar beide, met een focus op de een na belangrijkste malaria-parasiet die mensen ziek maakt. Deze parasiet maakt niet zoveel dodelijke slachtoffers als de belangrijkste malariaparasiet, maar mensen worden er wel ernstig ziek van. Deze parasiet heeft een unieke eigenschap, die alleen voorkomt bij een kleine groep van malariaparasieten, die alleen mensen en apen besmetten. Na een muggenbeet vormen zich slapende parasieten (hypnozoïten) in de lever en die zijn ongevoelig voor bijna alle malaria-geneesmiddelen. Onderzoek aan deze slapende parasieten is hard nodig, zodat we nieuwe medicijnen kunnen maken, en mogelijk ook vaccins om de parasiet aan te pakken.



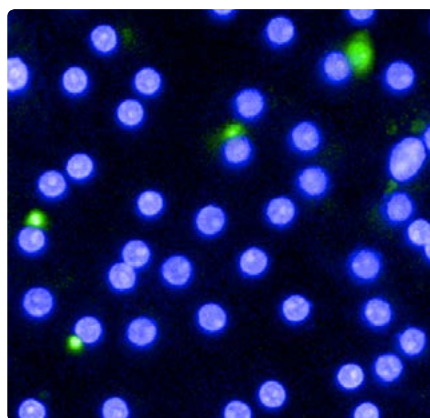
Levenscyclus van malariaparasieten.

In de afgelopen jaren zijn nieuwe, veelbelovende experimentele methodes ontwikkeld om bescherming tegen de dodelijke vorm van malaria op te wekken. Zo is bij experimenteel onderzoek in dieren en mensen aangetoond dat experimenteel vaccineren met levende parasieten uit de malariamug langdurige bescherming kan geven tegen besmetting; vooral wanneer de vaccinatie zo wordt uitgevoerd dat de malariaparasiet, nadat hij de lever heeft besmet, niet in het bloed kan uitgroeien. Dit gebeurt normaal gesproken wel,

maar wordt voorkomen door tijdens de vaccinatieperiode antimalariamiddelen te geven, die alleen de bloedstadia doden en niet de leverstadia.

Deze methode is echter nog nooit 'uitgetest' op de parasiet die slapende levervormen maakt. In 2017 hebben wij een experiment gedaan waarin we deze manier van vaccineren in resusapen hebben getest met een apenmalaria parasiet die ook slapende vormen maakt. We werken met resusapen, omdat die nauw verwant zijn aan de mens en omdat ze de natuurlijke gastheer zijn van malariaparasieten, die ook de mens kunnen infecteren. We vaccineren de apen met parasieten uit de mug, terwijl ze voortdurend malariamedicijnen krijgen, die alleen de parasieten in het bloed doden, niet in de lever. Aan het eind van het experiment worden de dieren besmet via muggenbeten. Nadat is gebleken of dieren beschermd zijn tegen deze experimentele besmetting, nemen we monsters van belangrijke organen om in detail de afweerreactie in die organen te bestuderen. De apen worden geëuthanaseerd, om een zo compleet mogelijk beeld van de reacties in alle belangrijke organen te verkrijgen.

In 2017 is ook ons onderzoek naar nieuwe geneesmiddelen tegen de slapende vormen doorgegaan. Hiervoor besmetten we resusapen met de parasiet, om muggen te kunnen voeden met besmet bloed. De parasieten uit de mug gebruiken we dan om in een kweekstelsel levercellen te besmetten, waarop we geneesmiddelen kunnen testen. In dit onderzoek hebben we ook resusapen besmet met een nieuwe parasietsoort, die ook slapende stadia in



Malariaparasieten (groen) in levercellen.

de lever vormt. Maar de bloedvorm van de parasiet kunnen we in flesjes kweken. Als we de leverstadia van deze parasiet goed hebben gekarakteriseerd, moet blijken of we deze parasiet in ons geneesmiddelenonderzoek kunnen gebruiken. Dan zouden we voor het testen van nieuwe geneesmiddelen in de beginfase geen apen meer nodig hebben om muggen te besmetten.

Ten slotte hebben we in 2017 resusapen besmet in het kader van ons onderzoek naar de biologie van slapende levervormen. We hebben parasieten aangepast, zodat we ze gedurende een periode in levercellen kunnen volgen. Zodoende kunnen we nauwkeurig bestuderen wat met de parasieten gebeurt in vergelijking met niet- slapende leverparasieten. Deze kennis kunnen we gebruiken om in de toekomst gericht nieuwe geneesmiddelen te maken.



Mtb staat voor
Mycobacterium
tuberculosis

Tuberculose (TB), veroorzaakt door bacteriën van de soort *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) of verwante soorten, is op wereldwijde schaal nog steeds een van de meest, zo niet, dé meest bedreigende infectieziekte. Naar schatting zijn wereldwijd circa 2 miljard mensen (latent) drager van *Mtb*, dus zonder ziek te zijn. Maar helaas sterven meer dan 4.500 mensen per dag (!) aan de directe gevolgen van deze ziekte. Tuberculose staat in de top-10 van doodsoorzaken wereldwijd.

Behandeling van TB met antibiotica als de geijkte geneesmiddelen tegen bacteriële infectie, is moeizaam in die zin 1) dat een kuur minimaal zes maanden tot ruim meer dan een jaar in beslag neemt om werkzaam te zijn en aanzienlijke bijwerkingen geeft, 2) dat werkzaamheid niet is gegarandeerd (in 10 tot 20% van de gevallen komt TB binnen een jaar terug), en 3) dat antibioticum-resistentie (anti-microbial resistance, AMR) een groeiend probleem is. Van alle AMR-gevallen in de wereld wordt naar schatting een kwart aan *Mtb* toegewezen. De frequentie van extreme resistentie tegen verscheidene antibiotica tegelijk neemt bovendien toe.



BCG staat voor
Bacille Calmette-Guérin

Het is mogelijk om preventief te vaccineren. Bijna honderd jaar geleden hebben de Franse onderzoekers Albert Calmette en Camille Guérin het *M.bovis* Bacille Calmette-Guérin, kortweg BCG, ontwikkeld. BCG wordt wereldwijd toegepast in vaccinatieprogramma's voor pasgeborenen en redt naar schatting meer dan honderdduizend kinderlevens per jaar, maar schiet dus te kort om het grote aantal slachtoffers van TB - circa tien miljoen nieuwe ziektegevallen per jaar - terug te dringen. Met oog op de zorg voor de globale gezondheid, mag duidelijk zijn dat tuberculose en de ontwikkeling van nieuwe therapieën onze aandacht verdienen. Het feit dat in het jaar 2018 een speciale vergadering van de Verenigde Naties aan tuberculose wordt gewijd, onderschrijft deze noodzaak.

De tuberculose bacil is met een bijzondere celwand en wel 4.000 genen in zijn erfelijk materiaal uitermate goed uitgerust om het afweersysteem (het immuunsysteem) van zijn menselijke gastheer te ontwijken, of zodanig te manipuleren dat hij buiten schot blijft. Wetenschappelijk onderzoek heeft al vele inzichten opgeleverd over de diverse mechanismen die, enerzijds, de bacterie in zijn voordeel gebruikt en die, anderzijds, de mens nodig heeft om de infectie succesvol te kunnen bestrijden.

Toch is ons inzicht nog niet compleet. Er is onvoldoende kennis van de complexe reacties om nieuwe therapieën met gegarandeerde werkzaamheid 'op de tekentafel' te ontwerpen. Waar we met verder diepgaand onderzoek

moeten proberen de interactie tussen gastheer en *Mtb* beter te begrijpen, moet de werkzaamheid van nieuwe therapieën proefondervindelijk worden vastgesteld. Het gebruik van proefdieren bij ons onderzoek aan deze ziekte en bij de ontwikkeling van nieuwe therapieën tegen TB is vooralsnog onvermijdelijk. Dat heeft te maken met het ontbreken van alternatieven die dergelijke hoog-complexe interacties nabootsen en door allerlei beperkingen van wat in onderzoek met mensen mogelijk is.

Niet-humane primaten (NHP), en in dit geval makaken (*Macaca species*), vormen uitstekende modellen voor tuberculose-onderzoek. Ze zijn van nature gevoelig voor *Mtb*-infectie, ze vertonen zeer grote gelijkheid qua TB-ziekteontwikkeling, en hun afweersysteem vertoont grote overeenkomsten met dat van de mens. Op grond daarvan wordt aan het experimentele onderzoek in NHP een grote voorspellende waarde voor klinische uitkomst toegekend. BPRC, met zijn erkende, bijzondere expertise op het gebied van tuberculose-onderzoek in NHP, werkt in vele facetten van zijn onderzoeksprogramma samen met onderzoekers en organisaties in binnen- en buitenland.

In het jaar 2017 hebben onze activiteiten zich grotendeels toegespitst op een drietal hoofdlijnen.

1. Het bestuderen van de beschermende werking van diverse toedieningsregimes van virale vectoren, die mycobacteriële antigenen tot expressie brengen als preventieve vaccins.
2. Het implementeren van een geavanceerde PET/CT-beeldvormingsprocedure voor verfijnde TB-diagnostiek gedurende onze experimentele infectiestudies.
3. Het beproeven van een alternatieve BCG-toedieningsroute en een alternatieve experimentele infectiemethode om niet alleen bescherming tegen ziekte, maar ook bescherming tegen infectie *à priori* te kunnen waarnemen.

Voor alle TB-gerelateerde onderzoeksactiviteiten aan BPRC zijn in 2017 in totaal 87 resusapen geregistreerd.

Ad 1: voor deze eerste activiteit hebben we in 2017 de zogenaamde *in vivo*-fase van een omvangrijk experiment met 60 resusapen afgerond, terwijl de analyse van alle samples en meetgegevens nog geruime tijd doorgaat.

Naast de nodige controles, hebben we in vier behandelgroepen het effect onderzocht van virale vaccin vectoren, die zijn gebaseerd op uit chimpansee geïsoleerd adenovirus (ChAd) en het pokkenvirus Modified Vaccinia Virus Ankara (MVA). De vectoren zijn elk al eerder aangetoond veilig te zijn voor

toepassing in de mens. In onze preklinische studie zijn de vector-vaccins in wisselende combinaties - zogenaamde heterologe prime-boost regimes - parenteraal in de spier of via een mucosale route, in de long, toegediend. Alle vaccinatiestrategieën versterkten immuunreacties, die afhankelijk van toedieningsroute sterker in het bloed of in de long zichtbaar waren. Maar geen van deze behandelingen bleek de ziekte statistisch significant terug te dringen vergeleken met niet-behandelde controles. Opmerkelijk genoeg leek toediening uitsluitend via spierweefsel wel tot minder ziekte te leiden in vergelijking tot een volledig mucosaal toedieningsregime. Dit laatste is een onverwacht resultaat, dat mogelijk te maken heeft met de aard van de betreffende vector(en).

Ad 2: de implementatie van een procedure voor PET/CT-beeldvorming is uitgevoerd in resusapen uit de hiervoor genoemde studie (evenals de hierna te noemen studie). Met hulp van collega's in een internationaal samenwerkingsverband, de Collaboration for Tuberculosis Vaccine Discovery, CTVD, hebben we de ontwikkeling van TB over de tijd kunnen registreren met signalen in de lijn van andere grootheden waaraan we de mate van ziekte uitlezen (zoals pathologie en mycobacteriële groei, beide aan het eind van de studie).

Ad 3: voor de derde onderzoeksactiviteit hebben we in 24 resusapen een alternatieve infectiemethode uitgetest. Van patiënten wordt verondersteld dat zij na herhaalde blootstelling - de inademing van infectieuze partikels afkomstig van een ziek persoon uit hun directe omgeving - geïnfecteerd zijn geraakt. Voor experimentele infectie passen we gewoonlijk een enkele dosis toe, zodanig dat alle niet-behandelde dieren in één keer geïnfecteerd raken en de ziekte zich kan ontwikkelen. Hiermee voorkomen we de inzet van onnodig veel dieren, die uiteindelijk toch niet bruikbaar zijn om enig behandelings-effect aan af te lezen (vermindering).



PET/CT scans van de longen van met tuberculose geïnfecteerde resusapen.

Links: Een grote mate van ontsteking als gevolg van tuberculose infectie is te zien in de longen van een niet-gevaccineerde resusaap uit de controlegroep. Midden: BCG vaccinatie via de huid leidt tot minder ontsteking in de long na tuberculose infectie. Rechts: Vaccinatie met BCG via de long verbetert het effect van standaard BCG vaccinatie.

In onze opzet in 2017 hebben we, bij gelijkblijvende groepsgrootte, niet één enkele infectiedosis toegepast, maar een herhaalde blootstelling met de laagst mogelijke dosis *Mtb*, zodanig dat uiteindelijk alle niet-behandelenden geïnfecteerd raakten. We veronderstelden dat deze infectiewijze de natuurlijke infectie beter nabootst. Bovendien hoopten we met deze proefopzet na vaccinatie niet alleen een beschermend effect door terugdringing van ziekte te kunnen meten, maar nu ook bescherming tegen de infectie per se. In lijn met de verwachte uitkomst, vonden we inderdaad dat het bekende BCG-vaccin - mits toegediend in de longen en niet, zoals gebruikelijk, in de huid - statistisch significante bescherming kan bieden tegen tuberculose-infectie. Voor zover wij weten, is met dit experiment voor het eerst aangetoond dat infectie van de zeer gevoelige resusapen door vaccinatie is te voorkomen.

Een vergelijkbaar model van herhaalde lage dosis-infectie (repeated low dose (RLD) challenge) is eerder ook in aapexperimenten met HIV met succes toegepast, maar is hiermee nu ook beschikbaar voor het TB-onderzoeksveld. Hoewel nog tal van aspecten in verder onderzoek moeten worden gestaafd, gaf het RLD-infectiemodel een verfijnder ziektebeeld. Dus minder ongerief, en een groter oplossend vermogen voor het meten van immuunreacties die ons helpen de bescherming door vaccinatie beter te begrijpen. Dit onderzoek loopt in de komende jaren en zeker in 2018 verder.

Mucosale toediening in de long, zoals toegepast in ons experiment, kan niet direct in de kliniek worden gebruikt. Wel geeft ons onderzoek een positief signaal en biedt het voldoende aanknopingspunten om hoopvol te zijn dat we het huidige intradermale BCG-vaccinatieregime in de toekomst kunnen verbeteren, zodat tuberculose en het aantal slachtoffers uiteindelijk kan worden teruggedrongen.

Vergelijkende Genetica en Verfijning (CG&R)

De afdeling Vergelijkende Genetica en Verfijning (CG&R) doet onderzoek naar de genetische kenmerken van verschillende apensoorten, met als doel de verfijning van proefdierkundig onderzoek. Voor het bepalen van de genetische kenmerken is het noodzakelijk het erfelijk materiaal, ofwel DNA te isoleren. DNA-moleculen zijn lange ketens, gevormd door vier verschillende chemische bouwstenen, ofwel nucleotiden. Een gen is een deel van het DNA, dat binnen een cel wordt vertaald naar een eiwit. De eiwitten vormen het besturings-systeem van de chemische processen in een cel en bepalen daarmee alle kenmerken van een organisme. De nucleotide volgorde van genen kan per individu verschillen, en is erfelijk. Het onderzoek van de afdeling is voornamelijk gericht op het bepalen van de nucleotide volgorde van MHC- en KIR-genen. Eiwitten van het MHC spelen een belangrijke rol in de immunologische afweer tegen ziekteverwekkers. Eiwitten van KIR scannen voor de aan- of afwezigheid van MHC-eiwitten op cellen van het immuunsysteem, bijvoorbeeld, als gevolg van kanker of virusinfectie. Zij zorgen dat deze ‘verkeerde’ of geïnfecteerde cellen worden opgeruimd uit het lichaam. Hiernaast doet de afdeling ook onderzoek naar de functionele karakteristieken van MHC-eiwitten. De genetische en functionele informatie over het MHC en KIR worden gebruikt om dieren te selecteren voor biomedische onderzoek, en dragen derhalve bij aan de verfijning van proefdiermodellen.



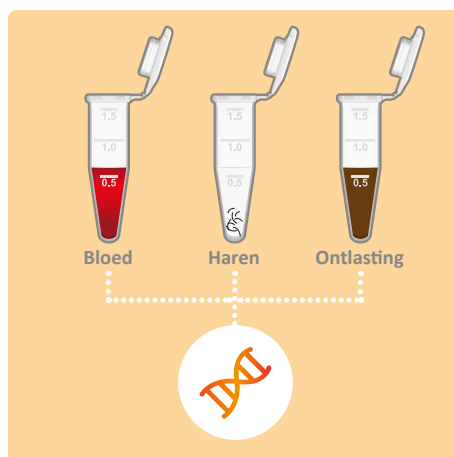
DNA staat voor Deoxyribonucleic acid. De vier verschillende chemische bouwstenen zijn adenine (A), cytosine (C), guanine (G), en thymine (T)



MHC staat voor Major Histocompatibility Complex.



KIR staat voor Killer cell Immunoglobulin-like receptor



Voor het genetisch onderzoek nemen we tijdens de jaarlijkse gezondheidscontrole van elk dier in de kolonie een bloedmonster af. Daaruit isoleren we het erfelijk materiaal, DNA. Ook verricht de afdeling genetisch onderzoek voor andere instituten en dierentuinen, waarbij we DNA verkrijgen op niet-invasieve wijze (zoals uit haar of ontlasting). Op deze manier kunnen we dus ook onderzoek uitvoeren voor met uitsterven bedreigde diersoorten.

Dankzij die gegevens zijn antwoorden mogelijk op vragen over ouderschap, inteelt en de afname van genetische variatie van bepaalde genen. Dit laatste is belangrijk, omdat die afname een aanwijzing kan zijn voor de toename van bepaalde ziektes binnen een primatenpopulatie. De kwaliteit van dergelijk DNA en de daaruit verkregen hoeveelheid informatie, zijn echter beperkt.



STR staat voor Short Tandem Repeat, en zijn vaak 2, 3, of 4 nucleotiden lang en worden gemiddeld 10 tot 100 keer herhaald, b.v. CACACA.

Een snelle en robuuste manier van MHC-typing die de afdeling in het verleden heeft ontwikkeld, is de DRB-STR-methode. De lengte van deze STR, aanwezig in intron 2 van het MHC-DRB-gen, is zeer variabel. In een populatie blijken de verschillende DRB-STR-lengten bovendien te segregeren met de aanwezige genetische variatie. Recent hebben we met deze methode de MHC-DRB-variatie bepaald in een populatie van zilvergibbons én in een grote populatie van groene bavianen. [Lees hier de publicatie](#). Deze nieuwe resultaten onderbouwen het nut en de toepasbaarheid van de methode voor conservatie biologie, moleculaire ecologie, en kolonienmanagement; in het bijzonder voor met uitsterven bedreigde diersoorten.

Een van de primatensoorten die wereldwijd gebruikt wordt voor biomedisch onderzoek naar infectieziekten (zoals aids, malaria, en tuberculose) en chronische ziekten (zoals reuma en multiple sclerose) is de resusaap. Jarenlang MHC-onderzoek in deze diersoort heeft uitgewezen dat bepaalde MHC-genen in de resusaap ten opzichte van de mens gedupliceerd zijn. Één van deze genen, het Mamu-A2*05-gen, is weinig variabel en het eiwit komt – vergeleken met eiwitten gecodeerd door andere MHC-genen - maar weinig voor op de oppervlakte van een cel. Men vermoedt daarom dat het door Mamu-A2*05 gecodeerde eiwit misschien een speciale functie vervult, mede omdat in andere nauw verwante soorten een soortgelijk gen is aangetoond.

Met behulp van verschillende technieken hebben we onderzoek gedaan naar de functionele karakteristieken van het Mamu-A2*05-eiwit. [Lees hier de publicatie](#). Mamu-A2*05 blijkt functionele eigenschappen te delen met het in de mens voorkomend MHC, HLA-B*27, en met een ander resusaap MHC, Mamu-B*008, die respectievelijk een rol spelen in de controle van het HIV-virus en een soortgelijk virus. Resusapen staan bekend om hun verschillende retrovirale infecties en de aanwezigheid van endogene retrovirussen. Daarom zou het goed kunnen dat het Mamu-A2*05-eiwit een speciale functie vervult, zoals het scannen voor de activatie van retrovirussen, die al gedurende een lange periode aanwezig zijn in deze soort.

Alternatieven

Binnen de Unit Alternatieven vindt wetenschappelijk onderzoek plaats met als doel het vervangen, verminderen of verfijnen (de 3V's) van dierexperimenteel onderzoek. Het onderzoek binnen de Unit Alternatieven is georganiseerd langs twee hoofdlijnen. Daarnaast fungeert de Unit Alternatieven als centrale communicatiebron voor de onderwerpen die te maken hebben met alternatieven voor dierproeven binnen BPRC. Tevens draagt deze unit actief bij aan het publieke debat over dierproeven en de alternatieven daarvoor. De publicatie van dit proefdierkundig jaarverslag is daar een voorbeeld van.

De eerste onderzoekslijn binnen de unit is gericht op het ontwikkelen van nieuwe *in vitro*-methoden. Door, bijvoorbeeld, kweekmethoden op te zetten voor verschillende celtypen (door primaire celkweek of stamceltechnologie) kunnen we kandidaat-teststoffen of strategieën op deze celkweken testen op werkzaamheid, voordat we ze eventueel in een proefdier testen. Binnen het instituut noemen we dit de pre *in vivo*-testfase. We hebben hiermee al verschillende kandidaat-stoffen uitgeselecteerd, waardoor minder dierproeven nodig waren.



Onze celkweken worden meestal opgezet vanuit bloed, of stukjes dierlijk of menselijk materiaal, verkregen uit biopten, of van overleden donoren. Belangrijk uitgangspunt daarbij is dieren nooit specifiek geofferd worden voor de start van deze kweken, maar dat het altijd gaat om dieren die vanwege ouderdom of beëindiging van een ander experiment geëuthanaseerd zijn. In tegenstelling tot cellijnen zijn deze kweeksystemen vaak kortdurend en eindig.

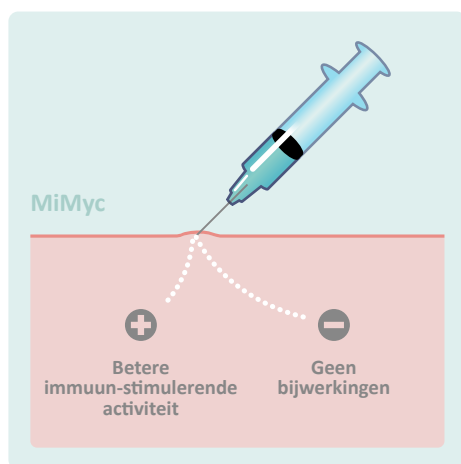
Toch hebben deze primaire celkweken vaak een betere voorspellende waarde dan cellijnen. Daarom is het de tijd en moeite waard deze kweek bij herhaling op te zetten. Het belangrijkste voordeel van cellijnen, hun onsterfelijkheid, is namelijk tevens hun belangrijkste nadeel. Onsterfelijke cellijnen verliezen na verloop van tijd hun cel-specifieke eigenschappen. En dan lijken ze nog het meest op tumorcellen, waardoor het testen van bepaalde ideeën of behandelingsmethoden niet goed meer mogelijk is. Het ultieme doel is de diermodellen uiteindelijk geheel te kunnen vervangen door *in vitro*-methoden.

Wij hebben de afgelopen jaren technologieën ontwikkeld die het mogelijk maken om met name cellen op te kweken uit het centraal zenuwstelsel (astrocyten en microglia) én cellen die een belangrijke rol spelen in het immuunsysteem (macrofagen en dendritische cellen uit bloed en beenmerg). Een van de belangrijke voordelen van deze technieken is dat we cellen van verschillende oorsprong, maar wel uit dezelfde donor, op deze manier met elkaar kunnen vergelijken.

In 2017 hebben we een AiO aangenomen om nieuwe, betere celkweekmethoden voor cellen uit het brein (en dan met name de microglia, de afweercellen van het brein) op te zetten. De afgelopen jaren hebben we enorm veel geleerd over de oorsprong en ontwikkeling van deze microglia. Ze blijken voort te komen uit een heel ander type voorlopercel dan lang werd aangenomen. Ook zijn vanuit verschillende laboratoria data gekomen die laten zien dat microglia in het gezonde brein een heel specifiek, karakteristiek RNA- en eiwitexpressiepatroon bevatten. Deze expressiepatronen kunnen ons helpen bij het opzetten van kweeksystemen die ervoor zorgen dat gekweekte cellen datzelfde expressiepatroon hebben.

De tweede onderzoekslijn is gericht op verfijning van dierexperimenteel onderzoek binnen het instituut. Om het immuunsysteem extra te activeren, wordt bij mensen en proefdieren vaak gebruik gemaakt van hulpstoffen (adjuvantia). Helaas gaat het injecteren van adjuvantia vaak gepaard met ongewenste bijwerkingen, zoals ontstekingen van de huid op de injectieplaatsen. Binnen de unit werken we op verschillende manieren aan de ontwikkeling van nieuwe adjuvantia met vergelijkbare immuun-stimulerende werking, maar met minder of geen bijwerkingen.

Om de gewenste immuun-stimulerende effecten van adjuvantia te bestuderen, hebben we *in vitro*-biologische testsystemen ontwikkeld, op basis van menselijke cellijnen: bioassays. Om de ongewenste bijwerkingen van adjuvantia te bestuderen, hebben wij in de afgelopen jaren een *in vitro*-kweekmodel opgezet, waarvoor we menselijk bloed gebruiken. Beide technieken zijn volledig proefdiervrij en hebben ertoe geleid dat we zelf een nieuw adjuvant konden samenstellen ("MiMyc"), dat een zeer krachtig immuun-stimulerend effect zou moeten geven, zonder de bijwerkingen die we bij andere adjuvantia zien.



In 2017 hebben we een *in vivo* experiment uitgevoerd, waarbij we de immuun-stimulerende activiteit van MiMyc hebben bestudeerd. Daartoe injecteerden we bij negen resusapen kleine hoeveelheden adjuvantia in de huid - op verschillende plekken op de rug -, waaronder Mimyc, in twee verschillende doses. Vervolgens volgden we of zich ontstekingsreacties voordeden en die hebben we in kaart gebracht. Verder bepaalden we

wekelijks via het bloed van de dieren in hoeverre het immuunsysteem was geactiveerd. De dieren zijn verder niet ziek geworden.

De resultaten laten zien dat injectie met MiMyc ook *in vivo* immuun-stimulerende activiteit heeft, en dat die in sterkte vergelijkbaar is met immuun-stimulerende activiteit die wordt opgewekt door adjuvantia die wel bijwerkingen geven. Ook laten de resultaten zien dat het gebruik van een hogere dosis van MiMyc niet leidt tot bijwerkingen, maar wel tot een sterkere immuun-stimulerende activiteit. Deze zeer hoopvol stemmende resultaten bevestigen nog niet dat MiMyc het huidige adjuvant kan vervangen. Komend jaar willen we een nieuw *in vivo*-experiment uitvoeren, met als doel dat te testen. Dat zou de laatste stap in dit proces zijn en binnen BPRC een grote verfijning betekenen van het proefdierkundig onderzoek.



Lees meer op
vac2vac.eu

In 2017 hebben we onze hierboven beschreven bioassays ook gebruikt in een Europees onderzoeksproject dat erop is gericht dierproeven in het vaccinonderzoek te vervangen. In samenwerking met verschillende vaccinproducenten, hebben wij vaccins en vaccincomponenten dankzij onze bioassays zeer uitgebreid gekarakteriseerd. Op één van de vaccincomponenten reageren onze bioassays bijzonder sterk. Dit kan mogelijk een startpunt vormen voor het vervangen van de dierproeven die nu plaatsvinden in de kwaliteitscontrole en vrijgifte-procedures. Daarnaast participeren we, met dezelfde bioassays, in een ander Europees onderzoeksproject, met als doel het vaccinonderzoek vooruit te brengen. De vraagstellingen daar zijn van meer basale aard, en onze proefdiervrije methoden staan ter beschikking van geïnteresseerde vaccinontwikkelaars. In 2017 hebben zich daarvan al verschillende gemeld en de eerste studies zullen in 2018 starten.



Lees meer op
euvaccine.eu

Openheid en communicatie

Naast het inpassen van de 3V-principes binnen de eigen organisatie, participeert BPRC in verschillende (inter)nationale gremia die zich bezighouden met proefdiergebruik.

Onze diervverzorgers, diertrainers, dierenartsen en koloniemanager nemen actief deel aan verschillende (inter)nationale meetings en congressen waarbij ze ervaringen uitwisselen met vakgenoten. Ook zijn ze actief betrokken bij organisaties zoals de Biotechnische Vereniging, de Nederlandse Vereniging voor Proefdierkunde en de Europese Vereniging voor Dierenartsen. Door het uitwisselen van ervaringen met vakgenoten, is het mogelijk methoden en protocollen van verschillende instituten op het gebied van voeding, huisvesting en verzorging te standaardiseren; een belangrijke bijdrage aan de 3V's en dus aan het dierenwelzijn.

Door het geven van rondleidingen, open dagen en voorlichtingen probeert BPRC zo transparant mogelijk te zijn. Vanzelfsprekend kan dit alleen met inachtneming van het waarborgen van de veiligheid en gezondheid van dier en mens. BPRC biedt studenten de mogelijkheid hun (afstudeer)stage bij BPRC uit te voeren. Studenten van vmbo-, mbo-, hbo-opleidingen en van universiteiten maken hier veelvuldig gebruik van. Verder verzorgen wij regelmatig rondleidingen aan geïnteresseerden, zoals scholieren en studenten, uit binnen- en buitenland.

Daarnaast hebben onze diertrainers en koloniemanager lezingen verzorgd bij verschillende gelegenheden en geeft BPRC op vaktechnische gebieden workshops. Verder verschaft BPRC op verzoek informatie aan de Stichting Informatie Dierproeven en leveren wij sprekers voor debatten over proefdiergebruik. Het hoofd van de unit Alternatieven is sinds 2010 lid van de redactieraad die de brochure "Dierproeven: Zo doen ze dat!" toetst op inhoud.



Bezoek de website
van Stichting
Informatie
Dierproeven.



BPRC Proefdierkundig Jaarverslag 2017



www.bprc.nl